



*Centre d'Etudes Doctorales « Sciences et Techniques »
Formation doctorale « Ressources Naturelles, Environnement et Santé (RNES) »*

THÈSE

Présentée par

Mr : Youssef KHACHTIB

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Spécialité : Biologie

Option : Génétique et Biologie moléculaire

Caractérisation génétique et moléculaire du pommier au Maroc et de son ravageur le puceron cendré

Soutenue publiquement le **Mercredi 10 Mai 2023** devant la Commission d'Examen :

Madame Hafida HANINE	Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal	Présidente / Rapportrice
Monsieur Younes ABBAS	Professeur Habilité, Faculté polydisciplinaire Béni Mellal, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal	Rapporteur
Madame Leila MEDRAOUI	Professeur Habilité, Faculté des Sciences, Université Mohamed V, Rabat	Rapportrice
Madame Hanane HAMDALI	Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal	Examinatrice
Monsieur Hakim ALILOU	Professeur Habilité, Faculté polydisciplinaire Khouribgua, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal	Examineur
Monsieur Abdelmajid HADDIOUI	Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal	Directeur de thèse
Monsieur Said BOUDA	Professeur Habilité, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal	Co-Directeur de thèse

AVANT-PROPOS

- **Nom et prénom : Youssef KHACHTIB**
- **Intitulé du travail : Caractérisation génétique et moléculaire du pommier au Maroc et de son ravageur le puceron cendré.**
- **Directeur de la recherche : Pr. Abdelmajid HADDIOUI**
- **Co-encadrant : Pr. Said BOUDA**
- **Unité de recherche : Laboratoire de Biotechnologie Agro-industrielle et Médicale**
- **Période du thèse : 2016-2022**
- **Principales publications auxquelles ce travail a donné lieu :**
 - ✓ **Youssef Khachtib**, Said Bouda, Youssef Ait Bella and Abdelmajid Haddioui (2023). Use of ISSR markers for assessing genetic diversity and structure and resolving mislabeling of Moroccan apple germplasm. Article soumis pour publication dans le journal Biologia (Poland).
 - ✓ **Youssef Khachtib**, Lalla Hasna Zinelabidine Said Bouda, Hanane Hamdali, Soumaya Hammada, Abdelmajid Haddioui. (2022). Genetic characterization of cultivated apple (*Malus x domestica* Borkh.) in Morocco using microsatellite (SSR) markers. *Ecological Genetics and Genomics*, 23, 100122. [https://doi.org/ 10.1016/ j.egg. 2022.100122](https://doi.org/10.1016/j.egg.2022.100122).
 - ✓ S.G. Olvera-Vazquez, C. Remoué, A. Venon, A.Rousselet, ...A. Haddioui, ..., **Y. Khachtib** et al. (2021). Large scale geography survey provides insights into the colonization history of a major aphid pest on its cultivated apple host in Europe, North America and North Africa. *Peer Community Journal*, 1: e34.
 - ✓ **Youssef Khachtib**, Said Bouda, Youssef Ait Bella and Abdelmajid Haddioui. (2020). Pomological Evaluation of Apple (*Malus x domestica* Borkh) Germplasm in Morocco. *Phytomorphology: An International Journal of Plant Morphology* 70(1&2):1-9
- **Principales communications auxquelles ce travail a donné lieu :**
 - ✓ **Youssef KHACHTIB**, Lalla Hasna ZINELABIDINE, Said BOUDA, Youssef Ait-BELLA, Hanane HAMDALI, Soumaya HAMMADA and Abdelmajid HADDIOUI. Genetic diversity and relatedness among 27 apple genotypes (*Malus X domestica* borkh) from four geographical regions In central Morocco revealed by Microsatellite (SSR) markers. Cukurova 9th International Scientific Researches Conference. **9-11 October, 2022, Adana, Turkey. (Communication Orale).**

- ✓ **Youssef KHACHTIB**, Lalla Hasna ZINELABIDINE, Said BOUDA and Abdelmajid HADDIOUI. Genetic diversity in Moroccan apple cultivars revealed with SSR markers. ISPEC 8th International Conference on Agriculture, Animal Sciences and Rural Development. **24-2 December 2021, Bingol University, Turkey. (Communication Orale).**
- ✓ **Youssef KHACHTIB**, Said BOUDA, Youssef AIT BELLA, Abdelmajid HADDIOUI. Assessment of genetic diversity of Moroccan apples (*Malus domestica* Borkh.) cultivars using pomological traits and ISSR markers. 1st International Congress Sustainable Agriculture: Tools and Innovations «AgriNov2021». **27 au 30 octobre 2021, Beni Mellal, Maroc. (Communication Poster).**
- ✓ **Youssef KHACHTIB**, Lalla Hasna ZINELABIDINE, Said BOUDA, Abdelmajid HADDIOUI. Genetic Diversity in Moroccan Apple Cultivars Revealed with SSR Markers. 1st International Congress Sustainable Agriculture: Tools and Innovations «AgriNov2021». **27 au 30 octobre 2021, Beni Mellal, Maroc. (Communication Orale).**
- ✓ **Youssef KHACHTIB**, Said BOUDA, Abdelmajid HADDIOUI. Assessment Of Genetic Variability Among Moroccan Apple Germplasm Based on ISSR Markers. International Modern Scientific Research Congress. **4-5 juin 2021, Istanbul, Turkey. (Communication Orale).**
- ✓ **Youssef KHACHTIB**, Lalla Hasna ZINELABIDINE, Said BOUDA and Abdelmajid HADDIOUI. Genetic diversity, genetic identities and relationships between four local populations of Apple (*Malus x domestica* borkh) in Morocco revealed by Microsatellite (SSR) markers. International Igdir Conference on Applied Science. **14-15 Avril 2021, Igdir, Turkey. (Communication Orale).**
- ✓ **Youssef KHACHTIB**, Lalla Hasna ZINELABIDINE, Said BOUDA and Abdelmajid HADDIOUI. Molecular Characterization of Apple Cultivars from Morocco Using Microsatellite (SSR) Markers. 5th Asia Pacific International Modern Sciences Congress. **16-18 juillet 2020, Sydney, Australie. (Communication Orale).**
- ✓ **Youssef KHACHTIB**, Said BOUDA, Abdelmajid HADDIOUI. Assessment of diversity of cultivated apple (*Malus domestica* Borkh) in Morocco by pomological traits. First edition of international E-conference on Climate nexus Perspectives: Water, Food and Biodiversity. **4 juin 2020, Khénifra, Maroc. (Communication Orale).**
- ✓ **Youssef KHACHTIB**, Said BOUDA, Abdelmajid HADDIOUI. Phenotypic and Pomological Analyses of Apple (*Malus domestica* Borkh.) Germplasm in Morocco. 2nd International Scientific Day of Taroudant, **2 novembre 2019, Taroudant, Maroc. (Communication Orale).**

- ✓ **Youssef KHACHTIB**, Said BOUDA, Abdelmajid HADDIOUI. Study of pomological variation of Apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars in Morocco. 6ème Meeting international “Agriculture Oasienne et développement durable, OASuD 2018”. **19-21 Decembre 2018, Zarzis, Tunisie. (Communication Poster).**
- ✓ **Youssef KHACHTIB**, Said BOUDA, Abdelmajid HADDIOUI. Identification and Pomological Evaluation of Apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars in Morocco. The Fourth International American Moroccan Agricultural Sciences Conference (AMAS Conference IV): Promoting Cooperation in Scientific Research and Education between USA and Morocco. **9-11 Mai 2018, Agropolis, Meknes, Maroc. (Communication Poster).**

➤ **Stages :**

- ✓ **Du 23/07 /2019 au 12 /08 /2019 :**

Stage sur les expériences chinoises en matière de développement agricole, **Pékin, Chine.**

- ✓ **Du 20/08 /2018 au 30 /09 /2018 :**

Stage sur les techniques de collecte des eaux de pluie et leur réutilisation, **Lanzhou, Chine.**



REMERCIEMENT

Je voudrais dans un premier temps remercier, mon directeur de thèse **le professeur Abdelmajid HADDIOUI**, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec lui.

J'adresse de chaleureux remerciements à mon Co-encadrant de thèse, **le Professeur Said BOUDA**, pour son attention de tout instant sur mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Son énergie et sa confiance ont été des éléments moteurs pour moi.

Je voudrais remercier également **Pr. Lalla Hasna Zinelabidine** pour son aide précieuse et plus particulièrement pour les nombreux échanges sur les analyses de données.

Je remercie chaleureusement **les membres du jury et les rapporteurs** d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à remercier **Dr. Amandine Cornille** du laboratoire de Génétique Quantitative et Evolution (Le Moulon, Gif-sur-Yvette, France) ainsi que les autres membres de ce Laboratoire et plus particulièrement **Anthony Venon, Carine Remoué** et **Matthieu Flaque** pour leur aide dans l'analyse des marqueurs SSR.

Je remercie du fond du cœur mon encadrant de licence **Pr. Thami Himmi**, avec qui j'ai découvert le monde de la recherche scientifique. Que ce soit par téléphone ou en face à face, à n'importe quel moment de ma thèse, il a été toujours réactif, pour m'aider, pour me soutenir et pour m'encourager.

Je tiens à témoigner mes remerciements et ma reconnaissance à mes collègues ainsi que mes compagnons de laboratoire, **Y. Ait bella ; T. El Rasafi ; H. Abd-Dada ; T. Chedadi ; A. El-khabli ; A. Ouhrouch ; A. Idir ; M. Mounir ; E. Benka ; J. Aabdousse ; Y. Aallam ; A. Nouri ; A. Ouibimah ; H. Ourradi ; N. salim ; M. El-Ouazzani ; M. Bouselham ; I. Douini et R. Faïda** pour leur généreux soutien tout au long de mon travail de doctorat.

Un immense merci à mes parents **Ahmad Khachtib** et **Aïcha Badaoui**, ainsi que toute ma famille pour leur soutien inconditionnel pendant toutes ces années d'études. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragée à faire ce que j'aime.

Enfin, J'exprime toute ma gratitude envers les personnes dont le nom n'apparaîtrait pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre



Résumé

En vue de fournir des éléments d'aide pour la gestion et la valorisation du germplasma de pommier (*Malus domestica*) au Maroc, la présente thèse a eu pour objectif d'évaluer la diversité phénotypique, chimique et génétique des cultivars de cette espèce, ainsi que l'étude de la diversité génétique de l'un de ses principaux ravageurs, *Dysaphis plantaginea*.

L'évaluation de la diversité phénotypique de 30 cultivars à l'aide de 34 marqueurs pomologiques et chimiques a permis de révéler trois groupes de cultivars, différenciés sur la base de plusieurs marqueurs dont les plus discriminants sont la taille, le poids, la forme et la couleur du fruit, la longueur du pédoncule, la surface de liège autour du pédoncule, l'acidité titrable et la teneur en solides solubles (Brix°).

La diversité génétique de 29 génotypes (4 variétés introduites et 25 cultivars locaux) provenant de 4 régions (Marrakech, Azilal, Khénifra, Fès) a été estimée à l'aide de 15 marqueurs ISSR. Les résultats obtenus ont révélé une diversité génétique relativement élevée des cultivars étudiés qui sont différenciés dépendamment de leur origine géographique. D'autre part, les analyses des résultats ont également révélé des cas possibles de synonymie et d'homonymie chez les cultivars étudiés.

L'exploitation de 26 marqueurs SSR chez 27 génotypes locaux montre que seuls dix marqueurs sont capables de résumer l'ensemble des informations génétiques détectées par les 26 marqueurs étudiés. L'analyse des résultats obtenus a également révélé deux cas de duplication, trois cas possibles d'homonymie et 13 liens de parenté au sein des génotypes étudiés.

La dernière partie de ce travail a concerné une étude de la diversité génétique des populations de puceron cendré (*D. plantaginea*) récoltées des principales zones de production du pommier au Maroc à l'aide de 30 marqueurs SSR. L'analyse des fréquences alléliques a révélé une diversité génétique relativement faible des populations étudiées. La majeure partie de cette diversité (97.29%) se trouve au niveau intra-population. En outre, de faibles différenciations génétiques entre les populations ($F_{st} = 0.027$) avec un flux génétique élevé ($N_m = 4.80$) ont été trouvées. Ces résultats nous laissent suggérer que les populations de ce ravageur au Maroc, sont relativement homogènes. Cette homogénéité peut ouvrir de nouvelles perspectives dans les méthodes de lutte contre ce ravageur.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse fournissent des informations cruciales sur la composition génétique et les caractéristiques phénotypiques du pommier à travers le Maroc, ainsi que sur la diversité génétique d'un des pucerons les plus nuisibles de cet arbre fruitier d'importance agronomique.

Mots clés : *Malus domestica*, *Dysaphis plantaginea*, marqueurs morphologique, marqueurs ISSR, marqueurs SSR, variation génétique.

Abstract

In order to provide elements of help for the management and valorization of apple germplasm (*Malus domestica*) in Morocco, the present thesis aimed to evaluate the phenotypic, chemical, and genetic diversity of several cultivars of this species, as well as the study of the genetic diversity of one of its main pests, *Dysaphis plantaginea*.

The evaluation of the phenotypic diversity of 30 apple cultivars using 34 pomological and chemical markers revealed three groups of cultivars differentiated on the basis of several characteristics, the most discriminating of which are fruit size, weight, shape and color, peduncle length, cork surface around the peduncle, titratable acidity and soluble solids content (Brix°).

On the other hand, the genetic diversity of 29 genotypes (4 introduced varieties and 25 local cultivars) from 4 regions (Marrakech, Azilal, Khenifra, Fez) was estimated using 15 ISSR markers. The results obtained revealed a relatively high genetic diversity of the studied cultivars which are differentiated according to their geographical origin. Nevertheless, the results also revealed possible cases of synonymy and homonymy among the studied cultivars.

Additionally, the exploitation of 26 SSR markers in 27 local genotypes shows that only ten markers are able to summarize all the genetic information detected by the 26 markers studied. In addition, the analysis of the results obtained revealed two cases of duplication, three possible cases of homonymy and 13 relationships within the studied genotypes.

The last part of this work concerned a study of the genetic diversity of several populations of rosy apple aphids (*D. plantaginea*) collected from the major apple-producing region in Morocco using 30 SSR markers. Allele frequency analysis revealed a relatively low genetic diversity of the studied populations. Most of this diversity (97.29%) is found at the intra-population level. Furthermore, low genetic differentiation between populations ($F_{st} = 0.027$) with high gene flow ($Nm = 4.80$) was found. These results suggest that the populations of this pest in Morocco are relatively homogeneous. This homogeneity may open new perspectives in the methods of control of this pest.

In Conclusion, the results obtained in this study provide crucial information on the genetic and phenotypic characteristics of apple cultivars across Morocco, as well as on the genetic diversity of the most damaging aphids of this agronomically important fruit tree.

Keywords: *Malus domestica*, *Dysaphis plantaginea*, morphological markers, ISSR markers, SSR markers, genetic variation.

ملخص

من أجل إنتاج بيانات علمية جديدة حول زراعة التفاح بالمغرب ، والتي ستساعد بدون شك الفلاحين على حسن تدبير و تثمين هذه الزراعة، قمنا خلال هذا البحث بدراسة التنوع المورفولوجي، الكيميائي والجيني لأصناف مختلفة من التفاح (*Malus domestica*). بالإضافة إلى ذلك قمنا بدراسة التنوع الوراثي لمن التفاح الوردي (*Dysaphis plantaginea*) الذي يعتبر واحدة من أشد حشرات المن فتكا بهذه الزراعة.

خلال تقييمنا للتنوع الفينولوجي لثلاثين صنف من التفاح باستعمال 34 مؤشر مورفولوجي و كيميائي، أظهرت النتائج وجود ثلاثة مجموعات مستقلة فيما بينها. المؤشرات الأكثر تحكماً في تشكل هذه المجموعات هي حجم، وزن، شكل ولون الثمار، طول السويقة، نسبة الفلين حول السويقة، إضافة إلى نسبة الحموضة ونسبة السكر ($Brix^{\circ}$).

من جهة أخرى تمت دراسة التنوع الوراثي لأربعة أصناف مستوردة و خمسة وعشرين صنف محلي تم أخذ عيناتهم من أربع مناطق وسط المجال الجغرافي للمغرب (مراكش، أزيلال، خنيفرة و فاس) باستخدام خمسة عشر مؤشر جزيئي من نوع ISSR. أظهرت النتائج المحصل عليها تنوعاً وراثياً نسبياً مرتفع بين الأصناف المدروسة كما أظهرت تباين واضح بين هذه الأصناف حسب أصلها الجغرافي. كشف تحليل النتائج أيضاً عن وجود حالات محتملة من الترادف والتماثل.

من خلال دراستنا ل 27 فرد من التفاح المحلي بغرض تقييم 26 مؤشر جزيئي من نوع SSR، تمكنا من إثبات إمكانية تقليص عدد هذه المؤشرات إلى 10 فقط دون حصول أي تغيير في كمية وجودة النتائج المحصل عليها. بعد تحليل النتائج تم الكشف أيضاً عن وجود حالتين مطابقتين، ثلاث حالات من التماثل وثلاثة عشر علاقة قرابة أبوية بين الأفراد المدروسة.

يتعلق الجزء الأخير من هذه البحث بدراسة التنوع الجيني لعدة مجموعات من من التفاح الوردي تم أخذ عيناتها من مناطق إنتاج التفاح الرئيسية بالمغرب باستخدام 30 مؤشر جزيئي من نوع SSR. كشفت دراسة الترددات الحليلية عن تنوع جيني منخفض نسبياً لدى المجموعات التي تمت دراستها؛ 97.29% من هذا التنوع توجد داخل المجموعات. علاوة على ذلك تم الكشف أيضاً عن تمايزات وراثية منخفضة ($Fst=0.027$) مع تدفق جيني مرتفع ($Nm=4.80$). تشير هذه النتائج إلى أن ساكنات من التفاح الوردي بالمغرب متجانسة نسبياً. هذا التجانس يمكن أن يفتح آفاقاً جديدة لتطوير طرق مكافحة هذه الحشرة.

توفر النتائج التي تم الحصول عليها خلال هذا الأطروحة معلومات مهمة حول التركيبة الجينية والخصائص البومولوجية لأشجار التفاح بالمغرب، فضلاً عن التنوع الجيني لواحدة من حشرات المن الأكبر ضرراً على هذه الشجرة المثمرة التي تحظى بأهمية كبيرة داخل النسيج الزراعي الوطني.

الكلمات المفتاحية: أشجار التفاح، من التفاح الوردي، مؤشرات مورفولوجية، مؤشرات ISSR، مؤشرات SSR، التنوع الجيني.

Liste des abréviations

ACP: Analyse en composantes principales

AFLP: Amplified Fragment of Length Polymorphism

AMOVA: Analyse de la variance moléculaire

ANOVA: Analyse de la variance à un seul facteur

BET: Bromure d'éthidium

CHA: Classification hiérarchique ascendante

dNTP: 3' désoxyribonucléoside 5' triphosphate

EDTA: Acide éthylène diamine tétra-acétique

FAO: Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

ha/Km/m/cm/mm: Hectare /kilomètre/mètre/centimètre/millimètre

INRA: Institut National de la Recherche Agronomique

ISSR: Inter Simple Sequence Repeat

Kb/ Pb: Kilobases/ paire de bases

M/mM/ μ M: Molaire/ milli molaire/ micromolaire

ml/ μ l: Millilitre/microlitre

PCoA: Analyse en coordonnées principales

PCR: Polymerase Chain Reaction

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment of Length Polymorphism

SNPs : Single Nucleotide Polymorphisms

SSR: Single Sequence Repeat

t/g/mg/ng: Tonne/ gramme/milligramme/nanogramme

Ta/ Tm: Annealing Temperature/ Melting Temperature

TBE: Tampon Tris - Borate- EDTA

U / V: Unité / Voltes

UPGMA: Unweighted pair group method with arithmetic mean

UPOV : Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétales

UV-Vis : Ultraviolet Visible

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux ennemis du pommier (Blommers, 1994; Janick et Moore, 1996).	17
Tableau 2: La sensibilité d'une liste non exhaustive de variétés de pommiers au puceron cendré.	25
Tableau 3: Composition nutritionnelle de la pomme.	33
Tableau 4: Les 20 premiers pays producteurs de pommes pour l'année 2019-2020.	35
Tableau 5: Caractéristiques géographiques et données météorologiques des zones de culture de pommier prospectées.	51
Tableau 6: Fréquences des caractères qualitatifs considérés chez les cultivars étudiés.	59
Tableau 7: Statistiques descriptives des caractères quantitatifs considérés chez les cultivars étudiés.	60
Tableau 8: Matrice des corrélations entre les paramètres morphologiques et chimiques étudiés.	61
Tableau 9: Appellation et origine géographique des 29 cultivars étudiés.	70
Tableau 10: Séquences des amorces ISSRs utilisées.	72
Tableau 11: Les Paramètres de la diversité génétique générée par les marqueurs ISSRs utilisés.	79
Tableau 12: Paramètres d'analyses génétique de Nei chez les cultivars de pommier étudiés.	80
Tableau 13: Matrice des distances génétiques des 29 cultivars étudiés.	81
Tableau 14: Quelques paramètres de diversité génétique basés sur les marqueurs ISSR obtenus par différentes études sur le pommier.	85
Tableau 15: Les génotypes de pommier analysés et leurs origines géographiques.	90
Tableau 16: Caractéristiques des 26 amorces SSRs utilisées dans cette étude.	92
Tableau 17: Description des réactions PCR multiplexes (MP01, MP02, MP03, MP04) utilisées pour l'amplification des microsatellites.	93
Tableau 18: Estimation de la diversité génétique de 27 génotypes de pommier au Maroc à l'aide de 27 marqueurs SSR.	97
Tableau 19: Estimation de la diversité génétique des génotypes étudiés regroupés par origine.	98
Tableau 20: Origine des populations de <i>D. plantaginea</i> utilisés dans le cadre de cette étude.	114
Tableau 21: Caractéristiques des marqueurs SSR utilisés dans le cadre de cette étude.	116
Tableau 22: Estimation de la diversité génétique des échantillons de <i>D. plantaginea</i> .	119
Tableau 23: Différenciation génétique (F_{st}) et flux de gènes (Nm) entre les populations étudiés de <i>D. plantaginea</i> .	120
Tableau 24: Résultats de l'AMOVA des populations de <i>D. plantaginea</i> .	120
Tableau 25: Matrice des distances génétiques (Nei) entre les populations de pucerons étudiés.	122
Tableau 26: Estimation de la diversité génétique des échantillons de <i>D. plantaginea</i> collecté au Maroc, Europe et États-Unis.	125

Liste des figures

Figure 1: L'histoire évolutive du pommier domestique	7
Figure 2: Différentes parties du pommier (<i>Malus x domestica</i> Borkh.)	9
Figure 3: Formation du fruit chez le Pommier.	10
Figure 4: Synthénie et distribution des caractéristiques génomiques et épigénomique du génome du pommier.	13
Figure 5: Dégâts des maladies et des ravageurs du pommier.	16
Figure 6: Description morphologique du Puceron cendré du pommier	18
Figure 7: Cycle de développement de <i>Dysaphis plantaginea</i> .	20
Figure 8: Symptômes et dégâts causés par le puceron cendré du pommier sur les différentes parties de l'arbre.	21
Figure 9: Le cortège de prédateurs observés dans les colonies du puceron.	23
Figure 10: Effet du porte-greffe sur le volume de l'arbre.	28
Figure 11: Une pomme génétiquement modifiée anti-brunissement de la variété Granny Smith.	32
Figure 12: Répartition de la superficie de pommier cultivé par variété au Maroc en 2011-2012.	36
Figure 13: Répartition régionale du nombre des heures de température inférieure à 7,2°C.	38
Figure 14: Quelques variétés de pommier cultivés.	41
Figure 15: Apport des outils de génomique dans le management des ressources phylogénétiques.	45
Figure 16: Localisation des cultivars de pommier (<i>Malus x domestica</i> Borkh) collectés.	50
Figure 17: Schéma explicatif de quelques traits étudiés.	54
Figure 18: Fruits de quelques cultivars étudiés.	56
Figure 19: Corrélations entre les variables quantitatives et les deux premiers axes de l'ACP.	62
Figure 20: Diagramme de dispersion des cultivars étudiés, basé sur les deux composantes principales.	63
Figure 21: Dendrogramme résultant de la classification hiérarchique ascendante basée sur 34 caractères pomologiques.	64
Figure 22: Distribution géographique des vergers de pommiers échantillonnés.	71
Figure 23: Exemple de profil électrophorétique obtenu par l'amorce UBC 845.	78
Figure 24: Dendrogramme UPGMA obtenu sur la base des distances génétiques entre les 29 cultivars de pommier étudiés.	82
Figure 25: Indices $\ln P(D)$ et K calculés afin de déterminer le nombre de populations (K) le plus probable.	83
Figure 26: Structuration des cultivars étudiés par population suivant la méthode de Pritchard et al. (2010).	84
Figure 27: Localisation géographique des génotypes étudiés de <i>Malus x domestica</i> .	91
Figure 28: Dendrogramme UPGMA basé sur les 26 marqueurs SSR.	99
Figure 29: Analyse en coordonnées principales (PCoA) des génotypes étudiés.	100

Figure 30: Méthode graphique permettant la détermination du nombre optimal K de clusters selon les paramètres d'Evanno et al. (2005).	101
Figure 31: Analyse de la structure génétique des cultivars étudiés, basée sur les données de 26 marqueurs SSR en utilisant le logiciel STRUCTURE.	101
Figure 32: Relations génétiques de premier ordre (des trios, parents/descendance) détectées au sein des génotypes étudiés.	103
Figure 33: Dendrogrammes de 27 génotypes de pommier obtenus avec les données de 26 amorces SSR (A) et avec les données de 10 amorces SSR sélectionnées comme les meilleures pour les études génétiques chez <i>Malus domestica</i> (B).	104
Figure 34: Analyse en coordonnées principales de 27 génotypes de pommier obtenus avec les données de 26 amorces SSR (A) et les données de 10 amorces SSR choisies comme les meilleures pour les études de diversité génétique chez <i>Malus domestica</i> (B).	105
Figure 35: Localisation des échantillons de <i>D. plantaginea</i> étudiés.	113
Figure 36: Analyse en coordonnées principales (PCoA) de 63 individus de <i>D. Plantaginea</i> en utilisant 30 marqueurs SSR.	121
Figure 37: Dendrogramme UPGMA des populations de pucerons étudiés.	122
Figure 38: Détermination du K optimal selon la méthode de calcul d'Evanno et al. 2005.	123
Figure 39: Représentation graphique de la structure génétique de 63 individus de <i>D. plantaginea</i> basée sur les données de 30 marqueurs SSR.	123
Figure 40: Structure génétique spatiale des populations de <i>D. plantaginea</i> au Maroc, en Europe et aux Etats-Unis, déduite avec STRUCTURE de K = 2 à K = 8.	126

Sommaire

Introduction Générale	1
Chapitre 1 - Revue bibliographique	5
I. Le pommier : Origine et histoire de domestication	6
II. Classification, description botanique et biologie de la reproduction	7
II.1 Classification et nomenclature	7
II.2 Description botanique	8
II.3 Biologie de la reproduction	11
III. Cytogénétique et complexité du génome	12
IV. Exigences pédoclimatiques du pommier	14
IV.1 Exigences pédologiques	14
IV.2 Exigences climatiques	14
IV.2.1 Température	15
IV.2.2 Pluviométrie	15
IV.2.3 Vent	15
V. Les principales maladies du pommier	16
V.1 Puceron cendré (<i>Dysaphis Plantaginea</i>)	18
V.1.1 Répartition géographique	18
V.1.2 Description et position systématique	18
V.1.3 Cycle de vie	19
V.1.4 Dégâts	21
V.1.5 Les prédateurs naturels de <i>Dypaphis plantaginea</i>	23
V.1.6 Méthodes de lutte	24
VI. Multiplication et Sélection du pommier	28
VI.1 Multiplication du pommier	28
VI.2 Sélection du pommier	29
VII. Propriétés nutritionnelles des pommes	32
VIII. Importance économique du pommier	34
VIII.1 Importance économique du pommier au Monde	34
VIII.2 Importance économique du pommier au Maroc	35
IX. Ressources génétiques de pommier au Maroc	36
X. Caractéristiques climatiques des zones de production.	37
X.1 Disponibilités en froid	37
X.2 Ressources en eau	37
X.3 Grêle	37
X.4 Gelée	39
XI. Enjeux des ressources génétiques du pommier.	40

XII.	Conservation des ressources génétiques du pommier	41
XII.1	Conservation in-vitro	42
XII.2	Conservation In-Vivo	43
XIII.	Etude de la diversité génétique du pommier	43
XIII.1	Marqueurs morphologiques	43
XIII.2	Marqueurs moléculaires	44
XIII.2.1	Les SSR	46
XIII.2.2	L'ISSR	47
Chapitre 2 - Analyse de la diversité pomologique du pommier au Maroc		48
I.	Introduction	49
II.	Matériel et méthodes	50
II.1	Matériel végétal	50
II.2	Variables étudiées	51
II.2.1	Variables morphologiques liées aux fruits.	52
II.2.2	Variables chimiques	53
II.3	Analyses statistiques	55
II.3.1	Analyse de la variance à un seul facteur (ANOVA)	55
II.3.2	Analyse en composantes principales (ACP)	55
II.3.3	Classification hiérarchique ascendante (CHA)	55
II.3.4	Coefficient de corrélation de Pearson	55
III.	Résultats	55
III.1	Analyse des descripteurs morphologiques qualitatifs	57
III.2	Analyse des descripteurs quantitatifs (morphologiques et chimiques)	57
III.3	Test de corrélation de Pearson :	58
III.4	Analyse en composantes principales et classification hiérarchique ascendante	62
IV.	Discussion	65
V.	Conclusion	67
Chapitre 3 - Analyse de la diversité génétique du pommier au Maroc à l'aide des marqueurs (ISSR)		68
I.	Introduction	69
II.	Matériel et méthodes	69
II.1	Matériel végétal	69
II.2	Extraction d'ADN	71
II.3	Amplification par PCR de marqueurs ISSR	71
II.3.1	Amorces ISSR utilisées	71
II.3.2	Amplification par PCR	72
II.4	Analyses statistiques	73
II.4.1	Calcul des paramètres de diversité	73
II.4.2	Analyse de la structure de la population	77

III. Résultats	78
III.1 Polymorphisme des marqueurs ISSR	78
III.2 Structuration des géotypes	79
III.3 Distance génétique et regroupement des cultivars	80
IV. Discussion	84
V. Conclusion	87
Chapitre 4 : Évaluation des marqueurs SSR en étudiant quatre populations du pommier au Maroc	88
I. Introduction	89
II. Matériel et méthodes	90
II.1 Matériel végétal	90
II.2 Extraction d'ADN	91
II.3 Analyse des microsatellites	91
II.4 Analyses statistiques	93
II.4.1 Calcul des paramètres de diversité	93
II.4.2 Classification hiérarchique	94
II.4.3 Analyse en coordonnées principales (PCoA)	94
II.4.4 Analyse bayésienne	94
II.4.5 Analyse de filiation	95
II.4.6 Analyse statistique pour la sélection des amorces SSR	95
III. Résultats	96
III.1 Polymorphisme des microsatellites et diversité génétique	96
III.2 Classification hiérarchique et analyse en coordonnées principales :	98
III.3 Structure et différenciation génétique	100
III.4 Analyse de filiation	102
III.5 Sélection des amorces SSR pour les études de diversité génétique chez le pommier	103
IV. Discussion	106
IV.1 Polymorphisme des microsatellites et diversité génétique	106
IV.2 Structure et différenciation génétique	107
IV.3 Analyse de filiation	108
IV.4 Sélection des amorces SSR pour les études de diversité génétique chez le pommier	109
V. Conclusion	110
Chapitre 5 - Analyse de la diversité génétique du puceron cendré du pommier (<i>Dysaphis plantaginea</i>, Passerini) au Maroc	111
I. Introduction	112
II. Matériel et méthodes	113
II.1 Matériel génétique	113

II.2	Extraction d'ADN _____	114
II.3	Analyse des microsatellites _____	115
II.4	Polymorphisme et diversité génétique _____	117
II.5	Structure et différenciation génétique _____	117
III.	Résultats _____	118
III.1	Polymorphisme des microsatellites et diversité génétique _____	118
III.2	Différenciation génétique et flux de gènes _____	119
III.3	Structure génétique et relation entre les populations _____	121
IV.	Discussion _____	124
V.	Conclusion _____	128
	Conclusion générale et perspectives _____	129
	Références bibliographiques _____	133

Introduction Générale

L'arboriculture est l'une des grandes spéculations qui figurent dans les préoccupations de l'agriculture marocaine. De nombreux facteurs justifient la grande importance qu'il faut accorder à cette filière. Au-delà de sa contribution à un approvisionnement alimentaire sûr et sécurisé, l'arboriculture marocaine constitue une ressource importante d'exportation des produits agricoles, qui est largement considérée comme l'un des piliers de l'économie nationale.

Parmi les arbres fruitiers les plus consommés et qui offrent une valeur nutritionnelle importante dans le monde entier, on trouve le pommier (*Malus domestica* Borkh) ; l'un des espèces fruitières les plus cultivées dans les régions tempérées, avec une production mondiale qui excède 86,4 millions de tonnes en 2020 (FAOSTAT, 2020).

Des preuves génétiques suggèrent que le pommier cultivé a été domestiqué à partir de *Malus sieversii* (pommier sauvage) il y a 4000 à 10 000 ans dans les montagnes du Tian-Shan en Chine et après, il a été disséminé (probablement par les Grecs et les Romains pendant leurs échanges et leurs conquêtes le long de la route de la soie) de l'Asie centrale vers l'Europe occidentale et l'Afrique du Nord, où elle s'est ensuite répandue dans le monde entier (Juniper et al. 2006 ; Cornille et al. 2014).

La distribution géographique étendue en plus de la sélection et l'exploitation du pommier par l'homme pendant des siècles ont produit des milliers de cultivars avec une diversité phénotypique fascinante (Liang et al. 2015). Cependant, l'intensification de la production à partir des profils variétaux améliorés a engendré une réduction importante de la diversité génétique chez cette espèce au cours des dernières décennies. En effet, parmi les 7000 cultivars qui existent dans le monde (Hokanson et al. 2001), la culture du pommier est aujourd'hui limitée à un nombre très étroit de cultivars comme, Golden Delicious, Gala, Red Delicious et Idared qui représentent à eux seuls 48 % de la production mondiale (Marconi et al. 2018). Des tendances similaires sont observées au Maroc, où la culture du pommier (qui se place au premier rang parmi les rosacées fruitières à pépins plantés au Maroc) est dominée par quelques variétés introduites comme Golden Delicious et Starking Delicious. Ces deux variétés représentent à elles seules plus de la moitié de la production nationale (MAPM, 2014). Cependant, la quantité produite des cultivars locaux qui ont accumulé une grande adaptation aux différentes conditions pédoclimatiques du pays pendant des dizaines d'années et parfois résistantes à certaines maladies devient de plus en plus insignifiante. Ce qui présente un grand risque pour leur disparition. Il est donc primordial d'adopter une vision plus globale sur les ressources génétiques du pommier au Maroc.

Pendant les dernières décennies, la filière du pommier au Maroc a connu un développement important (les superficies cultivées dépassent les 50 mille hectares (FAOSTAT, 2020), grâce à des initiatives privées stimulées par les subventions octroyées par le Département de l'agriculture dans le cadre du Fonds de Développement Agricole (FDA) et du Plan Maroc vert (MAPM, 2019)). Cependant, et malgré un développement remarquable de cette filière, seule un nombre très limité de cultivars est cultivée d'une manière intensive dans les vergers commerciaux au Maroc. Cette intensification des cultivars, qui sont génétiquement homogènes en plus des conditions météorologiques qui deviennent de plus en plus défavorables à cause du changement climatique, rend ces cultivars plus sensibles aux différents stress abiotiques et biotiques et surtout aux attaques des ravageurs ce qui nécessite une utilisation intensive de pesticides. Donc il est fortement justifié d'envisager un programme de gestion intégrée contre ces ravageurs en utilisant des moyens de lutte surtout biologiques pour limiter l'utilisation des pesticides qui sont néfastes pour la santé humaine, les insectes pollinisateurs et l'environnement d'une façon générale. Parmi les principaux ravageurs du pommier au Maroc, figurent les pucerons et plus particulièrement le puceron cendré (*Dysaphis plantaginea* Passerini) qui est bien adapté aux conditions climatiques et aux pratiques culturales dans les vergers du pommier au Maroc. Il provoque beaucoup de dégâts sur les feuilles, les rameaux et les fruits causant ainsi des pertes économiques significatives.

Malgré la grande importance économique du pommier au Maroc, cette espèce n'a pas fait l'objet de travaux d'identification et de caractérisation pour sa protection et sa conservation. Dans l'état actuel de nos connaissances, on dispose de très peu d'informations sur la diversité génétique de cet arbre fruitier et sur son principal puceron ravageur: *D. plantaginea*.

Le travail proposé concerne premièrement l'étude de la diversité du patrimoine génétique du pommier au Maroc (en utilisant des marqueurs pomologiques et moléculaires) afin de fournir au gestionnaires des éléments d'aide à la décision pour la gestion et la conservation; et deuxièmement, l'étude de la diversité génétique du puceron cendré du pommier (*D. plantaginea*) au Maroc afin d'apporter des connaissances de base qui peuvent aider les pomiculteurs à adopter une gestion rationnelle de ce puceron. Cette thèse est structurée en cinq chapitres articulés comme suit :

- Le premier chapitre rapporte une synthèse bibliographique qui présente une description botanique du pommier (*Malus domestica* Borkh), l'histoire de sa diffusion, sa taxonomie, son importance économique, ses ravageurs en mettant l'accent

sur le puceron cendré du pommier (*D. plantaginea*) ainsi que son amélioration génétique

- Le second chapitre a porté sur l'évaluation pomologique des cultivars marocains du pommier en se basant sur 34 descripteurs pomologiques (quantitatifs et qualitatifs) et chimiques publiés par l'Union Internationale pour la protection des obtentions végétales (UPOV) et l'institut international des ressources phylogénétiques (IPGRI) et qui sont largement utilisés dans les études de diversité pomologique du pommier à l'échelle internationale.
- Le troisième chapitre a été consacré à l'étude de la biodiversité génétique du pommier cultivé au Maroc à l'aide de marqueurs moléculaires du type ISSR. Cette partie a pour but d'estimer la diversité génétique et comprendre les relations phylogénétiques et /ou des liens éventuels entre les cultivars de pommier à l'intérieur et entre les différentes régions productrices.
- Pour le quatrième chapitre nous avons essayé de faire d'une pierre deux coups: premièrement, en vue de rationaliser le processus de génotypage du pommier au Maroc (économiser le temps et ou l'argent sans perdre d'efficacité), nous avons évalué 26 marqueurs du type SSR répartis sur l'ensemble du génome du pommier afin de sélectionner les meilleures. Deuxièmement, nous avons évalué lesdits marqueurs en utilisons les génotypes du pommier qui nous intéresse; il s'agit de 27 génotypes de pommier avec des nominations locales appartenant aux quatre régions montagneuses. L'étude de ce type de génotypes va augmenter nos connaissances sur les ressources génétiques locales du pommier au Maroc, la chose qui pourrait être d'une grande importance dans les futurs programmes de gestion, de conservation et de valorisation.
- Le cinquième et le dernier chapitre est dédié à l'étude de la structure et la différenciation génétique de cinq populations de *D. plantaginea* réparties sur les principales régions productrices du pommier au Maroc dont le but de chercher des solutions en mesure de lutte contre ce ravageur qui engendrerait des menaces sérieuses pour les pomiculteurs.

Chapitre 1 - Revue bibliographique

I. Le pommier : Origine et histoire de domestication

Malgré le grand intérêt économique du pommier, l'histoire de sa domestication a longtemps été mal connue. Et pour cause, son lieu d'origine supposé a été inaccessible jusqu'à la fin de la guerre froide. Dès 1929, Nikolai Vavilov, botaniste et généticien russe, avait suggéré que le pommier sauvage *Malus sieversii* originaire des montagnes du Tian Shan au Kazakhstan en Asie centrale, était le principal géniteur du pommier cultivé. Il basait son hypothèse sur la similarité des fruits entre ce pommier sauvage et le pommier cultivé (Cornille et al. 2014).

Des travaux d'observation plus récents dans cette région ont montré que la diversité présente chez *M. sieversii*, notamment au niveau de la forme, du goût et de la couleur des fruits, se retrouvait chez le pommier cultivé (Cornille et al. 2012). De même, les analyses moléculaires de séquences d'ADN ribosomiques et chloroplastiques réalisées par Harris et al. (2002) ont montré que le pommier cultivé était phylogénétiquement proche du pommier sauvage de l'Asie Centrale. La confirmation définitive sera donnée par le séquençage du génome du pommier domestique et la comparaison de certains de ses gènes avec ceux d'espèces sauvages. Après cette comparaison, *Malus sieversii* apparaît bien comme l'espèce sauvage la plus proche génétiquement du pommier domestique (Velasco et al. 2010). Cette découverte ne révélait cependant que le début de l'histoire.

Dès le Néolithique, les anciennes voies commerciales connues sous le nom de routes de la soie ont joué un rôle important dans l'évolution du pommier cultivé (Cornille et al. 2014). Les voyageurs et leurs animaux domestiques ont ainsi véhiculé des pépins de l'Asie Centrale vers la Chine à l'Est, et vers l'Europe à l'Ouest (Harris et al. 2002). Selon Currie, 2000 et Cornille et al. 2012, les pépins de ces espèces asiatiques auraient pu être disséminés aléatoirement le long de ces routes et s'hybrider avec d'autres espèces de pommier sauvages comme : *Malus sylvestris* Mill répandue en Europe, *Malus Baccata* Borkh originaire de Sibérie et d'Asie de l'Est et *Malus orientalis* espèce caucasienne, contribuant ainsi au pool génétique du pommier cultivé (Figure 1). Par la suite, différents croisements interspécifiques avec d'autres espèces du genre *Malus* comme *Malus floribunda* Sieb ont permis d'améliorer les variétés cultivées en introduisant des gènes de résistance à différentes maladies (Harris et al. 2002). D'autres études relativement récentes ont montré que le pommier sauvage européen *M. sylvestris*, en particulier, est considéré comme un contributeur majeur au génome du pommier domestique en Europe occidentale, car il est génétiquement plus proche de cette espèce que de son géniteur d'Asie centrale, *M. sieversii* (Cornille et al. 2014 ; Duan et al. 2017).

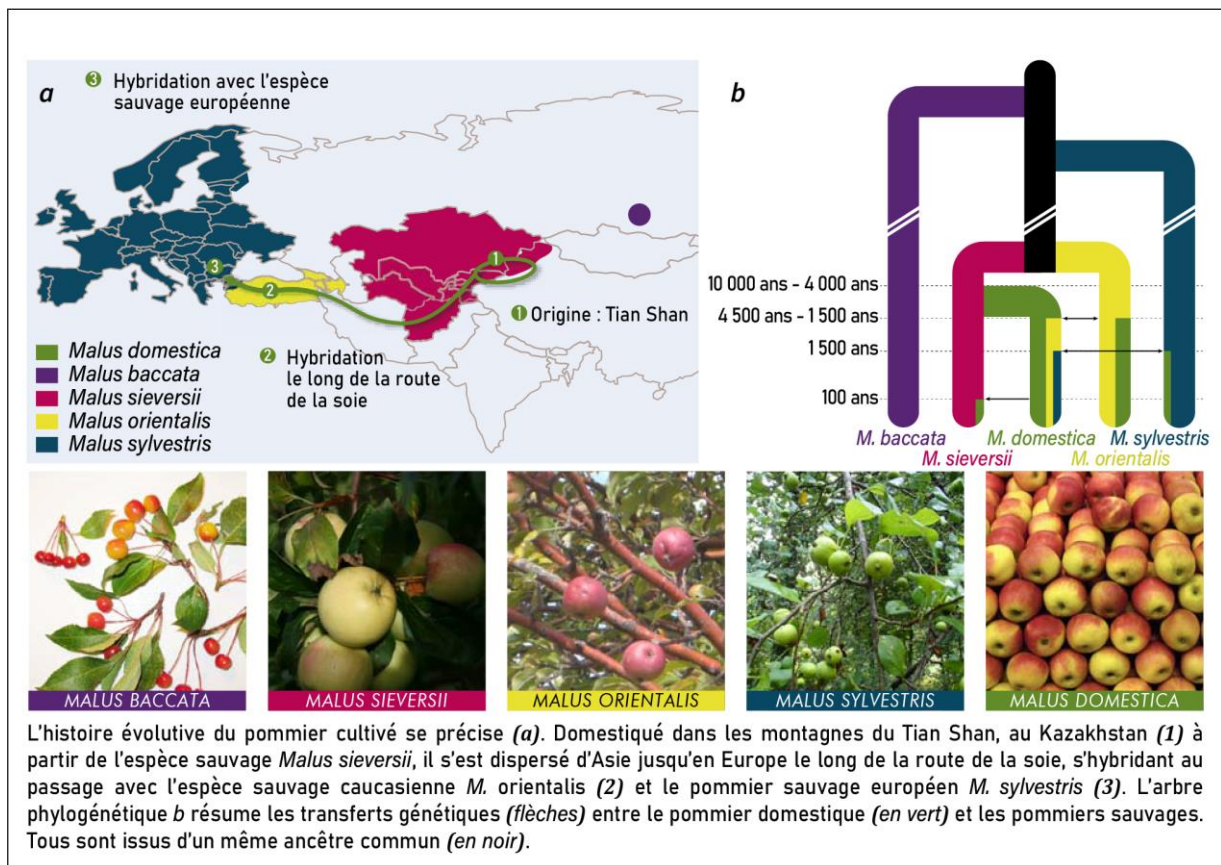


Figure 1: L'histoire évolutive du pommier domestique (Giraud et al. 2014)

II. Classification, description botanique et biologie de la reproduction

II.1 Classification et nomenclature

Le pommier cultivé appartient au genre *Malus* et sa dénomination binomiale *Malus × domestica* Borkh reflète son origine interspécifique et remplace l'ancien nom *M. pumila* Mill ainsi que d'autres noms comme *Pyrus malus* L (OECD, 2019). Le genre *Malus* appartient à la famille des Rosacées qui est traditionnellement divisée en quatre sous-familles sur la base du type de fruit (Luby, 2003 ; Shulaev et al, 2008). Il s'agit de :

- ✓ Rosoïdées : le fruit est un akène
- ✓ Prunoïdées : le fruit est une drupe
- ✓ Spiréoïdées : le fruit est un follicule ou une capsule
- ✓ Maloïdées : le fruit est pomacé

Cette classification systématique des Rosacées a changé au fil des années et l'analyse moléculaire a ajouté au débat les regroupements de sous-familles (Potter et al, 2007).

En utilisant les données de séquences nucléaires et chloroplastiques de 88 genres, la famille des Rosacées a été reclassifiée en trois sous-familles :

- ✓ Rosoïdées : nombre de chromosomes de base (x) = principalement 7
- ✓ Dryadoïdées : $x = 8$ ou plus
- ✓ Spiréoïdées : principalement $x = 8, 9$, et rarement $x = 15$ ou 17

Tous les genres précédemment assignés aux Prunoïdées ($x = 8$) et aux Maloïdées ($x = 17$) ont été inclus dans les Spiréoïdées (Potter et al, 2007)

Selon un autre changement de nomenclature plus récent, les sous-familles des Maloïdées et des Spiréoïdées ont été regroupées en une nouvelle sous-famille, celle des Amygdaloïdées (USDA-ARS, 2018). D'après cette dernière classification de la famille des Rosacées, le pommier est classé comme suit :

Famille : Rosacées
Sous-famille :Amygdaloïdées
Tribu:Malées
Sous-tribu :Malinées
Genre:Malus Mill
Section :Malus
Espèce :*Malus domestica* Borkh.

Bien que la définition traditionnelle des quatre principales sous-familles de rosacées puisse s'effondrer d'un point de vue taxonomique, ce regroupement reste d'une grande utilité de point de vue économique et horticole ; il est encore couramment utilisé dans la littérature (OECD, 2019).

II.2 Description botanique

Le pommier cultivé (*M. domestica*) est un arbre de vigueur moyenne, ramifié, avec un seul tronc et une canopée largement étalée. Il mesure généralement de 2 à 10 m de haut (en culture, la taille et la forme des arbres dépendent fortement du porte-greffe et du système de plantation). Les jeunes tiges et rameaux sont un peu tomenteux, tandis que les branches les plus âgées sont glabres (Bailey et Bailey, 1976 ; Webster, 2005). Ils portent des bourgeons qui peuvent être végétatifs, dont la croissance donne une pousse végétative ou des bourgeons floraux, dont la croissance donne une inflorescence qui peut ultérieurement porter des fruits (Massonnet, 2004). Les feuilles sont caduques, vert foncé, de forme ovale simple avec un bord dentelé et disposées en alternance. Elles mesurent généralement 4-13 cm de long et 3-7

cm de large, avec des bords irrégulièrement dentelés, et généralement poilues en dessous (Webster, 2005 ; Rieger, 2006; Figure 2).

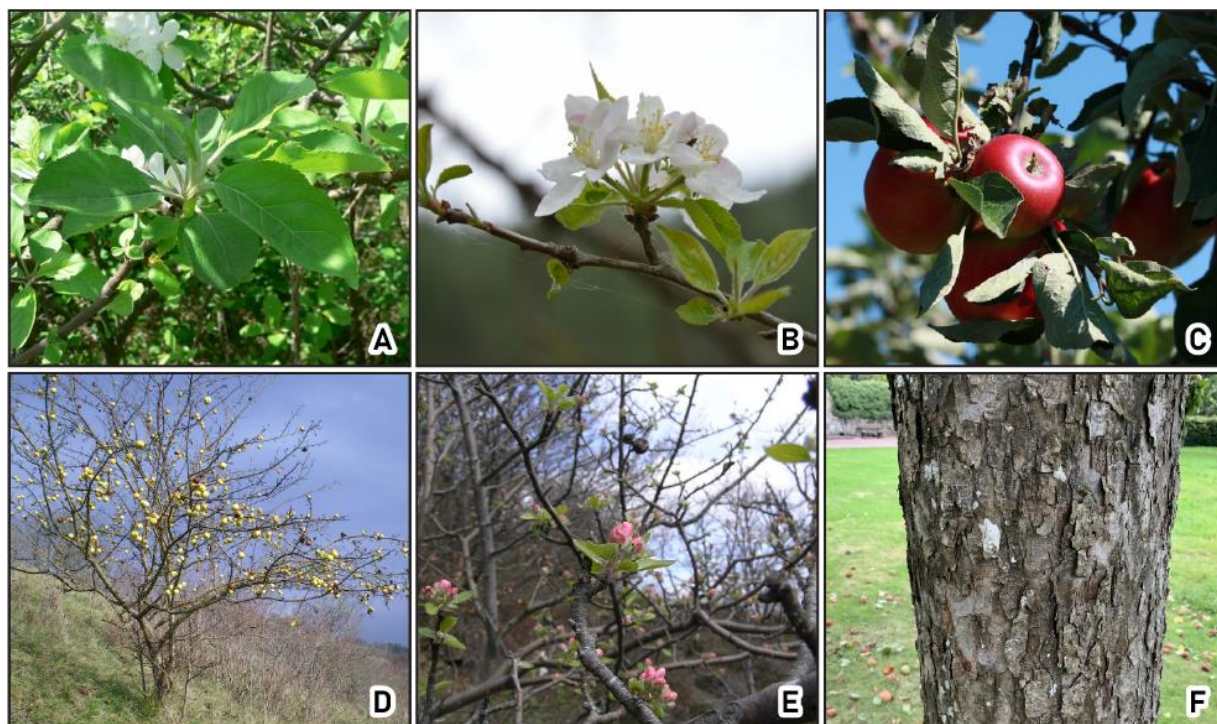


Figure 2: Différentes parties du pommier (*Malus x domestica* Borkh.). (A): feuilles; (B): Inflorescence; (C): Fruits; (D): Arbre; (E): Rameaux; (F): Écorce. Source : tela-botanica.org.

Les bourgeons sont de couleur brun violacé, ovoïdes et densément poilus. Les bourgeons donnent naissance soit à des pousses/feuilles (bourgeons végétatifs) soit à des fleurs (bourgeons floraux). Ces derniers sont plus grands et plus dodus que les bourgeons de croissance et ont une surface duveteuse.

Les fleurs du pommier sont hermaphrodites, et la reproduction de l'espèce est assurée avec une allogamie prédominante (Massonnet, 2004). L'inflorescence du pommier est un corymbe à floraison centrifuge. Chaque fleur (diamètre de 3-4 cm) a cinq sépales, cinq pétales variant du blanc au rose, et environ 20 étamines avec des anthères jaunes en trois verticilles (10+5+5). Le pistil est composé d'un stigmate et de cinq styles réunis à la base qui sont légèrement plus longs que l'étamine (Jackson, 2003 ; Hancock et al., 2008). Quant à l'ovaire, il est inférieur, placé sous les sépales, les pétales et les étamines; il comprend 5 carpelles infères soudés renfermant chacun 2 ovules (Brown, 1975). D'autre part, les fleurs de même bouton ne s'épanouissent pas en même temps, la floraison débute par la fleur centrale du bouquet, puis les autres fleurs s'ouvrent successivement et la floraison dure de 10 à 15 jours (Chenafi, 2017).

Les anthères libèrent un pollen lisse, peu adapté au transport par le vent du fait de son poids (diamètre entre 30 à 36 μm) (Massonnet, 2004). Le pédoncule et le calice sont généralement laineux, et le calice est persistant dans le fruit (Webster, 2005).

Quant au fruit, la pomme est charnue, de forme ellipsoïde à obovoïde, indentée à la base et à l'apex, à pulpe homogène intermédiaire entre une drupe et une baie (Kebe, 2014). Les fruits ont généralement un diamètre supérieur à 5 cm et pèsent de 150 à 350 grammes (Rieger, 2006). Elles varient en couleur et peuvent être uniformément rouges, verts, jaunes ou bicolores rayés ou rougis sur un fond jaune ou vert. Chaque fruit contient un cortex de chair (comestible) entre la peau et la ligne du noyau. Le noyau central possède une moelle charnue et une capsule papillaire composée de cinq carpelles soudés. Chaque carpelle contient généralement deux graines qui sont lisses, brillantes et de couleur marron (Jackson, 2003 ; Rieger, 2006). Trois structures se distinguent dans le fruit au niveau tissulaire : L'épiderme (peau), le mésocarpe ou parenchyme (chair) et l'endocarpe (zone corticale contenant les pépins, aussi appelée le trognon). Le mésocarpe occupe la majeure partie du fruit, c'est le tissu le plus consommé (Figure 3 ; Verdu, 2013).

Concernant les racines de l'arbre, elles consistent en une couche horizontale de racines permanentes, épaissies et étalées, situées à moins de 50 cm de la surface, d'où partent de nombreuses racines verticales qui descendent jusqu'à la couche imperméable ou à la nappe phréatique (Jackson, 2003).

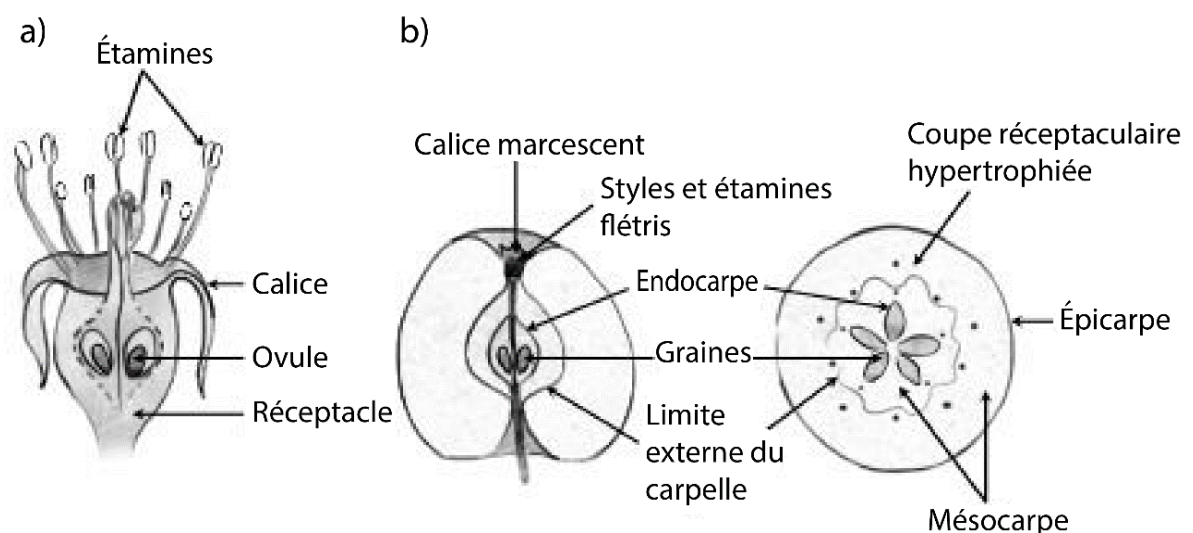


Figure 3: Formation du fruit chez le Pommier, (a): fleur flétrie en coupe longitudinale, (b): fruit en coupe longitudinale et en coupe transversale.

II.3 Biologie de la reproduction

M. domestica se reproduit naturellement par la graine. La plupart des cultivars dépendent de la pollinisation pour la production de graines, mais certains peuvent produire des graines sans qu'il y ait fécondation (graines apomictiques) (Westwood, 1993).

La majorité des cultivars ne peuvent pas s'autopolliniser, en raison d'un mécanisme d'auto-incompatibilité gamétophytique faisant appel à un gène multiallélique du locus S, le gène S-RNase (Sassa et al, 1994). À cause de cette auto-incompatibilité, la plupart des cultivars présentent un taux élevé d'hétérozygotie. Lorsqu'ils se reproduisent par la graine, leurs caractères ne sont donc pas stables ; ils présentent une très grande variabilité et produisent généralement des fruits dont la taille, l'aspect et la qualité sont médiocres (Webster et Wertheim, 2003). Les gènes d'incompatibilité des différents cultivars sont suffisamment différents pour que la quasi-totalité des cultivars puissent se féconder entre eux. De nombreuses études ont été réalisées dans ce sens, et des listes de compatibilité sont disponibles (Kemp, 1996). Il faut consacrer environ 10 % d'un verger à des cultivars pollinisateurs pour assurer une production stable. On peut utiliser, comme pollinisateur, un autre cultivar de pommier compatible, ou encore un cultivar de pometier spécialisé (Maggs et al. 1971 ; Westwood, 1993).

La pollinisation des fleurs du *M. domestica* est essentiellement assurée par les insectes (généralement par les abeilles, et dans une moindre mesure, certains diptères). Les grains de pollen mûrs comportent trois sillons germinaux et présentent des plis ou des rides qui les rendent rugueux (Pratt, 1988). Comme ces grains sont lourds et de grande taille, il y a très peu de pollinisation par le vent.

La floraison a lieu au début du printemps ; mais de nombreux facteurs biotiques (phytohormones endogènes, charge fruitière de l'année précédente, pathogènes et autres organismes nuisibles) et abiotiques (lumière, stress hydrique, nutriments, température et substances chimiques exogènes) peuvent avoir une incidence sur la floraison, tout comme les pratiques culturales utilisées, notamment le greffage, la taille, la pratique d'incisions et/ou le garrottage (Jackson, 2003). La période de floraison durant laquelle du pollen viable est produit varie selon les conditions météorologiques et dure habituellement 7 à 30 jours. La période de pollinisation effective, soit la période durant laquelle l'ovule peut être fécondé moins le temps requis pour le développement du tube pollinique jusqu'à l'ovule, varie de 2 à 9 jours (Pratt, 1988). La longévité des ovules est donc un facteur limitant pour la nouaison (formation de fruits).

Chez la plupart des cultivars, le fruit arrive à maturité 120 à 150 jours après la floraison. (Rieger, 2006). Généralement entre 1 et 5 % environ des fleurs produisent des fruits mûrs. Les autres fleurs n'en produisent pas en raison de l'absence de pollinisation, de la compétition entre fruits ou des pratiques culturales utilisées (éclaircissage visant à augmenter la taille et la qualité des fruits et à empêcher le phénomène d'alternance). L'alternance se produit lorsqu'une récolte abondante inhibe la formation des boutons floraux, ce qui a pour effet de réduire la floraison au cours de l'année suivante (Jackson, 2003).

Dans les zones tempérées du nord, les fruits sont cueillis entre le début d'août et la fin de novembre et peuvent être, selon les cultivars entreposés jusqu'à un an (ACIA, 2014). À maturité, un grand pommier cultivé peut produire 2 000 fruits par année, et peut vivre plus de 50 ans. Il peut donc, en théorie, produire 100 000 fruits au cours de son existence (ACIA, 2014).

III. Cytogénétique et complexité du génome

La majorité des pommiers cultivés sont diploïdes ($2n=34$). Cependant, d'autres niveaux de ploïdie (tri-, tétra-, penta- et hexaploïdie) sont également connus chez cette espèce (Höfer et Meister, 2010). Le nombre de paires de chromosomes des Maloïdées ($n=17$) dont *Malus domestica* fait partie est très élevé en comparaison avec les autres sous familles des Rosacées qui en possèdent généralement entre 7 et 9.

Deux hypothèses qui considèrent les Maloïdées comme des polyploïdes secondaires sont encore à l'étude pour expliquer ce nombre élevé de chromosomes :

La première hypothèse (Allopolyploïdie) considère que les Maloïdées sont issues d'hybridations anciennes entre des espèces des Prunoïdées ($x = 8$) et des Spiréoïdées ($x = 9$), suivies d'un doublement chromosomique. Les hybrides originaux auraient été stériles et ce n'est qu'après le doublement chromosomique qu'ils auraient formé des allopolyploïdes fertiles (Way et al. 1990 ; Luby, 2003 ; Webster, 2005).

La seconde hypothèse (Autopolyploïdie) considère que le génome du pommier est formé, il y a plus de 50 millions d'années d'un événement de duplication à l'échelle du génome d'un Spiréoïdées (très probablement du genre *Gillenia* ($x=9$)) suivie de la perte aneuploïde d'une paire de chromosomes homologues (Velasco et al. 2010).

En 2010 et pour la première fois, Le génome complet de *Malus domestica* a été séquencé à partir de la variété Golden Delicious (Velasco et al. 2010). Pour s'affranchir du haut niveau d'hétérozygotie du génome lors de l'assemblage, d'autres séquençages complets plus récents

en 2017 (à partir d'un haploïde doublé nommé GDDH13, issu de la variété Golden Delicious), en 2019 (à partir de la lignée homozygote dérivée de l'anthere HFTH1 issue de la variété Hanfu) et en 2020 (à partir de la variété commerciale Gala) ont été réalisés et ils ont apporté des améliorations importantes (Figure 4; Daccord et al., 2017; Zhang et al. 2019; Brogгинi et al. 2020). La taille du génome est composé d'environ 651 Mb (Mb= un million de paires de bases) comprenant 42 140 gènes annotés (Daccord et al. 2017).

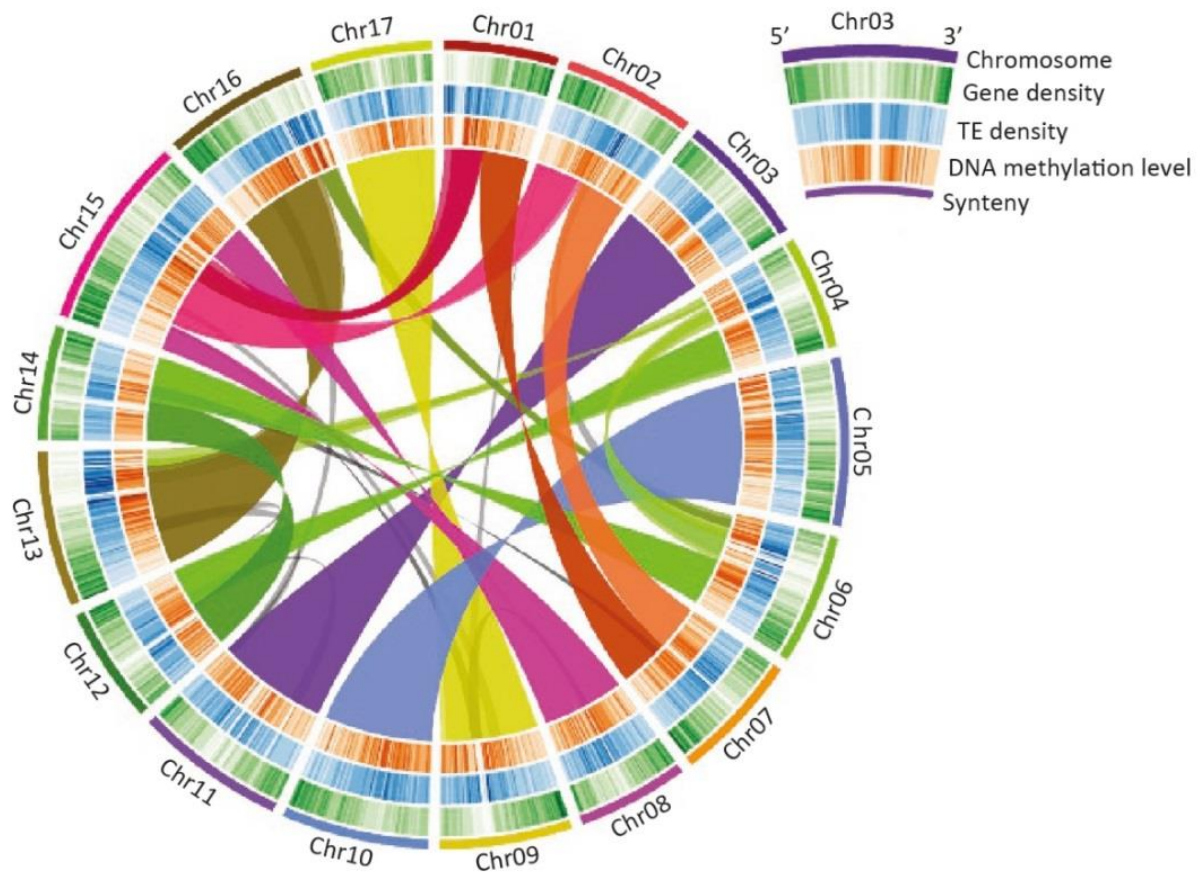


Figure 4: Synthénie et distribution des caractéristiques génomiques et épigénomiques du génome du pommier (Daccord et al. 2017).

Malgré la sélection et le maintien des variétés par greffage, la diversité du génome du pommier domestique est très élevée avec en moyenne un taux d'hétérozygotie $H_e > 0,7$ et une forte occurrence de polymorphismes SNP (4,4 SNPs par kb, Velasco et al. 2010). Le système d'auto-incompatibilité gamétophytique, la diversité des progéniteurs durant la domestication, la durée de la spéciation, la durée de vie des pommiers et la sélection humaine empirique par pollinisation ouverte ont sans doute contribué à conserver des niveaux d'hétérozygotie importants dans l'ensemble de l'espèce (Gross et al. 2014).

La cartographie de liaison génétique (Genetic linkage mapping) a contribué de manière significative à la compréhension actuelle de la structure du génome de *Malus domestica*. Les premières études de liaison génétique sur le pommier ont été réalisées à la fin des années 1980 (Chevreau et Laurens, 1987 ; Manganaris et Alston, 1988). Elles ont été suivies de projets internationaux de cartographie du génome du pommier en Europe (King et al. 1991) et en Nouvelle-Zélande (Gardiner et al. 1996) et la première carte de liaison du génome du pommier a été publiée par Hemmat et al. (1994).

Avec l'utilisation des marqueurs moléculaires SSR (Simple Sequence Repeat) et SNP (Single Nucleotide Polymorphism), le nombre d'études de liaison génétique a augmenté rapidement. Aujourd'hui, plus de 60 cartes de liaison différentes pour le pommier sont disponibles dans la base de données <https://www.rosaceae.org/>. Ces cartes ont été établies en utilisant différents génotypes parentaux, avec différents types de marqueurs d'ADN, et ont été faites pour des caractéristiques allant de la résistance aux maladies à la qualité des fruits, l'arôme, le développement des fleurs et des fruits, le moment de la récolte et les paramètres de croissance des arbres, etc. La plus grande avancée dans ce domaine de recherche est le développement d'outils de génotypage haut débit, en particulier les puces de génotypage SNP 8K (Chagné et al. 2012), 20K (Bianco et al. 2014) et 480K (Bianco et al. 2016).

IV. Exigences pédoclimatiques du pommier

IV.1 Exigences pédologiques

Le pommier tolère une gamme de sols aux caractéristiques physiques et chimiques variables. Cependant, des terrains bien drainés, aérés, légèrement acides (pH 6,5 à 6,7), argilo-limoneux, profonds et riches en matières organiques sont les plus favorables à sa culture. Les sols lourds argileux à forte capacité de rétention en eau doivent être évités autant que les sols à forte teneur en calcaire actif (Dou El_macane et Skiredj, 2003).

IV.2 Exigences climatiques

Les variations climatiques ont une grande influence sur l'activité physiologique du pommier. En effet, les différences annuelles parfois très grandes de rendement et de qualité des fruits sont en grande partie attribuées aux variations du climat par ces différentes composantes, la température, la pluviométrie et le vent.

IV.2.1 Température

Le pommier nécessite une longue période de repos végétatif pour satisfaire ses besoins en froid qui varient, selon les cultivars, de 400 à 1 500 heures de température inférieure à 7,2°C (Gautier, 1987 ; Trillot et al. 2002).

L'arbre peut résister, en repos végétatif à des températures inférieures à -35 °C. Par contre, dès que l'arbre reprend sa croissance végétative, les bourgeons vont montrer une sensibilité croissante aux températures négatives, les pertes sont directes par la chute du rendement ou indirectes par la présence de fruits non-commercialisables.

Les gelées de printemps peuvent causer de graves dommages, surtout pour les cultivars à floraison précoce. Ces dommages ne sont pas toujours visibles immédiatement après le gel (Jackson, 2003 ; Webster et al. 2005).

Les zones les plus favorables à la culture du pommier sont celles qui présentent des hivers froids et des étés modérément chauds et relativement humides (Oukabli, 2012). Des températures de 21 à 26°C sont les plus favorables à l'activité des abeilles au cours de la pollinisation (Dou El macane et Skiredj, 2003). Pendant la floraison, une température minimale de 10°C est nécessaire pour une germination efficace du pollen. Lorsque la température atteint 20°C, le taux de germination du pollen (Yoder et al. 2009 ; Abrol, 2012) et la croissance du tube pollinique augmentent en donnant de plus grandes chances à une fécondation réussite (Jefferies et Brain, 1984).

IV.2.2 Pluviométrie

La pluviométrie moyenne des régions favorables à la culture du pommier est de 600 à 700 mm de précipitations par an (Bretaudeau, 1979). De débourrement à la chute des feuilles, le pommier consomme environ 6000 m³ d'eau par ha par an et les plus forts besoins se font sentir en Juillet et en Août (Gautier, 1987). La pluie pendant la période de floraison peut avoir un impact négatif sur l'activité des pollinisateurs, ce qui réduit le transfert de pollen (Abrol, 2012). Une autre possibilité est que la pluie inhibe la germination et la croissance du pollen sur le stigmate (AHDB, 2017).

IV.2.3 Vent

Le vent peut avoir des influences négatives sur le pommier. Le vent violent brise les branches et provoque la chute des fruits et/ou des fleurs. De même, il présente un obstacle à l'action pollinisatrice des insectes (Oukabli, 2012). A partir des vitesses de vent de 15 km/h, les abeilles domestiques ne volent pas et la quantité limitée de pollen qui aurait été transférée se dessèche rapidement (Webster et al. 2005).

V. Les principales maladies du pommier

A l'instar des espèces fruitières cultivées, le pommier est attaqué par différentes maladies et insectes (Figure 5). On peut citer les champignons, les bactéries, les virus, les mycoplasmes, les pucerons et les nématodes (Blommers, 1994; Janick et Moore, 1996).



Figure 5: Dégâts des maladies et des ravageurs du pommier. (A): Symptômes de la Tavelure; (B): Dégâts de carpocapse sur une pomme; (C): Colonie de pucerons cendrés sur une pousse de pommier; (D): Symptômes de la Moniliose sur les pommes; (E) Dégâts de pucerons des galles rouges sur feuilles; (F): Fleurs avortées infectées par l'Oïdium du pommier; (G): Colonie active de pucerons lanigères sur des pousses de pommier; (H): Chancre européen sur le tronc d'un jeune pommier.

La plupart des troubles entraînent une perte de rendement important. Ces pertes causées par les différentes maladies peuvent être extrêmement variables en fonction de la vigueur de l'agent pathogène. Certains sont capables de tuer l'arbre entier, d'autres infectent les fruits et les rendre invendables, tandis que d'autres ne peuvent causer que des symptômes mineurs (Ahmadi-Afzadi, 2012).

Les ennemis de pommier les plus fréquentes sont celles de la tavelure, de l'oïdium, des pucerons, du carpocapse, de la cochenille et des acariens (Tableau 1). La lutte contre ces maladies représente une dépense économique annuelle importante pour les agriculteurs dans la plupart des régions productrices de pommes. Le producteur doit lutter contre les maladies comme la tavelure dès le début de la saison, ainsi que contre les maladies d'été et certaines maladies liées à la conservation. Une approche bien intégrée est généralement nécessaire pour réussir la gestion des maladies, par exemple, l'application de fongicides, la sélection de porte-greffes et des variétés résistantes ou tolérantes et la lutte biologique (Jönsson, 2007 ; Dewasish and Amal, 2010).

Tableau 1: Principaux ennemis du pommier (Blommers, 1994; Janick et Moore, 1996).

Groupe	Nom français	Nom scientifique
Insectes		
Lépidoptères	Le carpocapse	<i>Cydia pomonella</i> L.
	La tordeuse orientale	<i>Cydia molesta</i> Busck
	La tordeuse pâle du pommier	<i>Pseudexentera mali</i> Freeman
	La phalène brumeuse	<i>Operophtera brumata</i> L.
	La zeuzère	<i>Zeuzera pyrina</i> L.
	Le cossus gâte-bois	<i>Cossus cossus</i> L.
	La sésie du pommier	<i>Synanthedon myopaeformis</i> Borkh.
	La mineuse du pommier	<i>Phyllonorycter blancardella</i> Fabricius
	Le cémiostome du pommier	<i>Leucoptera malifoliella</i> Costa
Hémiptères	Le puceron cendré du pommier	<i>Dysaphis plantaginea</i> Passerini
	Le puceron vert non migrant du pommier	<i>Aphis pomi</i> De Geer
	Le puceron vert migrant du pommier	<i>Rhopalosiphum insertum</i> Walker
	Le puceron lanigère du pommier	<i>Eriosoma lanigerum</i> Hausmann
	Le puceron des galles rouges	<i>Dysaphis</i> spp.
	La lygide du pommier	<i>Lygidea mendax</i> Reuter
	La punaise terne	<i>Lygus lineolaris</i> Palisot de Beauvois
	La cicadelle blanche du pommier	<i>Typhlocyba pomaria</i> McAtee
	La cochenille ostréiforme	<i>Quadraspidiotus ostraeiformis</i> Curtis
	La cochenille virgule du pommier	<i>Lepidosaphes ulmi</i> L.
Diptères	La mouche de la pomme	<i>Rhagoletis pomonella</i> Walsh
	La cécidomyie des feuilles	<i>Dasyneura mali</i> Kieffer
Coléoptères	L'anthonome du pommier	<i>Anthonomus pomorum</i> L.
Hyménoptères	L'hoplocampe du pommier	<i>Hoplocampa testudinea</i> Klug
Acariens		
	L'acarien rouge	<i>Panonychus ulmi</i> Koch
	L'acarien jaune	<i>Tetranychus urticae</i> Koch
	Le phytopte libre du pommier	<i>Aculus schlechtdali</i> Nalepa
Maladies		
Champignons	La tavelure du pommier	<i>Venturia inaequalis</i> Cooke
	L'oïdium	<i>Podosphaera leucotricha</i> Ell. & Ev.
	Le chancre du collet	<i>Phytophthora cactorum</i> Lebert & Cohn
	La moniliose	<i>Monilia fructigena</i> Aderhold & Ruhl.
	Le chancre européen	<i>Nectria galligena</i> Bresad.
Bactéries	Le feu bactérien	<i>Erwinia amylovora</i> Burrill
	Le flétrissement des bouquets floraux	<i>Pseudomonas syringae</i> Van Hall
Virus	La mosaïque du pommier	Genus: <i>Ilarvirus</i>
Nématodes		
	Le nematode des lésions	<i>Pratylenchus vulnus</i> Allen & Jensen
	Le nématode à galle	<i>Meloidogyne incognita</i> Kofoid & White
	Le nématode dague américain	<i>Xiphinema americanum</i> Cobb

Au Maroc le pommier est sujet à plusieurs attaques de ravageurs qui provoquent des dégâts importants, mais seuls quelques ravageurs, qui sont nuisibles et fréquents occupent une place importante dans le programme phytosanitaire des vergers. Il s'agit du carpocapse, les pucerons (surtout le puceron cendré), les acariens et dans une moindre mesure les cochenilles (Oukabli et al. 2011).

Les producteurs de pommier au Maroc rencontrent de nombreuses difficultés pour lutter contre ces ennemis comme le cas du contrôle du puceron cendré (*Dysaphis plantaginea*, Passerini, 1860) qui montre de plus en plus une résistance accrue vis à vis aux insecticides (Delorme et al. 1999 ; Lešnik et al. 2005 ; Cross et al., 2007). En Effet, il est considéré comme la plus dangereuse espèce de pucerons qui attaquent le pommier (Miñarro et al. 2005). À lui seul, cause plus de dommages que tous les autres pucerons en vergers de pommiers (Forrest et Dixon, 1975).

V.1 Puceron cendré (*Dysaphis Plantaginea*)

V.1.1 Répartition géographique

Le puceron cendré a probablement une origine européenne, mais il est aussi présent en Amérique du Nord, en Afrique du Nord, au Moyen-Orient et en Asie (Blackman et Eastop, 1984; Olvera-Vazquez et al. 2021).

V.1.2 Description et position systématique

Les larves du puceron cendré sont de couleur beige puis deviennent roses et ensuite gris-brun pendant leur développement. Les adultes sont aptères (2 à 3 mm de long) et ils sont généralement recouverts d'une pulvéulence blanchâtre, présentent un corps de forme globuleuse et leurs antennes arrivent jusqu'à la moitié du corps (Station De Recherche Acw, 2006 ; Figure 6).



Figure 6: Description morphologique du Puceron cendré du pommier. (A) : Colonie de pucerons cendrés du Pommier ; (B) : Puceron cendré du pommier ailé ; (C) : Oeufs de pucerons cendrés du pommier.

Les pucerons ailés sont reconnaissables par leur couleur noir brillant avec une tache marron foncé sur l'abdomen et leurs ailes sont environ deux fois plus longues que leur corps. Les œufs, présents uniquement en hiver, ont une forme elliptique. Ils sont noirs brillants et avoisinent le demi-millimètre de longueur. Ils sont habituellement disposés en petits groupes sur les bois de deux à quatre ans, dans les replis d'écorce ou dans les crevasses autour des ramifications et des bourgeons ([Station De Recherche Acw, 2006](#)).

La position systématique de *D. plantaginea* dans la classification est la suivante :

Règne (Kingdom):.....Animalia
 Embranchement (Phylum):.....Arthropoda
 Sous-embranchement (Subphylum):.....Hexapoda
 Classe (Class):.....Insecta
 Sous-classe (Subclass):.....Pterygota
 Ordre (Order):.....Hemiptera
 Sous-ordre (Suborder):.....Homoptera
 Famille (Family):.....Aphididae
 Sous-famille (Subfamily):.....Aphidinae
 Genre (Genus):.....Dysaphis
 Espèce (Species):.....*Dysaphis plantaginea*
 Nom binominal:.....*Dysaphis plantaginea* (Passerini, 1860).

V.1.3 Cycle de vie

Dysaphis plantaginea est une espèce holocyclique (son cycle biologique complet comprenant une reproduction sexuée et plusieurs reproductions asexuées par parthénogénèse) et dioécique (effectue son cycle biologique sur deux plantes hôtes de deux familles botaniques différentes) ([Bonnemaison, 1959](#)). L'hôte primaire de ce ravageur est le pommier *Malus domestica* (Rosacées) et les hôtes secondaires sont les espèces de plantain (*Plantago spp.*), plus particulièrement le plantain lancéolé (*Plantago lanceolata* ; Plantaginacées) ([Figure 7 ; Blommers, 1999](#)).

D. plantaginea passe l'automne et l'hiver sous forme d'œufs en diapause sur l'écorce dans la moitié inférieure de son hôte primaire ([Bonnemaison, 1959](#)). Au début du printemps, peu après le débourrement, les œufs éclosent en donnant naissance à des fondatrices aptères ([Hull and Van-Starner, 1983](#)). Ces fondatrices engendrent par parthénogénèse des individus (femelles) aptères dits virginipares qui se reproduisent par parthénogénèse et dont la descendance est également parthénogénétique ([Lathrop, 1928 ; Bonnemaison, 1959 ; Blommers et al., 2004](#)).

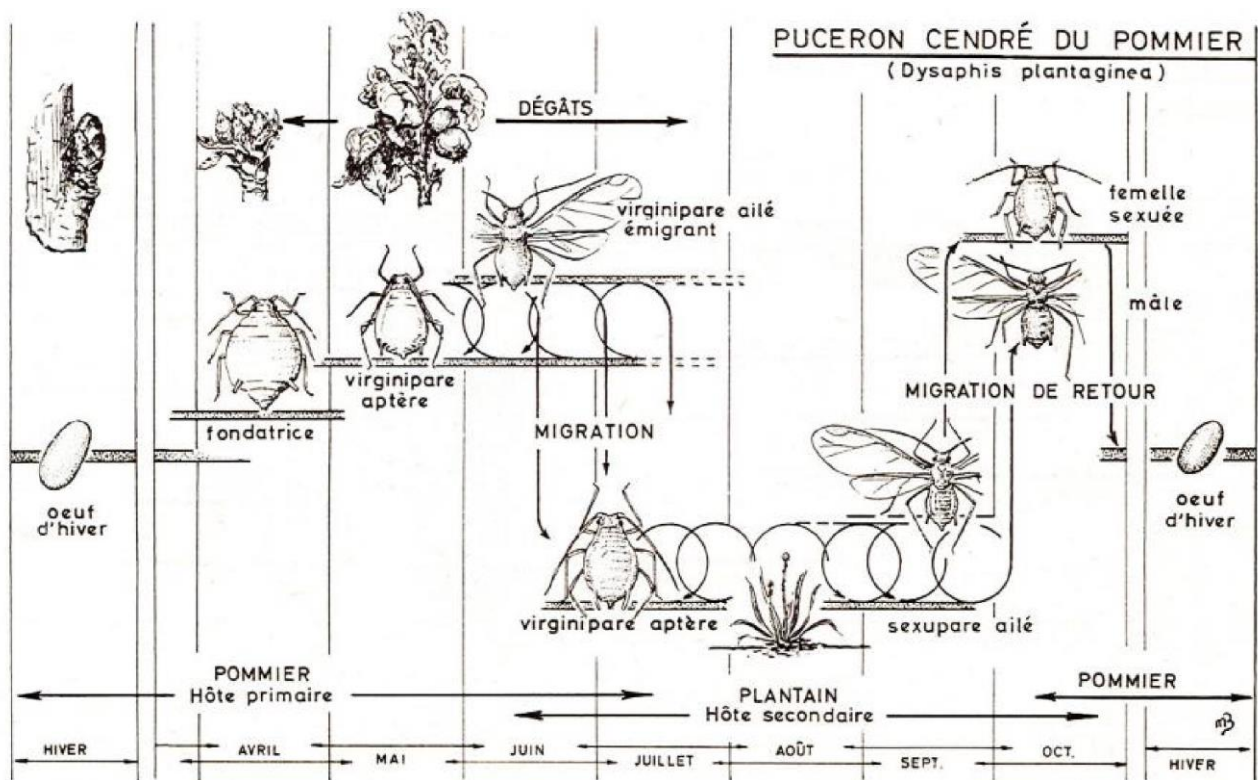


Figure 7: Cycle de développement de *Dysaphis plantaginea* (ACTA, 1977).

À la fin du printemps début d'été, l'évolution de la phénologie du pommier et l'augmentation de la densité des colonies entraînent l'apparition d'une génération de virginipares ailées qui migrent vers les hôtes secondaires (Bonnemaïson, 1959). La parthénogénèse se poursuit sur les hôtes secondaires, via des individus aptères, jusqu'au début de l'automne où le changement de photopériode entraîne l'apparition d'une génération de femelles sexupares qui donnent naissance à des individus sexués (Bonnemaïson, 1959). Cette génération engendre des individus sexués qui sont soit des gynopares ailées soit des andropares qui donneront naissance à des mâles ailés. Les gynopares ailées sont les premières à regagner les pommiers et donnent exclusivement naissance à des femelles sexuées ovipares aptères. Celles-ci seront fécondées par les mâles ailés qui viennent les rejoindre sur le pommier pour réaliser l'unique reproduction sexuée du cycle biologique. Les mâles et les femelles peuvent s'accoupler plusieurs fois. Les femelles fécondées commencent à pondre 24 h après l'accouplement, et pondent jusqu'à 8 œufs avec une moyenne de 4.3 œufs qui assureront l'hivernation de l'espèce sur l'hôte primaire.

L'alternance d'hôte au cours du cycle biologique est considérée comme une stratégie d'évitement des ennemis naturels (Bonnemaïson, 1959).

V.1.4 Dégâts

D. plantaginea fait partie des ravageurs les plus néfastes en pomiculture. En absence d'un contrôle efficace, ce puceron rendre entre 20 et 40 % (Bloomers et al. 2004), voire jusqu'à 80 % dans les cas extrêmes (Qubbaj et al. 2005) des fruits récoltés non commercialisables.

Comme tous les pucerons *D. plantaginea*, est exclusivement phytophage. Il se nourrit de la sève élaborée des plantes hôtes grâce à son appareil buccal de type piqueur-suceur composé de styles perforants, longs et souples, coulisant dans un rostre (Hullé et al. 1998). Ces pièces buccales très sophistiquées, permettent aux pucerons d'effectuer des piqûres localisées dans les plantes et d'atteindre les faisceaux cribro-vasculaires du phloème, où ils prélèveront de la sève élaborée (Sauvion, 1995). Sur le pommier ce comportement alimentaire provoque de dégâts à la fois directs et indirects visibles sur différents organes (Figure 8) et ont des répercussions à plus ou moins longs termes. En effet, le puceron cendré provoque un enroulement et des déformations foliaires (toujours dirigés vers la face inférieure de la feuille où les pucerons sont principalement présents) associés à un jaunissement ou une dépigmentation plus ou moins marquée (Bonnemaison, 1959 ; Forrest et Dixon, 1975 ; Forrest, 1987).

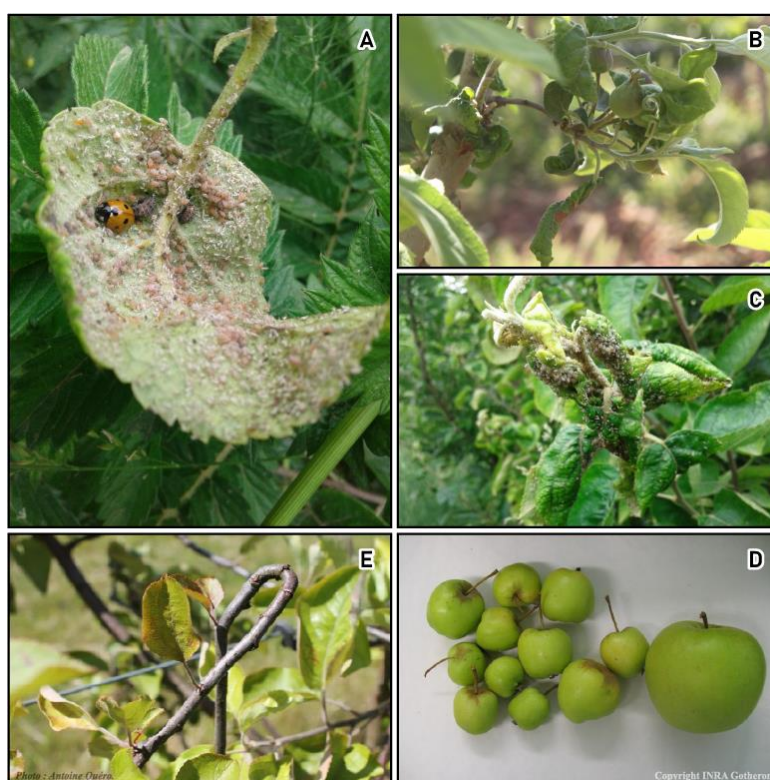


Figure 8: Symptômes et dégâts causés par le puceron cendré du pommier sur les différentes parties de l'arbre. (A, B, C) : les feuilles et jeunes pousses ; (D) : les fruits ; (E) : les jeunes rameaux.

Selon Varn (1987), *D. plantaginea* réduit la photosynthèse et la teneur des feuilles en chlorophylle de 50 et 25%, respectivement. Les fortes attaques peuvent même entraîner une chute prématurée des feuilles. La salive injectée lors des piqûres de *D. plantaginea* provoque des pseudo-galles et déformant ainsi les jeunes branches (Forrest et Dixon, 1975 ; Forrest, 1987). En plus, Les pucerons libèrent via leurs salives des composés chimiques au sein de la plante qui altèrent la cicatrisation, les voies de signalisation des défenses et l'émission de composés volatils (Walling 2008). D'autre part, le déficit de la sève phloémienne (riche en acides aminés essentiels à la plante) prélevé par les pucerons contraint la croissance et le développement des pousses (Bassino, 1982 ; Miles, 1989 ; Wellings et al. 1989). Sur les jeunes fruits, les piqûres entraînent une déformation des pommes et un arrêt de leur développement, ce qui les rend malformés, malingres et sans valeur commerciale (Cruz De Boelpaep et al. 1987 ; De Berardinis et al. 1994 ; Hemptinne et al. 1995 ; Wilkaniec et Trzcinski, 1997 ; Harvey et al. 2003 ; Graf et al. 2006). De plus, si des pucerons se nourrissent directement du fruit, des taches rougeâtres sont visibles en surface et le fruit attaqué pourrira plus rapidement (Alford, 2007).

La présence de fortes populations de pucerons est accompagnée de la sécrétion du miellat (produit non assimilé ou transformé excrétée par l'anus de l'insecte sur la plante). Ce miellat, non toxique en lui-même, peut soit agir directement en occultant les stomates, soit lorsqu'il est trop abondant, induit à la surface des feuilles une pression osmotique ce qui créait un appel d'eau à travers la membrane de la feuille. L'eau, ainsi soutirée de la plante, s'évapore très facilement, et le miellat agit alors comme produit déshydratant, rapidement mortel dans des conditions favorisant l'évaporation (Comeau, 1992). Le miellat constitue aussi un milieu riche pour le développement des champignons saprophytes qui noircissent notamment les parties consommables des plantes. Ce noircissement créé par les spores des champignons est appelé fumagine et rend impropre la commercialisation des fruits (Sauvion, 1995 ; Angeli et Simoni, 2006). La production de miellat est à l'origine de la relation mutualiste entre les pucerons et les fourmis notamment la fourmi noire des jardins *Lasius niger* (Hyménoptère : Formicidae) (Stewart-Jones et al. 2007 ; Miñarro et al. 2010 ; Nagy et al. 2013, 2015). Les fourmis récupèrent le miellat réjeté et en contrepartie, ils réduisent la compétition exercée par les espèces de pucerons non myrmécophiles et protègent les colonies de leurs ennemis naturels (Yao et al. 2000 ; Kaneko 2003). Ces faits suggèrent que les manipulations visant à interrompre la relation entre les fourmis et *D. plantaginea*, peuvent et doivent être considérées comme un élément important dans le développement de futures stratégies de lutte contre *D. plantaginea*.

V.1.5 Les prédateurs naturels de *Dypaphis plantaginea*

En verger de pommier, les prédateurs les plus actifs de *D. plantaginea* sont les Diptères (syrphes, cécidomyies), les Coléoptères (coccinelles, cantharides, staphylinides, carabidés), les Névroptères (chrysopes, hémérobés), les Hétéroptères prédateurs (anthocorides, mirides, nabides), les Dermaptères (forficules) et les araignées (Arachnides ; [Figure 9](#) ; [Dib, 2010](#)).

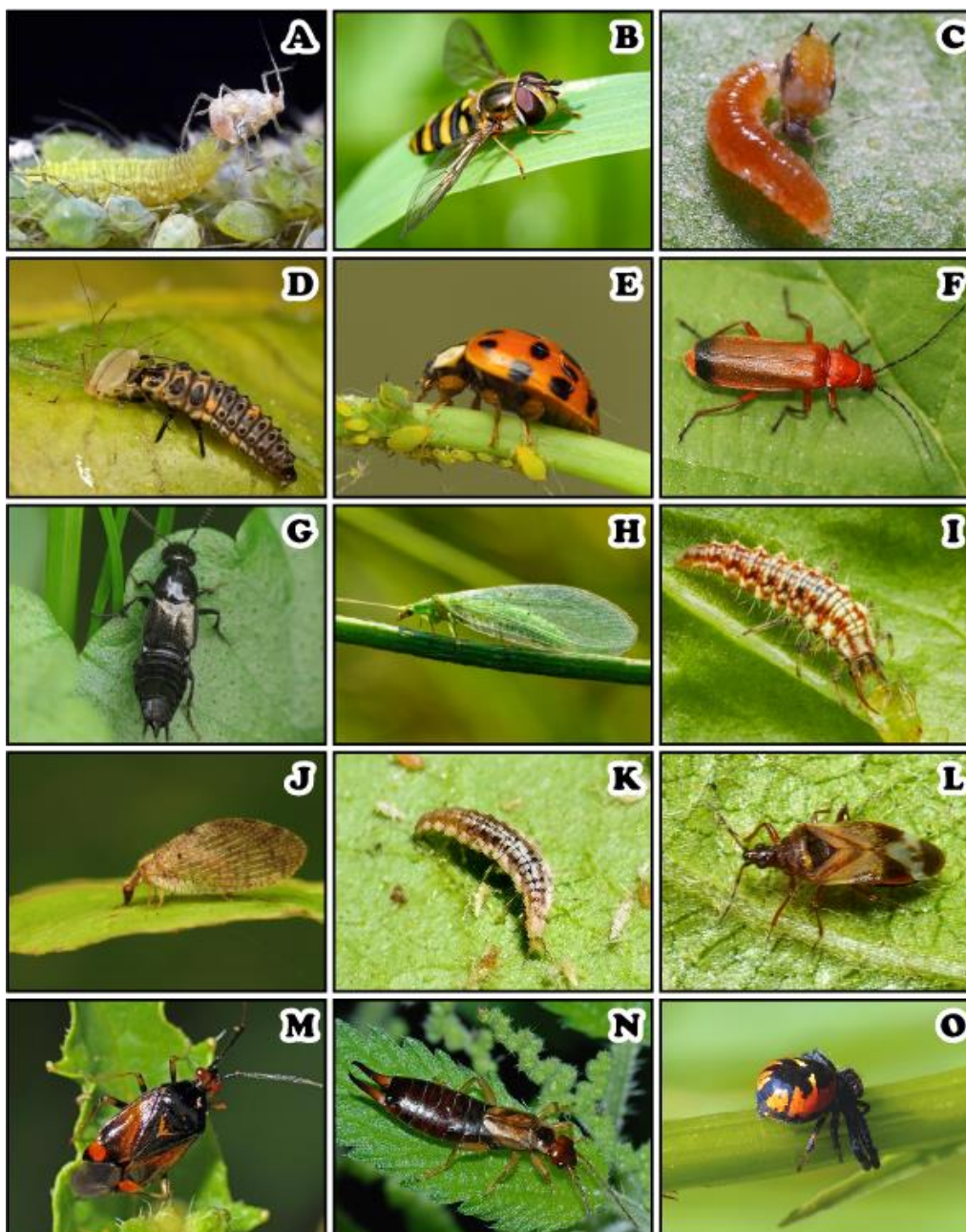


Figure 9: Le cortège de prédateurs observés dans les colonies du puceron : (A) Larve de syrphe, *Episyrphus balteatus*; (B) Adulte de syrphe, *E. balteatus*; (C) Larve de cécidomyie, *Aphidoletes aphidimyza*; (D) Larve de coccinelle, *Harmonia axyridis*; (E) Adulte de coccinelle, *Adalia bipunctata*; (F) Adulte de cantharide, *Rhagonycha fulva*; (G) Adulte de staphylinde, *Philonthus* sp.; (H) Adulte de chrysope, *Chrysoperla* sp.; (I) Larve de chrysope, *Chrysoperla* sp.; (J) Adulte de hémérobe, *Hemerobius* sp.; (K) Larve d'hémérobe, *Hemerobius* sp.; (L) Adulte d'anthocoride, *Anthocoris nemoralis*; (M) Adulte de miride, *Deraeocoris ruber*; (N) Adulte de forficule, *Forficula auricularia*; (O) Adulte d'araignée crabe, *Synaema globosum*. Source (<http://aramel.free.fr/>).

Vue leur cycle de développement, la majorité des prédateurs à l'exception des syrphes, arrivent dans les colonies de *D. plantaginea* souvent trop tard pour avoir une action efficace (Wyss, 1995 ; Blommers, 1999 ; Wyss et al., 1999a ; Miñarro et al., 2005 ; Brown et Mathews, 2007). En plus, les prédateurs n'exercent pas tous une régulation biologique pendant l'intégralité de leur cycle de développement. Pour certaines familles (syrphes, cécidomyies), seule la larve est prédatrice, tandis que pour d'autres (coccinelles, staphylins), la larve et l'imago sont tous les deux prédateurs.

V.1.6 Méthodes de lutte

Divers moyens et techniques ont été utilisés et testés pour lutter contre le puceron cendré du pommier. On peut citer :

➤ **Les produits phytosanitaires :**

Les insecticides restent un moyen très efficace de contrôle du puceron cendré (Simon et al. 2010) mais leurs utilisations deviennent de plus en plus restreintes. Par exemple, en France, le Plan Ecophyto-II lancé par le gouvernement prévoit de diminuer l'utilisation des produits phytosanitaires de 50 % d'ici 2025 (<https://www.inrae.fr>).

➤ **La modification de l'appétence des feuilles par l'application d'argile calcinée :**

Cette technique consiste à pulvériser sur les arbres en automne, une fine couche de kaoline calcinée (argile calcinée) pour créer une barrière physique efficace (une couche protectrice d'argile sur les feuilles de pommiers) pendant toute la période de migration de retour des pucerons. Cette technique réduirait considérablement (moins 50 %) les populations de pucerons cendrés au printemps suivant (Romet, 2004).

➤ **Le choix variétal :**

Toutes les variétés de pommiers n'ont pas la même sensibilité au puceron cendré. En effet, les variétés tardives ont tendance à être plus tolérantes aux attaques. Sur ces variétés, on observe une plus forte mortalité chez les fondatrices ce qui peut être expliqué par le décalage temporel entre l'éclosion des œufs des pucerons cendrés et le débourrement des arbres (Miñarro et Dapena, 2007). Des variétés tolérantes comme Florina (tableau 2) ne subissent pratiquement aucune perte suite aux attaques de *D. plantaginea* (Dib, 2010). Mais à l'instar des nombreuses variétés de pommes résistantes à la tavelure (qui représentent moins de 2 % des surfaces cultivées en pomme en France), leur développement est freiné par l'accès au marché, qui reste le premier critère de choix des arboriculteurs (Dib, 2010).

Tableau 2: La sensibilité d'une liste non exhaustive de variétés de pommiers au puceron cendré (Dib, 2010). S =Sensible, M = Moyennement sensible, T = Tolérante.

Variété	Sensibilité	Variété	Sensibilité
Aivanija	T	Jonagold	S
Bell Golden	T	Jonathan	M
Blanquina	M	Kovelit	M
Boskoop	M	Liberty	M
Bramley	S	Limón Montés	T
Chadel	M	Melrose	S
Charden	M	Mollie's Delicious	T
Collaos	M	Morspur Golden Delicious	M
Coloradona	S	Mutsu	M
Cooper Sel.4	M	Oregon Spur	T
Dayton	M	Perico	M
De la Riega	M	Pink Lady	S
Durona Tresali	M	Prima	M
Egremont Russet	S	Primrouge	S
Ernestina	S	Priscilla	M
Fiesta	T	Raxao	T
Florina	T	Red Delicious	S
Freedom	M	Redfree	S
Fuji	M	Red Spur	S
Gala	S	Regona	T
Galarina	T	Renetta Canada	S
Glockenapfel	S	RubINETTE	M
Gloster	S	Solarina	M
Golden Delicious	S	Starkrimson	M
Golden Lasa	S	Teórica	S
Golden Orange	T	Topaz	S
GoldRush	T	Verdialona	M
Granny Smith	S	Wagener	T
Idared	M	Williams' Pride	M
Jonafree	S	Xuanina	M

➤ **La défoliation automnale :**

Pour perturber le cycle biologique des pucerons, cette technique consiste à défolier intégralement (manuelle ou artificielle) les arbres du pommier à l'automne. Cette défoliation automnale empêche les pucerons de s'alimenter suite à leur vol retour sur le pommier est par conséquence réduirait la ponte et le nombre de population au printemps suivant (Romet, 2004 ; Radoslav et al. 2012). L'efficacité de la méthode de défoliation a permis de valider l'intérêt potentiel d'une intervention automnale, d'autant qu'elle ne semble pas engendrer de modifications physiologiques des arbres. Cependant, la défoliation plusieurs années de suite sur les mêmes arbres n'a jamais réalisé. Donc, nous devons rester prudents, car les conséquences à long terme de cette technique ne sont pas encore connues.

➤ **La gestion de la fertilisation :**

L'utilisation excessive des engrais (surtout les engrais azotés) peut créer une augmentation d'azote dans la sève qui sera favorable à une multiplication rapide de *D. plantaginea*. En effet, ce dernier, comme tous les pucerons, est friand de matières azotées. Il prélève l'azote des feuilles et rejette le sucre sous forme de miellat (Brown, 2008).

➤ **Le contrôle des fourmis :**

En verger, il a été montré que les fourmis, qui viennent se nourrir des miellats rejetés, peuvent contribuer de manière importante au développement des colonies de *D. plantaginea*, et les protègent contre les prédateurs (Stewart-Jones et al., 2008; Miñarro et al. 2010). Donc, l'exclusion des fourmis par l'utilisation de bande collante autour des troncs, ou par l'application de soufre au pied des arbres est hautement souhaitable, même si la question des coûts de traitement reste un facteur déterminant (Nagy et al. 2007; Stewart-Jones et al. 2008). En revanche, ces opérations peuvent influencer négativement la présence de quelques groupes importants d'auxiliaires comme les forficules sur les arbres (Piñol et al. 2009).

➤ **La suppression du plantain (*P. lanceolata*) avoisinant les vergers :**

L'idée c'est qu'en diminuant les populations de plantain avoisinant les vergers, les pucerons cendrés se verraient dépourvus de leur hôte secondaire et par conséquent leur cycle de développement sera interrompu. Deux expériences menées en Espagne (Alins et al. 2007) et au Canada (Brown, 2008) ont montré que la présence ou l'élimination locale du plantain, n'a pas d'influence significative sur l'abondance ou l'effondrement des populations du puceron cendré.

➤ **La lutte biologique :**

Selon Ricard et al. (2012), la régulation naturelle des populations ou le contrôle biologique naturel est issu de l'action conjointe de parasitoïdes, prédateurs et pathogènes qui a pour conséquence de réduire l'effective d'un organisme en dessous d'une valeur seuil qui correspond à une densité au-dessus de laquelle les dégâts provoqués par ces organismes causent des dommages économiquement intolérables.

La majorité des méthodes testées en lutte biologique consiste à des lâchers d'auxiliaires. Ainsi, nous pouvons citer deux expériences:

- La première expérience consiste en un lâcher de larves de Coccinelle *Adalia bipunctata* (20 larves par arbre) dans un verger durant trois années successive

(Deguette et Wateau, 2009). Les résultats obtenus varient d'une année à l'autre. En effet, lors d'une année à faible infestation, les lâchers contrôlèrent efficacement les populations de pucerons cendrés. En revanche, lors d'une année à forte infestation, ce type de lutte n'empêcherait pas le développement des foyers déjà en place (Deguette et Wateau, 2009).

- La deuxième expérience a été réalisée dans le domaine de l'INRA d'Avignon en avril 2009. Celle-ci a consisté en des lâchers de larves de forficules (20 larves par arbre) en verger de pommier. Les résultats obtenus lors de cette expérience n'ont pas permis de conclure sur l'intérêt de cette méthode (Dib, 2010).

➤ **Utilisation des plantes aromatiques :**

Les composés organiques volatiles (COVs) émis par les plantes aromatiques sont particulièrement intéressants dans la lutte contre les pucerons. En effet, ces COVs peuvent avoir un effet direct sur le comportement ou la reproduction des pucerons (Ben Issa et al. 2014 ; Dardouri, 2018) et/ou un effet indirect en favorisant leurs ennemies naturelles (Song et al. 2013). Ainsi, les auxiliaires (prédateurs des pucerons) peuvent être attirés par les COVs et/ou favorisés par la présence de ressources fournies par ces plantes aromatiques (ressources florales, proies alternatives, habitat).

Dans une étude récente, les propriétés répulsives des COVs émis par plusieurs espèces de plantes dites « de services » ont été testées sur le puceron cendré du pommier (Dieudonné et al. 2022). Le dispositif utilisé dans cette étude permet de prendre une mesure rapide et directe du pouvoir répulsif de plantes entières sur une population de pucerons. Les résultats obtenus ont montré que trois espèces sont dotées d'un fort pouvoir répulsif contre *D. plantaginea* (Dieudonné et al. 2022):

- ✓ La menthe poivrée (*Mentha piperita* L.),
- ✓ Le lavandin (*Lavandula × intermedia* Emeric ex Loisel.),
- ✓ Le romarin (*Salvia rosmarinus* Schleid.).

En outre, des tests sur différents chémotypes de romarin ont montré que le pouvoir répulsif pouvait varier au sein d'un même chémotype (Dieudonné et al. 2022).

VI. Multiplication et Sélection du pommier

VI.1 Multiplication du pommier

Le pommier cultivé, comme la majorité des autres arbres fruitiers, est composé d'un porte-greffe et d'un scion ou greffon. Le porte-greffe constitue le système racinaire et une petite proportion de la partie inférieure du tronc, tandis que le scion greffé ou écussonné sur le porte-greffe forme la partie supérieure fructifère (Webster et Wertheim, 2003). Les porte-greffes influencent les performances du scion greffé et peuvent affecter des caractéristiques telles que la résistance à la sécheresse et aux maladies de l'arbre, ainsi que la vigueur, la précocité et la fructification du scion (Webster et Wertheim, 2003). Divers composés, tels que des minéraux, des protéines, des ribonucléoprotéines et des ARN sont transférés entre le porte-greffe et le scion, mais les mécanismes moléculaires de la façon dont le porte-greffe influence les phénotypes du scion ne sont pas encore clarifiés en détail (Figure 10, Kumari et al. 2015). Le scion est la partie de l'arbre dont le nom est reconnu, comme le cultivar « Golden Delicious ».

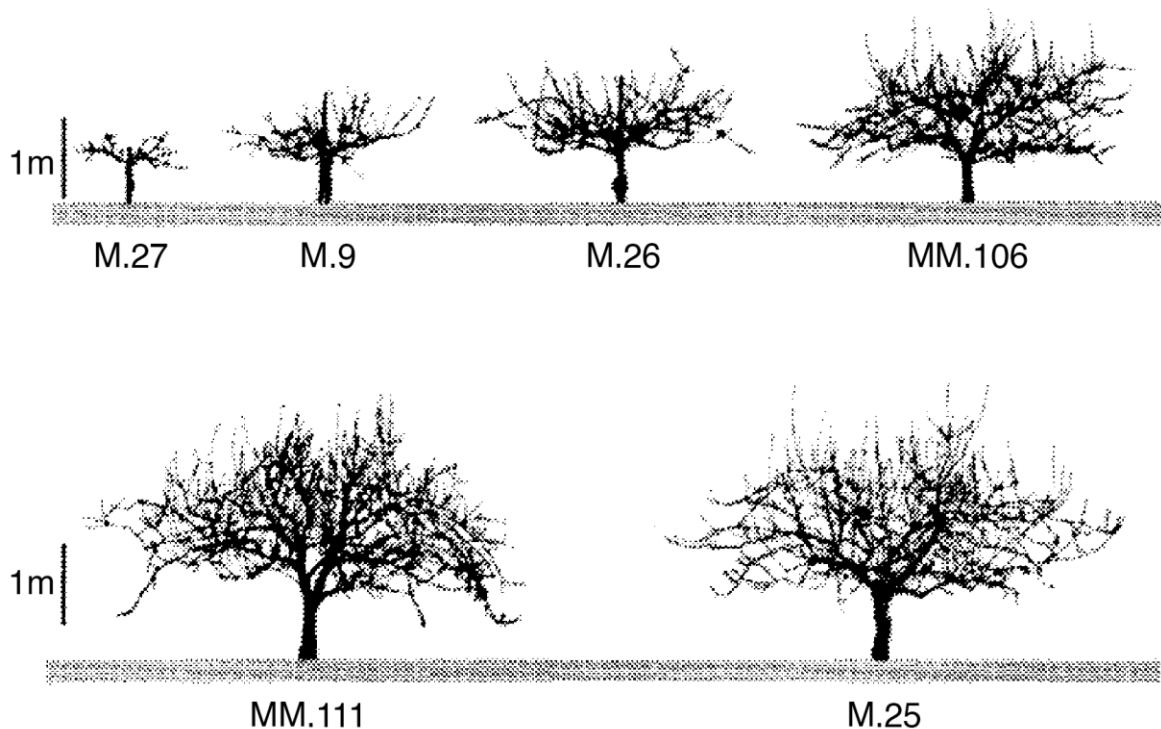


Figure 10: Effet du porte-greffe sur le volume de l'arbre. Silhouettes de pommier de la variété 'Cox's Orange Pippin' greffé sur une gamme de porte-greffes séries "Malling" et "Malling-merton" montrant l'effet de ces derniers sur le développement du scion au bout de plusieurs années (Webster & Wertheim, 2003).

Une fois qu'un cultivar commercial est obtenu, il est toujours propagé de manière asexuée (Webster et Wertheim, 2003). La propagation sexuée n'est pas privilégiée car chaque graine est génétiquement unique et possède des propriétés considérablement différentes des génotypes parentaux, ce qui donnerait une plante qui n'est pas " true-to-type" ou identique. De plus, les cultivars propagés à partir de graines donnent généralement des fruits de taille, d'apparence et de qualité médiocres. Bien que les porte-greffes puissent être propagés par les graines, la propagation des porte-greffes devient de plus en plus asexuée (Webster et al. 2005). Les porte-greffes et les scions sont généralement des espèces de Malus ou des hybrides interspécifiques de Malus.

VI.2 Sélection du pommier

La sélection des pommiers est axée sur le développement de meilleurs cultivars (scions) et porte-greffes. La principale réalisation scientifique en matière de sélection de porte-greffes de pommier a été le développement de porte-greffes nains, qui a commencé au début des années 1920, par la station de recherche East Malling dans le Kent, en Angleterre (Tukey, 1978 ; Mudge et al. 2009). Le porte-greffe M.9, développée par cette station de recherche, et ses sélections améliorées font partie jusqu'à présent des porte-greffes les plus utilisés dans le monde. D'autres efforts de sélection de porte-greffes ont permis, par exemple, de sélectionner des porte-greffes nains tolérants au froid hivernal ou résistants au feu bactérien, au chancre du collet et à d'autres maladies (Cummins et Aldwinckle, 1994).

Quant au Maroc, le porte-greffe le plus utilisé est le MM 106. Il est d'une moyenne vigueur qui s'adapte bien aux sols lourds et profonds et craint la sécheresse mais il est très sensible au phytophthora (Le chancre du collet : Champignon), ce qui limite actuellement son utilisation. D'autres porte-greffes d'introduction récente comme Pajam 1 Lancep, le Pajam 2 Cepiland, le M 9 NAKB et le M 9 EMLA suscitent beaucoup d'intérêt à cause de leur effet nanifiant et de mise à fruit rapide (Oukabli, 2012).

Dans la sélection des scions de pommiers, l'objectif principal est d'obtenir une combinaison de haute qualité de fruit (taille du fruit, texture, couleur du fruit, saveur et arôme) avec une résistance aux maladies et aux parasites. En outre, d'autres caractéristiques sont considérées comme importantes dans la sélection de nouveaux cultivars (scions), comme un rendement élevé et régulier, le pourcentage de fruits commercialisables, l'adaptation aux conditions climatiques et la capacité de stockage des fruits. Une faible teneur en allergènes ou une teneur élevée en flavonoïdes, une chair de fruit rouge ou une faible réfrigération sont des objectifs mineurs dans la sélection de pommiers (Peil et al. 2011).

Plusieurs caractéristiques de *M. domestica* empêchent une amélioration génétique rapide des cultivars, notamment : une longue période juvénile, l'auto-incompatibilité, le niveau élevé d'hétérozygotie résultant de la pollinisation croisée nécessaire et la dépression de consanguinité (Brown et Maloney, 2003).

Les programmes de sélection suivent, en général, une stratégie commune, qui établit une série de rétrocroisements entre des hybrides présentant un caractère d'intérêt et des cultivars commerciaux sensibles. Habituellement, la source des gènes de résistance provient de parents sauvages de pommier sexuellement compatibles. La méthode de sélection traditionnelle la plus couramment utilisée est un rétrocroisement modifié, où un parent récurrent différent est utilisé à chaque génération de rétrocroisement pour contourner l'auto-incompatibilité. Ce processus est laborieux et prend beaucoup de temps car il faut plusieurs générations pour obtenir des lignées quasi-isogéniques de grande valeur commerciale exprimant le caractère souhaité. En général, le processus prend plus de 20 ans. Par exemple, il a fallu plusieurs décennies pour réussir à introduire un trait de résistance à la tavelure du pommier dans un cultivar commercial (Gessler et Pertot, 2012).

Les progrès récents des techniques génomiques permettent d'accélérer le développement de cultivars de pommier. En effet, les programmes de sélection modernes utilisant des outils moléculaires ont montré qu'il est possible de faire un dépistage précoce (généralement au stade de semis) de certains caractères hérités, comme la résistance à la tavelure sans qu'il soit nécessaire de phénotyper les plantes elles-mêmes. Deux importants programmes de recherche internationaux, *ROSBREED* (www.rosbreed.org) aux États-Unis et *FruitBreedomics* (www.fruitbreedomics.com) en Europe, ont fourni des outils moléculaires pour le criblage et ils ont développé un matériel de pré-sélection.

Bien que les marqueurs SSR soient encore utilisés pour la sélection des caractères agronomiques, le développement des marqueurs SNP (Jansch et al. 2015) et la mise en place des puces de génotypage SNP 480k pour le pommier (Bianco et al. 2016), peuvent sans doute améliorer la sélection génomique des caractères chez cette espèce. D'autre part, les avancées technologiques en matière d'ADN recombinant peuvent aussi permettre de remédier à certains problèmes liés à la sélection (la longue période juvénile, l'auto-incompatibilité gamétophytique, la forte hétérozygotie, le temps consacré à l'évaluation phénotypique et le manque de précision).

Quant à la transformation génétique chez le pommier, la principale caractéristique visée est la résistance aux maladies et aux parasites (en particulier la résistance fongique à la tavelure et à l'oïdium et la résistance à la brûlure bactérienne), alors que les caractéristiques sur lesquelles

des recherches ont été menées sont : la tolérance au stress, la résistance aux herbicides, l'auto-incompatibilité, la maturation des fruits et autres caractéristiques des fruits, les allergènes, la précocité et l'induction florale, la nanification et la capacité d'enracinement dans les génotypes de porte-greffe (OECD, 2019).

Des initiatives, telles que TranscrApple (<http://www.transcrapple.com/en/en/home/>), peuvent augmenter la quantité des gènes disponibles pour la transformation. Actuellement, les cultivars de pommier transgéniques sur le marché ou pour lesquelles des recherches sur la biosécurité sont en cours sont résumés ci-dessous selon les traits visés par la transformation :

✓ **Résistance aux maladies :**

Des cultivars de pommes transgéniques résistants à la tavelure ont été obtenus (à l'aide d'Agrobactérium) en transférant un gène de résistance à la tavelure (Rvi6) de *M. floribunda* (une espèce de pommetier qui présente une résistance naturelle à certaines souches du champignon de la tavelure) au cultivar "Gala" (Barbieri et al. 2003 ; Belfanti et al. 2004 ; Silfverberg-Dilworth et al. 2005 ; Malnoy et al. 2008). D'autres recherches ont abouti à la création des premières lignées intragéniques et cisgéniques de pommier (cultivar Gala) résistantes à la tavelure (Joshi et al. 2011 ; Vanblaere et al. 2011, 2014 ; Krens et al. 2015), contenant le gène Rvi6 de *M. floribunda* sous le contrôle du promoteur du gène Rubisco du pommier (*M. domestica*) ou du promoteur Rvi6 natif, respectivement. Ces cultivars ont été plantés dans le cadre d'un essai au champ visant à étudier la résistance à la tavelure dans une situation de verger (Krens et al. 2015). Aussi, le développement de la première pomme cisgénique présentant une résistance accrue au feu bactérien a été signalé (Kost et al. 2015).

✓ **Accélération du cycle de reproduction :**

Les arbres fruitiers ont généralement de longs cycles de reproduction. La réduction de la période juvénile du pommier à une seule année a été obtenue par l'expression constitutive du gène du facteur de transcription MADS4 du bouleau argenté (*Betula pendula* Roth.) dans les cultivars de pommier à floraison précoce 'Pinova' (Flachowsky et al. 2007, 2009, 2011, 2012), 'Gala', 'Mitchgl-Gala' et 'Santana' (Weigl et al. 2015).

✓ **Qualité des fruits :**

Des pommes ont été modifiées à l'aide d'une technique d'extinction des gènes appelée interférence de l'acide ribonucléique (ARNi), afin de réduire la production de polyphénol oxydases (PPO), qui provoque le brunissement de la chair de la pomme lorsqu'elle est tranchée ou mordue (Xu, 2013). Des versions transgéniques des variétés " Golden Delicious ", " Granny Smith " et " Fuji " ont été autorisées à la commercialisation (OCDE, 2019).



Figure 11: Une pomme génétiquement modifiée anti-brunissement de la variété Granny Smith (Artic Granny Smith Vs Granny Smith Normal).

VII. Propriétés nutritionnelles des pommes

La consommation de fruits et légumes est depuis longtemps associée à une bonne santé ; cet effet bénéfique pour la santé est généralement attribué à leurs diverses compositions phytochimiques (Boyer et Liu 2004).

« An apple a day keeps the doctor away », est un vieux proverbe anglais qui témoigne de l'importance nutritionnelle de la pomme dans l'alimentation humaine.

Depuis l'Antiquité, à l'exception des graines, le fruit entier est comestible et utilisé pour faire des confitures et des gâteaux. La pomme est une source riche en glucides facilement assimilables (13,81g/100 g) et elle est également assez riche en calcium (6 mg/100 g), phosphore (11 mg/100 g), et potassium (107 mg/100 g). Elle apporte aussi d'autres éléments nutritionnels comme les fibres, les vitamines (C, B, etc.) et les acides phénoliques (quercitrine, épicatechines, catéchines) (USDA-ARS, 2018). Il existe désormais de nombreuses preuves scientifiques que ces substances bioactives présentes dans la pomme (peau et chair) ont le potentiel d'améliorer la santé humaine.

La première revue scientifique sur les avantages de la consommation de pommes pour la santé, réalisée par Boyer et Liu (2004), présente des études suggérant une liaison entre la consommation de pommes et la diminution du risque de maladies chroniques, dont le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies pulmonaires et le diabète. Plusieurs années plus tard, deux revues actualisées ajoutent d'autres effets bénéfiques de la pomme dans la gestion du poids, la santé intestinale et osseuse, la diminution de la pression artérielle et la prévention

des maladies dégénératives (Hyson, 2011 ; Patocka et al. 2020). En complément de ces revues une autre étude récente a montré que les jus de pomme ont eu un effet protecteur (par le biais d'actions antioxydantes, anti-génotoxiques et régénératives des tissus rénaux) après une intoxication au cadmium chez le rat (Handan, et al. 2020).

Tableau 3: Composition nutritionnelle de la pomme (pour 100 g de parties comestibles ; USDA-ARS, 2018).

Éléments nutritifs	Unité	Quantité	Éléments nutritifs	Unité	Quantité
Eau	G	85.56	Vitamine C	mg	4.6
Energie	kcal	52	Vitamine B1	mg	0.017
Protéine	G	0.26	Vitamine B2	mg	0.026
Carbohydate	G	13.81	Vitamine B3	mg	0.091
Fibre	G	2.4	Vitamin B6	mg	0.041
Sucre totaux	G	10.39	Vitamine B12	µg	3.0
Calcium	Mg	6.0	Vitamin A	IU	54
Fer	Mg	0.12	Vitamine E	mg	0.18
Magnésium	Mg	5.0	Vitamine K	µg	2.2
Phosphore	Mg	11.0	Lipides totaux	g	0.17
Potassium	Mg	107.0	Acide gras saturé	g	0.028
Sodium	Mg	1.0	Acide gras -	g	0.007
Zinc	Mg	0.04	Mono-insaturé		

De même les pommes sont utilisées en médecine traditionnelle pour guérir divers maux, tels que l'asthme, l'acidité, l'arthrite, la diarrhée, la fièvre, l'obésité, les maux de tête, les maux d'estomac, les maladies de peau et les problèmes respiratoires (Lobo et al. 2018). L'utilisation du vinaigre de pomme aide à traiter l'anémie car il contient du fer sous une forme facilement assimilable, ainsi que de la vitamine B12 et de l'acide folique. De plus, le vinaigre de pomme à cidre est efficace contre l'asthme, les calculs rénaux, l'arthrite et les maladies de la peau (Uilltobe, 2020).

Malgré la valeur nutritionnelle riche du pommier qui lui permet d'être recommandé dans le cadre d'un régime alimentaire sain. Les pommes peuvent également être à l'origine des réactions allergiques allant des moyennes au grave dans certains cas (Siekierzynska et al. 2021). L'allergie aux pommes diffère d'un cultivar à l'autre, mais seules quelques variétés ont été étudiées. Les allergies aux fruits comme les pommes sont principalement associées au pollinose (Siekierzynska et al. 2021).

En Europe centrale et du Nord, la sensibilité aux pommes est principalement causée par l'aéroallergène du pollen de bouleau (allergies croisées), tandis que dans la région méditerranéenne de l'Europe, l'allergie aux pommes est principalement associée à des allergies aux pêches (Siekierzynska et al. 2021). Les allergènes contenus dans ce type d'allergie sont similaires dans les pêches et les pommes et les personnes souffrant peuvent également être allergiques à d'autres fruits comme les prunes, les abricots et les cerises.

VIII. Importance économique du pommier

VIII.1 Importance économique du pommier au Monde

La pomme est l'un des premiers fruits à avoir été cueillis par l'homme, et sa domestication a probablement été précédée d'une longue période de plantation involontaire via l'élimination des déchets. Les Grecs et Romains cultivaient des pommes il y a au moins 2500 ans (Hancock et al. 2008). Aujourd'hui, les pommes sont cultivées dans tout le monde tempéré et leur champ d'adaptation s'étend des endroits extrêmement froids comme la Sibérie et le nord de la Chine à des environnements beaucoup plus chauds comme la Colombie et l'Indonésie (Hancock et al. 2008).

La production mondiale de pommes est restée stable pendant une grande période du siècle dernier jusqu'à ce que la Chine commence à développer sa production de pommes dans les années 1990. Aujourd'hui, la pomme est la troisième espèce fruitière la plus cultivée au monde, derrière les agrumes et la banane avec une production mondiale de 86,4 millions de tonnes (FAOSTAT, 2020). La Chine est le plus grand producteur de pommes au monde avec une production de plus de 40,5 millions de tonnes, ce qui est plusieurs fois supérieur à la production des quatre pays les plus proches, à savoir les États-Unis, la Turquie, la Pologne et l'Inde.

Les utilisations de pommier sont principalement centrées sur le fruit, bien que le bois de pommier, apprécié pour sa forte densité et son homogénéité, soit parfois utilisé en ébénisterie, comme le bois de poirier. Le fruit est utilisé pour être consommé frais ou cuit et son jus est utilisé notamment pour faire du cidre. L'un des intérêts principaux de ce fruit par rapport à d'autres fruits comme les pêches, les abricots ou les poires est sa grande capacité de stockage. Un autre atout est que les pommes cultivées sont très diverses, il en existe plus de 6000 variétés qui peuvent varier en taille, en couleur, en goût, en texture, ect (Hancock et al. 2008). De nombreuses localités (pays, régions) ont ainsi des variétés qui y sont considérées comme traditionnelles et locales.

Parmi les 20 premiers pays producteurs de pommes, le Maroc est classé 17ème. Les principaux pays producteurs de pommes et leurs volumes de production sont répertoriés dans le [tableau 4 \(FAOSTAT, 2020\)](#).

Tableau 4: Les 20 premiers pays producteurs de pommes pour l'année 2019-2020.

N°	Pays	Production (T)	Superficie (H)	Rendement (T/H)
1	République populaire de Chine	40501041	1911848	21.18
2	États-Unis d'Amérique	4650684	119504	38.92
3	Turquie	4300486	170903	25.16
4	Pologne	3554300	152000	23.38
5	Inde	2734000	308000	8.88
6	Italie	2462440	54910	44.85
7	Iran	2206723	112270	19.66
8	Fédération de Russie	2040700	215258	9.48
9	France	1619880	50150	32.3
10	Chili	1619575	32314	50.12
11	Ouzbékistan	1148455	109849	10.45
12	Ukraine	1114570	85000	13.11
13	Allemagne	1023320	33980	30.12
14	Afrique du Sud	992975	24353	40.77
15	Brésil	983247	32468	30.28
16	Corée du Nord	807295	73187	11.03
17	Maroc	778866	51871	15.02
18	Japon	720405	35108	20.52
19	Mexique	714203	56706	12.59
20	Égypte	697936	27417	25.46

(T) : Tonnes, (H) : Hectare.

VIII.2 Importance économique du pommier au Maroc

Au Maroc la répartition géographique des plantations du pommier montre que cette espèce a envahi la plupart du territoire marocain avec une superficie plantée de 51871 hectares (ha). Le secteur fournit une production de près de 778866 tonnes, soit l'équivalent d'un rendement moyen de 15.02 tonnes/ ha ([FAOSTAT, 2020](#)). Les superficies récoltées connaissent, en général, une certaine stagnation, sauf dans de nouveaux périmètres de petit et moyen hydraulique comme la vallée d'Aït Bougamaz, Oued Lakhdar dans la province d'Azilal, Aghbala dans la province de Beni-Mellal et la région du Gharb où l'on assiste à une extension des superficies ([Oukabli, 2012](#)). La limitation constatée au niveau des zones traditionnelles de culture est liée à plusieurs contraintes climatiques (rareté de l'eau, grêle, gelée) et commerciales (capacités de stockage limitées, multiplicité des intermédiaires, concurrences avec d'autres fruits comme le melon, la pastèque, la fraise et la pêche). D'autre part, le coût de production particulièrement élevé (environ 2 à 3 DH/kg) lié à la cherté des intrants (produits

phytosanitaires, énergie, ect) est un facteur supplémentaire qui a concouru à la limitation des superficies plantées (Oukabli, 2012).

Après un pic d'importation de pommes enregistré en 2009 et 2010 avec plus de 14 000 tonnes, un recul des quantités importées est observé depuis cette date. En 2013 les importations marocaines de pommes sont estimées à 7200 T, principalement en provenance d'Italie (58%) et de France (17%). En termes de valeur ces importations sont estimées à 43 millions de Dirhams. L'exportation de pommes au Maroc a commencé en 2009 et les quantités exportées sont très faibles. Sont autour de 200 T par an et commercialisées notamment sur le marché français (64 T) et le marché Sénégalais (61 T). La majorité de la production est destinée au marché local (MAPM, 2014).

Selon un scénario tendanciel réalisé par Sellika et al. (2015), le facteur principal d'évolution de la filière entre 2015 et 2025 sera l'augmentation des superficies plantées en axe (reconnue par leurs grandes productivités), qui passerait de 4 400 ha en 2015 à 12 000 ha en 2025. Le même scénario prévoit ainsi que 15 % des quantités de pommes produites en axe soient exportées, c'est-à-dire que l'exportation passera de 200 t en 2013 à 87 000 t/an en 2025 (Sellika et al. 2015).

IX. Ressources génétiques de pommier au Maroc

Le matériel végétal utilisé par les pomiculteurs marocains est constitué principalement de variétés étrangères et la gamme n'a cessé d'évoluer en gardant toujours comme variété de base Golden Delicious et sa pollinisatrice Starking Delicious (Figure 12 ; MAPM, 2014).

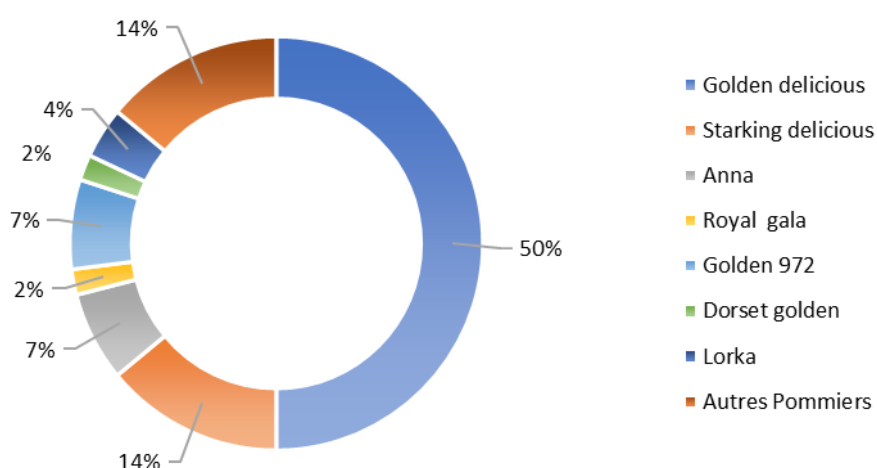


Figure 12: Répartition de la superficie de pommier cultivé par variété au Maroc en 2011-2012 (% de nombre de pieds par Ha), (MAPM, 2014).

Quoique la variété Golden Delicious soit exigeante en froid (au minimum 1000 heures par an), cette variété possède une certaine souplesse d'adaptation lui permettant d'être cultivée dans différentes situations avec cependant des performances inégales. Cette variété est caractérisée par une pomme de belle taille de couleur jaune dorée avec un arôme fruité de banane. Il est auto-fertile, mais pour obtenir un meilleur rendement, elle a besoin d'autres variétés pollinisatrices à proximité comme Starking Delicious, Granny Smith et Melrose. Concernant la variété Starking Delicious, elle est caractérisée par une pomme moyenne à gros calibre, de couleur rouge foncée et de chair ferme et juteuse à saveur douceâtre ; elle n'est pas auto-fertile, et elle nécessite impérativement d'autres variétés pollinisatrices à proximité comme Golden Delicious.

Actuellement, trois produits sont labellisés dans cette filière au Maroc, la Pomme de Midelt, la Pomme d'al'haouz (indication géographique protégée) et la Pomme d'Imilchel (Label agricole ; [MAPM, 2014](#)).

X. Caractéristiques climatiques des zones de production.

X.1 Disponibilités en froid

Les zones favorables à la culture du pommier au Maroc se localisent essentiellement en zones de montagne ([Zguigal et Chahbar, 1993](#); [Figure 9](#)). Dans les autres zones, cette espèce reste malheureusement vulnérable au manque du froid. Ce dernier facteur gêne la dormance des bourgeons en perturbant leur différenciation florale.

X.2 Ressources en eau

Les possibilités d'irrigation, notamment par pompage des eaux souterraines, sont de plus en plus limitées en raison d'une forte pression sur la nappe dont la recharge est insuffisante à cause de la faiblesse des enneigements et des précipitations. Cette situation de manque d'eau est à l'origine de plusieurs arrachages de vergers de pommiers. Il peut devenir, dans les années prochaines, le principal facteur du changement du paysage arboricole au niveau national ([Oukabli et al. 2011](#)).

X.3 Grêle

Si les zones de montagne réunissent des conditions favorables à la culture du pommier, elles restent cependant, menacées par la grêle qui peut survenir en période de grossissement des fruits (entre mai et août). Les dégâts occasionnés par ce fléau climatique peuvent être grave sur les fruits et la production peuvent être complètement détruite. À l'échelle parcellaire,

la protection par le biais de filets paragrêles est le moyen de lutte le plus efficace mais elle reste onéreuse bien que l'état subventionne leur installation (Oukabli et al. 2011).

Des statistiques nationales ont montré que le nombre maximum de jours de grêle enregistré de mars à octobre sur une période de 20 ans est de 7 et le nombre de jours d'orage se situe dans un intervalle variant entre 12 et 35 (Oukabli et al. 2011). La majorité des dégâts annuels, causée dans une région donnée, est souvent le résultat d'une seule situation particulièrement violente coïncidant avec la phase sensible de la culture.

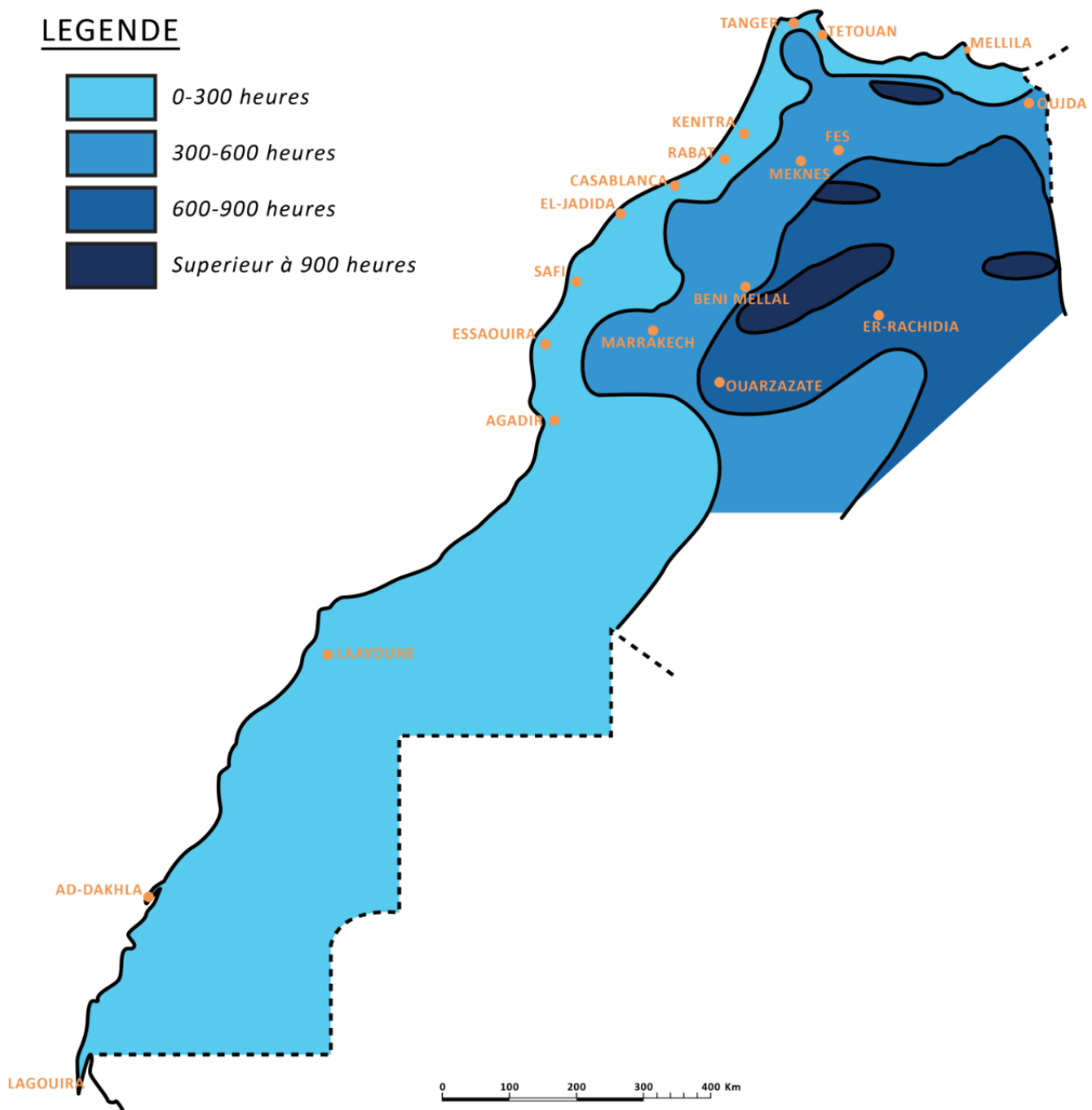


Figure 13: Répartition régionale du nombre des heures de température inférieure à 7,2C°.

X.4 Gelée

La gelée est un autre aléa climatique à craindre au stade floraison, à la nouaison et même en début du grossissement des fruits (Avril et début mai). Les dégâts causés peuvent concerner la destruction totale des fleurs et des fruits (Oukabli et al. 2011). La gelée survient par temps sec, nuit claire et vent très faible. Si les prévisions de la gelée sont possibles, un moyen de lutte efficient et peu coûteux n'a pas encore vu le jour.

Le procédé par brassage de l'air à l'aide d'hélices associé à des chaufferettes permet de réduire les dégâts si le démarrage de cet outil se fait suffisamment à l'avance. Cependant, Plusieurs producteurs continuent à utiliser un écran de fumée, en brûlant des pneus, du fumier pailleux ou des bottes de paille, comme moyen de lutte contre cette contrainte naturelle; ce procédé polluant a une efficacité limitée (Oukabli et al. 2011).

En général, nous pouvons distinguer, en fonction des caractéristiques pédoclimatiques, trois zones de culture du pommier (Oukabli et al. 2011):

Zones de faible altitude (<450m d'altitude): Région du Gharb

- Un nombre de froid inférieur à 300 heures de températures <7.2°C.
- Sol limoneux argileux, profond.
- Chaleurs estivales élevées pouvant bloquer la croissance du pommier pendant plusieurs jours.

Zones de moyenne altitude (450-600m d'altitude) : Plateau de Meknes-ElHajeb.

- Un nombre de froid de 400 à 600 heures
- Sols argilo-calcaires avec des profondeurs variables
- Eau d'irrigation limitante

Zones de haute altitude (> 800 m d'altitude) : Moyen Atlas ; Azrou, Khénifra...

- Un nombre d'heures de froid d'au moins 700 heures.
- Existence de bassins aux sols profonds et propices à la culture du pommier.
- Pluviométrie importante (500 à 600 mm/an).
- Risques de gelée et grêle importants.

Les caractéristiques de ces zones ont une incidence sur le choix des variétés, et la rentabilité de la culture reste donc tributaire de la maîtrise de ces facteurs environnementaux.

XI. Enjeux des ressources génétiques du pommier.

Le concept de "ressources génétiques" remonte à la révolution verte des années 1960, mais il a acquis une certaine reconnaissance mondiale grâce à la Convention sur la diversité biologique adoptée lors du Sommet de la Terre à Rio de Janeiro en 1992. Il stipule notamment que l'État a la souveraineté sur son patrimoine naturel. Une définition des ressources génétiques a été énoncée durant cette convention comme étant un « matériel d'origine végétale, animale, microbienne ou autre, contenant des unités fonctionnelles de l'hérédité » ou un « matériel génétique ayant une valeur effective ou potentielle ». La biodiversité agricole a été largement augmentée par l'être humain à partir d'espèces sauvages qu'il a su domestiquer depuis l'époque de la Préhistoire. En diversifiant le compartiment cultivé de l'espèce domestiquée, il a ainsi créé différentes variétés par un processus de sélection. Aujourd'hui, il existerait dans le monde par exemple, plus de 15 000 variétés de tomates (Michaud, 2018). Mais en parallèle, 75% de la diversité des cultures a été perdue entre 1900 et 2000 (FAO, 2010), et seules les céréales comme le riz, le blé, l'avoine, l'orge, le maïs, le mil et le sorgho fournissent 45% des bases alimentaires de l'Humanité (FAO, 2003).

Selon le dernier rapport des Nations Unies de 2017, la population mondiale atteindra 9,1 milliards d'ici 2050 et les ressources phytogénétiques (RPG) constitueront alors la base de la durabilité agricole et de la sécurité alimentaire (Hammer et Teklu 2008). Globalement, avec l'utilisation des marqueurs moléculaires, le nombre des travaux de recherche sur la caractérisation et la valorisation des ressources phytogénétiques a connu une nette augmentation durant les 20 dernières années mais d'un autre côté, la sélection végétale est de plus en plus délaissée du secteur public, en faveur du secteur privé qui a su prendre la relève depuis les années 1980. Ceci pourrait constituer un certain danger dans la mesure où ce secteur se focalise sur un nombre plus restreint de cultures dont la valeur économique est très importante.

Malgré la grande variabilité génétique du pommier domestique, les milliers de cultivars distribués dans le monde et les programmes de sélection mondiaux, principalement basés sur les caractères organoleptiques, les normes esthétiques et la résistance aux maladies, la taille des ressources génétiques utilisées par les sélectionneurs est limitée et réduite à quelques variétés. Actuellement, à partir de 6000 cultivars de pommier documentés, environ 100 sont cultivés commercialement, les plus populaires dans le monde entier comprenant : 'Delicious', 'Golden Delicious', 'Granny Smith', 'Fuji', 'Gala', " Idared ", " Jonagold ", " Braeburn ",

" Cripps Pink ", " Jonathan ", " Elstar " et " McIntosh ", avec les cinq premiers cultivars représentent 61% de la production mondiale (Figure 14, Jackson, 2003 ; O'Rourke, 2003).



Figure 14: Quelques variétés de pommier cultivées. (A): Fuji; (B): Delicious; (C): Golden Delicious; (D): Gala; (E): Granny Smith; (F): Idared; (G): Jonagold; (H): Braeburn; (I): Cripps Pink; (J): Jonathan; (K): Elstar; (L): McIntosh. Source: Courtesy of Rentel, D., Bundessortenamt and Julius Kühn Institute, Germany

Les conditions climatiques changeantes, les pressions exercées par les nouvelles maladies et ravageurs et la production de fruits avec moins d'intrants chimiques pour répondre à la demande des consommateurs entraîneront la nécessité de développer de nouveaux cultivars de pommes plus résistants aux stress abiotiques et biotiques. Pour relever ce défi futur, il faudra que le maximum de la diversité génétique conservée dans les banques de gènes, les jardins où dans la nature puisse être utilisable d'une façon durable. Notamment dans la recherche des traits désirés.

XII. Conservation des ressources génétiques du pommier

La biodiversité des RPG fournit à l'être humain des biens indispensables au quotidien comme l'oxygène, la nourriture, les médicaments, le bois et les fibres mais elle offre également des services de plus haute importance comme la fertilisation des sols et l'épuration de l'air et de l'eau. En raison du changement climatique et de la surexploitation des ressources génétiques dans leur habitat naturel, au niveau mondial, environ 13,49 % des plantes vasculaires (300 000), soit un total d'environ 40 468 espèces, sont menacées à des degrés divers (Gore et al. 2022). Le taux d'extinction a été multiplié par cent ou mille par rapport aux extinctions

antérieures, ce qui a conduit à la crise de la "sixième extinction de masse" et la diversité végétale est menacée au niveau de l'habitat, des espèces et de la génétique à un degré jamais atteint auparavant dans l'histoire de notre planète (Gore et al. 2022). En outre, le COVID-19 et le conflit entre l'Ukraine et la Russie ont également mis l'accent sur l'importance du renforcement des systèmes de sécurité alimentaire à long terme pour chaque nation. Puisque les RPG sont les éléments constitutifs et l'assurance pour le développement de nouvelles variétés modernes. Des investissements plus importants dans la conservation et l'utilisation des RPG ont un intérêt majeur. Par conséquent, il est urgent de planifier et de mettre en œuvre des stratégies de conservation bien adapter aux différents types de RPG afin d'assurer une conservation sûre. Pour les techniques de conservation des RPG du pommier; ils se divisent en deux grandes catégories :

XII.1 Conservation in-vitro

Actuellement, la conservation in vitro repose principalement sur la cryoconservation dans l'azote liquide (-196 °C), qui garantit une conservation à long terme sûre et rentable du germoplasme végétal (Benson, 2008 ; Engelmann, 2012 ; Reed et al. 2008).

Les pommiers ont l'avantage d'être des espèces ligneuses pérennes qui s'adaptent bien aux techniques de cryoconservation des bourgeons dormants, et ces méthodes ont été mises en œuvre avec succès. Le National Center for Genetic Resources Preservation (NCGRPP, Fort Collins, USA) a cryoconservé les bourgeons dormants d'environ 1900 accessions de pommes. Dans la cryoconservation des bourgeons dormants, les branches ou les scions sont récoltés après que les plantes mères aient été exposées à une durée suffisante de températures froides. Le niveau de déshydratation optimal des bourgeons dormants est très important pour obtenir une récupération élevée après cryoconservation (Benelli et al. 2013). La déshydratation est généralement effectuée à -5 °C pendant plusieurs jours et, dans la plupart des cas, jusqu'à un taux d'humidité d'environ 25-35% du poids frais. Avant l'immersion dans l'azote liquide, les échantillons sont refroidis lentement. Pour les sections nodales de pommes, Towill et al. (2004) ont utilisé un taux de refroidissement de 1 °C/h de -5 à -30 °C.

Il existe certaines conditions pour lesquelles la méthode de cryoconservation des bourgeons dormants n'est pas applicable, à savoir lorsque les bourgeons n'atteignent pas un niveau de dormance suffisant ou lorsque le matériel végétal de pomme n'existe qu'en culture in vitro (Li et al. 2015).

XII.2 Conservation In-Vivo

La conservation in vivo des RPG du pommier se fait généralement ex-situ, en vergers sous forme de core collection. Ceci présente certains avantages et inconvénients. Les principaux avantages sont que les RPG peuvent être conservées dans les conditions climatiques de leur utilisation escomptée et elles peuvent être évaluées durant leur conservation. Mais en contrepartie, elles demandent beaucoup d'espace, le coût de conservation est élevé et elles sont exposées aux ravageurs et aux maladies (Hammer et Teklu 2008). En Europe, il y a plus de 30 000 accessions qui ont été recueillies et conservées dans des collections sur terrain (IPGRI, 1996). Des données minimales rapportées pour chaque collection ont été rassemblées dans une base de données "European Malus database" (Maggioni et al. 1997). Au Maroc, deux collections de pommiers ont été créées dans les années 80 au niveau des domaines expérimentaux de l'INRA à Ain Taoujdate (hiver relativement doux) et à Laanaceur (hiver relativement froid) afin de conduire des expérimentations pour proposer des variétés adaptées à chaque environnement climatique au Maroc. Le matériel végétal de ces deux collections est constitué exclusivement de plusieurs variétés et porte-greffes introduits de différents pays (Oukabli et al. 2011).

XIII. Etude de la diversité génétique du pommier

Pour étudier la diversité des cultivars de pommier, les chercheurs ont souvent utilisé des marqueurs morphologiques, des marqueurs moléculaires ou une combinaison des deux. Par exemple, Pereira-Lorenzo et al. (2003) ont évalué la diversité des cultivars de pommier au sein d'une collection en utilisant 24 traits morpho-agronomiques. De même, Pérez-Romero et al. (2015) ont discriminé et identifié 29 accessions locales de pommier dans le sud de l'Espagne sur la base de 33 traits morphologiques en complément de la caractérisation moléculaire. Aussi Koc et al. (2009) ont comparé deux porte-greffes de pommier locaux en Turquie avec deux porte-greffes standards (M9 and MM106) en utilisant des marqueurs morphologiques et moléculaires.

XIII.1 Marqueurs morphologiques

Au cours du siècle dernier, la plupart des études de classification du pommier se sont attachées à donner des descriptions détaillées, qui se fondaient principalement sur la morphologie des fruits (Pomologie) et les caractéristiques agronomiques.

Les descriptions étaient faites par des pomologistes qui détaillaient soigneusement les principales caractéristiques définissant chaque cultivar, en ajoutant fréquemment une

illustration précise faite à la main (Guinea, 1957). Ce n'est que dans la seconde moitié du 20ème siècle que les cultivars de pommier ont commencé à être classés selon des directives systématiques telles que celles établies par l'IBPGR (1982) ou l'UPOV (1974).

L'IBPGR (1982) se concentre sur la conservation des ressources génétiques et inclut plus de détails sur l'origine des cultivars, ainsi que des informations cytologiques et iso-enzymatiques pertinentes. Alors que L'UPOV (1974) est principalement axée sur la protection des cultivars et peut donc être utilisée comme ligne directrice pour distinguer les cultivars dans le but d'obtenir de nouveaux brevets. Les deux directives fournissent généralement des caractères (Pomologiques, morphologiques et agronomiques) principaux et secondaires avec différents niveaux de variation en fonction de la variabilité totale constatée précédemment entre les cultivars du pommier.

La plupart des accessions de pommier en Europe ont été caractérisées et évaluées à l'aide de ces deux descripteurs (IBPGR, 1982 ; UPOV, 1974). Cependant, ces efforts n'ont pas été suffisants pour comparer l'ensemble de la variabilité trouvée (Maggioni et al. 1997).

Afin d'identifier les bases génétiques des caractères multigéniques très complexes, une mise à jour incluant d'avantage des marqueurs moléculaires tels que les microsatellites qui sont très précis pour distinguer les cultivars est peut-être plus bénéfique.

XIII.2 Marqueurs moléculaires

De nos jours, les techniques à base de marqueurs moléculaires sont largement appliquées dans la caractérisation des ressources génétiques. Leur principal avantage est que la variation peut être mesurée directement au niveau de l'ADN, ce qui rend ces techniques insensibles aux influences environnementales.

Les marqueurs moléculaires sont des biomolécules qui peuvent être mises en relation avec une caractéristique génétique. Il existe deux grands types de marqueurs moléculaires : Le premier type, développé à la fin des années 1970, était basé sur l'identification des protéines et des isoenzymes alors que le deuxième type est basé sur la variabilité des séquences nucléotidiques au niveau de L'ADN (Moss, 1982).

Au cours des dernières décennies, de nombreux marqueurs moléculaires ont été développés (Al-Samarai and Al-Kazaz, 2015) et les marqueurs basés sur l'ADN sont devenus les marqueurs de choix pour l'identification des cultivars et pour les études de diversité génétique en raison de leur abondance dans les génomes végétaux, de leur grand nombre d'allèles par locus, de leur caractère informatif élevé, de leur aptitude à l'automatisation et, en particulier

dans le cas des arbres fruitiers avec une longue période juvénile comme le pommier, ils peuvent prendre moins de temps pour la caractérisation de nouveaux hybrides (Garkava-Gustavsson et al. 2008). Ainsi, ce type de technologies constitue une aide précieuse pour l'identification des accessions génétiquement proches ou redondantes, ce qui permet aux gestionnaires de prendre des décisions efficaces concernant la réduction de la taille des collections (réduction des coûts de conservation et de gestion) sans réduire la variabilité génétique (Szewc-McFadden et al. 1996). La figure suivante montre la contribution des outils de génomique dont les marqueurs moléculaires font partie, dans chaque étape du management des RPG, de la collecte du patrimoine génétique jusqu'à son utilisation (Figure 15, Wambugu et al. 2018).

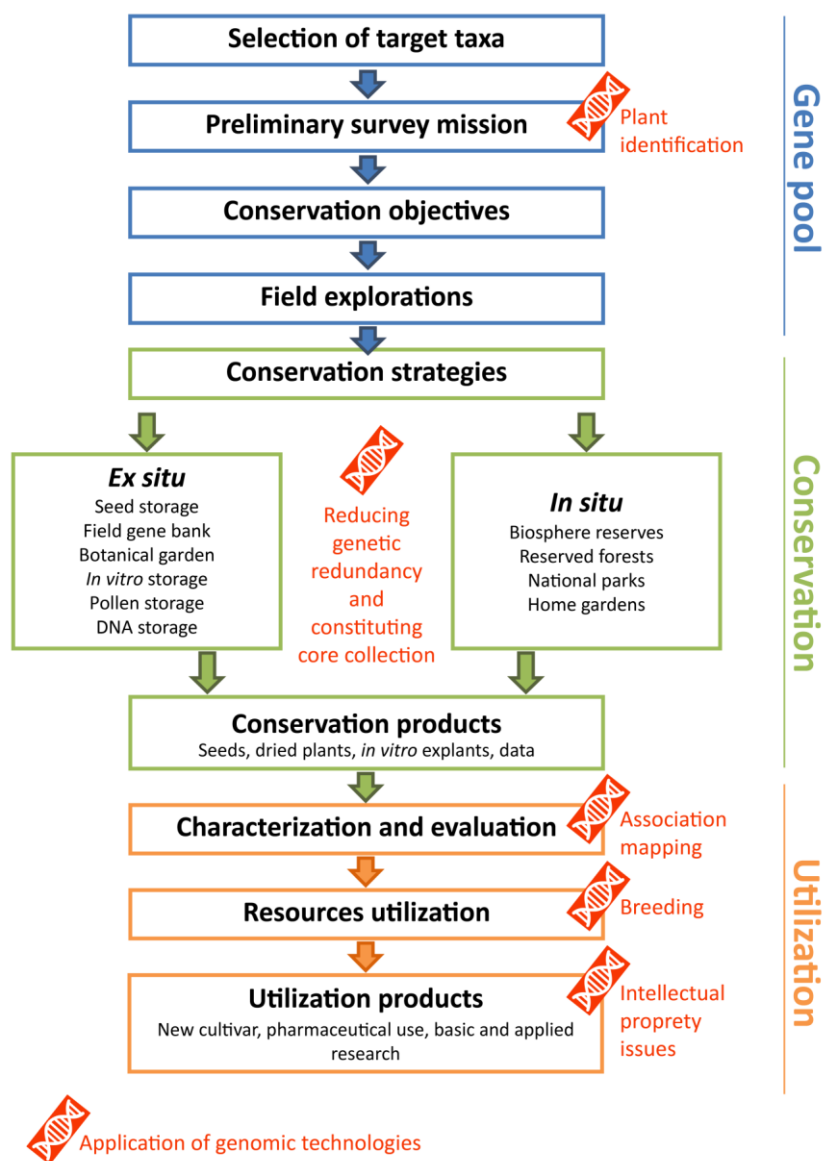


Figure 15: Apport des outils de génomique dans le management des ressources phytogénétiques. (Source : Bernard, 2020).

De nombreux marqueurs sont disponibles pour étudier la diversité génétique au niveau moléculaire. Sachant bien que chaque technique de marquage a ses contraintes et ses atouts, selon l'objectif de l'étude, une technique peut être plus appropriée qu'une autre.

Les marqueurs moléculaires telles que RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), SSR (Simple Sequence Repeats) et SNP (Single-nucleotide polymorphism) sont couramment utilisées pour les études écologiques, évolutives, taxonomiques, phylogéniques et génétiques des plantes (Kumar, 1999 ; Lund et al. 2003 ; Koebner et Summers 2003 ; Nandakumar et al. 2004 ; Snowdon et Friedt 2004 ; Chee et al. 2004 ; Bernardo et Itoiz 2004 ; Tang et al. 2006 ; Willsmore et al. 2006 ; Agarwal et al. 2008 ; Primmer, 2009 ; Vaidya et al. 2012 ; Randhawa et al. 2013).

Des rapports antérieurs confirment que, pour le pommier, différents marqueurs ont été utilisés pour l'évaluation de la diversité génétique dans les collections (Hokanson et al. 2001 ; Guarino et al. 2006 ; Pereira-Lorenzo et al. 2007 ; Garkava-Gustavsson et al. 2008 ; Gharghani et al, 2009 ; Patzak et al, 2009 ; Gasi et al. 2010), l'identification des cultivars (Galli et al. 2005 ; Van Treuren et al. 2010), la construction de cartes de liaison génétique (Liebhard et al. 2003 ; Hemmat et al. 2003 ; Silfverberg-Dilworth et al. 2006) et l'identification des relations phylogénétiques (Kitahara et al. 2005 ; Evans et al. 2011).

Parmi les différentes techniques de marquage, les marqueurs basés sur les microsatellites (séquences d'ADN répétées en tandem de 1 à 6 paires de bases très répandues dans les génomes des eucaryotes) sont considérés comme des marqueurs de choix. Deux stratégies de marquage différentes ont été utilisées sur la base des microsatellites : SSR et ISSR.

XIII.2.1 Les SSR

Les SSR sont des marqueurs codominants hautement reproductibles, dans lesquels une seule paire d'amorces PCR (qui encadre les séquences répétées) produit des motifs polymorphes en fonction du nombre d'unités répétées dans chaque allèle (Litt et Luty 1989). Ces derniers se sont avérés être des marqueurs très informatifs et robustes. Le glissement (slippage) de la polymérase au cours de la réplication de l'ADN en raison de l'appariement décalé de séquences répétées, est considéré comme la principale cause de variation du nombre d'unités de répétition d'un microsatellite, ce qui entraîne des polymorphismes de longueur qui sont détectés par électrophorèse sur gel (Queller et al. 1993 ; Jarne et Lagoda, 1996).

XIII.2.2 L'ISSR

C'est une méthode différente basée sur les microsatellites, qui ne nécessite aucune connaissance préalable du génome, du clonage ou de la conception des amorces ([Zietkiewicz et al. 1994](#)). Alors que le protocole SSR repose sur l'amplification de la région répétée à l'aide d'une paire d'amorces, pour l'ISSR, une seule amorce composée d'une séquence microsatellite ancrée à l'extrémité 3' ou 5' par 2 à 4 nucléotides arbitraires, souvent dégénérés, est utilisée pour amplifier l'ADN entre deux microsatellites opposés du même type. Les polymorphismes alléliques se produisent chaque fois qu'un génome est dépourvu de la séquence répétée ou présente une délétion ou une insertion qui modifie la distance entre les répétitions. Pour les amorces ancrées en 5', des polymorphismes se produisent également en raison des différences de longueur du microsatellite. Les séquences des répétitions et des nucléotides ancrés qui facilitent la fixation des amorces à des régions inter-microsatellites sont choisies au hasard.

Bien que les ISSR soient des marqueurs dominants, ils présentent l'avantage d'analyser plusieurs loci en une seule réaction ([Goulão et Oliveira, 2001](#)). Il s'agit d'une méthode simple et rapide qui combine la plupart des avantages des microsatellites (SSR) et de l'AFLP avec l'universalité de la RAPD. Les marqueurs ISSR sont très polymorphes et sont utiles dans les études sur la diversité génétique, la phylogénie, le marquage des gènes, la cartographie du génome et la biologie de l'évolution ([Pradeep Reddy et al. 2002](#)).

Chapitre 2 - Analyse de la diversité pomologique du pommier au Maroc

I. Introduction

Actuellement, le pommier est la troisième culture fruitière au monde en matière de production (FAOSTAT, 2020). En conséquence, la qualité et la phénologie des fruits (la pomme) ont été au centre des programmes de sélection dans le monde entier (Urrestarazu et al., 2017; Jung et al., 2020). À cet effet, le matériel génétique de cette espèce (sauvage et domestiqué) est régulièrement évalué pour son utilisation potentielle par les sélectionneurs (Gottschalk et al., 2013; Khan et al., 2014), et la couleur rouge, l'acidité réduite, la fermeté, le taux de sucre (TSS ou °Brix) et la taille grand des fruits semblent avoir fait l'objet d'une sélection pendant la domestication et l'amélioration de pommiers (Ma et al., 2015 ; Migicovsky et al., 2021; Watts et al., 2021).

Aujourd'hui, bien que les informations fournies par les marqueurs moléculaires (tels que les microsatellites) sont préférées au phénotypage en raison de leur stabilité et de leur économie (Reddy et al., 2002; Ban et al., 2014), l'étude du germoplasme agricole par les traits morphologiques reste pertinente et utile dans l'analyse de la diversité (Božović et al., 2016; Király et al., 2015; Kumar et al., 2018). En effet, plusieurs études morphologiques sur le pommier ont été réalisées en Italie (Bignami et al., 2003), en Iran (Damyar et al., 2007), en Bosnie-Herzégovine (Gaši et al., 2011), en Serbie (Mratinić & Fotirić-Akšić, 2012), en Espagne (Reig et al., 2015), en Hongrie (Király et al., 2015), en Inde (Mir et al., 2017), au Canada (Watts et al., 2021), et en Turquie (Karatas, 2022), rapportant une grande diversité morphologique. Les descripteurs morphologiques les plus utilisés dans ces travaux appartiennent à des directives internationales telles que l'IBPGR (1982) et l'UPOV (2005) et ils se concentrent sur les caractéristiques des fruits, car ces derniers influence la demande des transformateurs et consommateurs (Pereira-Lorenzo et al., 2018).

Dans l'objectif d'aider les pomiculteurs marocains dans le choix et la sélection des meilleurs cultivars ayant des caractéristiques pomologiques intéressantes. Le but de ce travail est de faire une caractérisation pomologique de 30 cultivars de pommier couvrant la majorité de son aire de répartition au Maroc.

II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de 30 cultivars de pommier collectés (entre juin et octobre 2018) de différentes régions du Maroc, en particulier autour des montagnes du haut et moyen Atlas dans le nord et le centre du pays (Figure 16). La localisation géographique et les données météorologiques des sites prospectés (jardins et vergers) sont rapportées dans le [tableau 5](#). La collecte du matériel végétal a été réalisée pendant la période de pleine maturation physiologique. Selon les instructions décrites dans les deux descripteurs du pommier, [IBPGR, \(1982\)](#) et [UPOV, \(2005\)](#), des échantillons de 13 à 15 pommes/arbre ont été cueillis aléatoirement sur des arbres bien veillant et avec de bonnes productions. Cinq arbres pour chaque cultivar ont été échantillonnés. L'échantillonnage a été réalisé en présence des pomiculteurs pour s'assurer de l'identification des variétés et des noms utilisés localement.

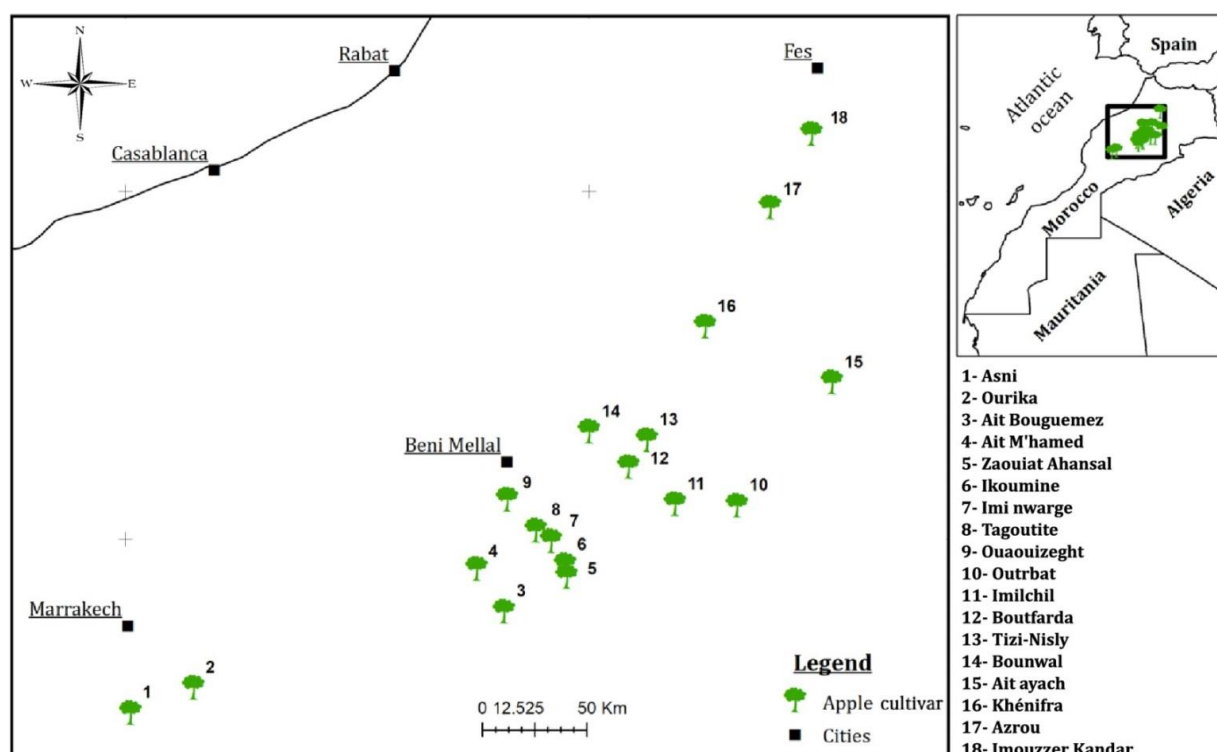


Figure 16: Localisation des cultivars de pommier (*Malus × domestica* Borkh) collectés.

Tableau 5: Caractéristiques géographiques et données météorologiques des zones de culture de pommier prospectées.

Site prospecté	Cultivars Collectées	Longitude (Ouest)	Latitude (Nord)	Altitude (m)	T-max (C°)	T- min (C°)
Asni	Delicious-1 (Int)	-7,98	31,25	1163	23.5	7.4
Ourika	Oumlile-2 (Loc), Ahmri-2 (Loc)	-7,71	31,36	1421	26.8	12.2
Ait Bouguemez	Ahmri-1 (Loc), Oumlil-1 (Loc), Gala-2 (Int), Maticha (Loc)	-6,37	31,69	2059	23.7	4.2
Ait M'hamed	Labiad (Loc)	-6,49	31,87	1629	22.4	5.5
Zaouiat Ahansal	Amlale (Loc)	-6,10	31,84	1751	21.2	4.5
Ikoumine	Oumlile-Beldi (Loc), Azougar-Beldi (Loc), Starking-2 (Int), Azougar (Loc)	-6,10	31,89	1547	20	4.5
Imi nwarge	Lahlou (Loc)	-6,16	31,99	1192	24	7
Tagoutite	Delicious-2 (Int)	-6,23	32,04	1280	24.2	7.3
Ouaouizeght	Talhloute (Loc)	-6,35	32,17	1022	24.2	7.3
Outrbat	Starking-1(Int)	-5,36	32,15	2247	25.5	6.2
Imilchil	Starkimson-2 (Int), Golden-2 (Int)	-5,63	32,15	2146	19.1	3
Boutfarda	Gala-1 (Int)	-5,84	32,37	1473	22.2	6.5
Tizi-Nisly	Lahmar-1 (Loc)	-5,75	32,43	1395	26.7	11.4
Bounwal	Zarbana (Loc)	-6,00	32,47	1079	26.7	11.4
Ait ayach	Golden-1 (Int), Starkimson-1(Int)	-4,95	32,68	1531	21.8	7.5
Khénifra	Golden-4 (Int), Starking-4 (Int)	-5,50	32,92	1314	23.5	8.4
Azrou	Starking-3 (Int)	-5,23	33,43	1234	21.4	6.1
Imouzzer Kandar	Golden-3 (Int), Delicious-3 (Int), Lahmar-2 (Loc)	-5,04	33,75	1210	23.5	6.5

(Loc): Cultivar Local ; (Int) : variété internationale; T-max : Température maximale moyenne; T-min: Température minimale moyenne.

II.2 Variables étudiées

La caractérisation morphologique et chimique a été basée sur 34 critères pomologiques dont la majorité sont cités dans les deux descripteurs du pommier publiés par l'Institut International des Ressources Phytogénétiques (IBPGR, 1982) et l'Union Internationale Pour la Protection des Obtentions Végétales (UPOV, 2005).

II.2.1 Variables morphologiques liées aux fruits.

Sur un échantillon de 50 fruits par cultivar récoltés de cinq arbres différents (10 fruits par arbre), 31 variables morphologiques liées aux fruits (Figure 17) ont été mesurées (quantitatives) ou codifiées (qualitatives) selon les instructions figurées dans les descripteurs susmentionnés.

• Variables quantitatives :

- ✓ Poids du fruit (PF) en g
- ✓ Longueur du pédoncule (LOP) en mm
- ✓ Largeur du pédoncule (LAP) en mm
- ✓ Taille du fruit (TF) en cm
- ✓ Hauteur du fruit (HF) en mm ; Diamètre du fruit (DF) en mm
- ✓ Rapport : Hauteur/ Diamètre (RHD)
- ✓ Profondeur de la cavité du pédoncule (PCP) en mm
- ✓ Largeur de la cavité du pédoncule (LCP) en mm
- ✓ Profondeur de la cuvette de l'œil (PCO) en mm
- ✓ Largeur de la cuvette de l'œil (LCO) en mm
- ✓ Nombre de grains (NG)
- ✓ Largeur de grains (LAG) en mm ; Longueur de grains (LOG) en mm
- ✓ Longueur de sépale (LS) en mm

• Variables qualitatives :

- ✓ Forme du fruit (FF)
- ✓ Parfum (P)
- ✓ Etat cireux de l'épiderme (ECE)
- ✓ Couleur du fond (CF)
- ✓ Couleur supplémentaire (CS)
- ✓ Aspect dû à une couleur Supplémentaire (ACS)
- ✓ Part de coloration Supplémentaire (PCS)
- ✓ Surface de liège autour du Pédoncule (SLP)
- ✓ Surface de liège sur les joues (SLJ)
- ✓ Surface de liège autour de la cuvette de l'œil (SLO)
- ✓ Couleur de la Chair (CC)
- ✓ La Fermeté de chair (FC)
- ✓ Ouverture des loges carpellaires (OLC)

- ✓ Nombre de lenticelles (NL)
- ✓ Taille des lenticelles (TL)
- ✓ Taille de l'œil (TO)

II.2.2 Variables chimiques

Pour chaque cultivar, trois paramètres chimiques ont été analysés avec trois répétitions.

• pH

La mesure du pH a été effectuée en plongeant l'électrode du pH-mètre, préalablement étalonné, dans une solution de jus pur.

• Taux de solides solubles (TSS) ou Brix°

Une goutte de purée de fruits a été mise sur la plaque du réfractomètre (étalonné à 20 °C) préalablement nettoyé (avec l'eau distillée) et séché; en suite, la valeur du degré Brix (%) a été lue directement sur le réfractomètre. Dans un milieu dit simple comme le jus des fruits, soit 10°Brix = 10% de sucres dans le milieu, car pour ce type de milieu, les minéraux et les autres substances sont négligeables (Feldsine et al. 2002).

• Acidité titrable (AT)

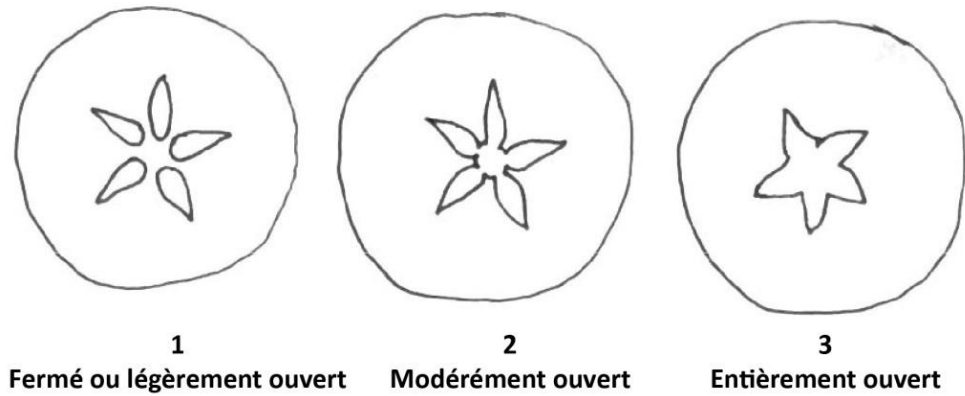
L'acidité titrable (qui correspond à la somme des acides minéraux et organiques libres dans le jus de fruits) a été déterminée en titrant le jus de pomme avec l'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,1M (Ruck, 1963). Le jus extrait à partir de 25 g de fruits est dilué à 1/10. Puis, dans un bécher (100 ml) muni d'un agitateur magnétique, on met 50 ml de jus dilué, et on titre avec une solution de NaOH 0,1 N jusqu'à l'obtention d'un pH de 8,1.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'acide malique ; l'acide dominant dans le jus de pomme (Ruck, 1963). L'acidité titrable en pourcentage est calculée selon la formule suivante :

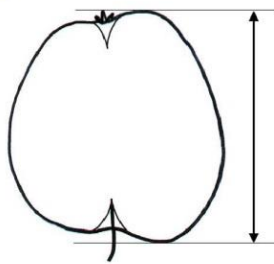
$$AT\% = \frac{1}{10} \times \frac{PE \times N \times V}{P}$$

Où, **PE** : Poids équivalent d'acide malique (67,0g) ; **N** : Normalité de NaOH ; **V** : Volume de NaOH versé ; **P** : Poids de l'échantillon.

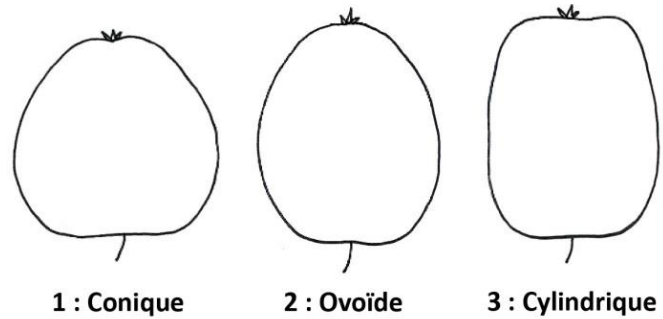
Ouverture des loges carpellaires (OLC)



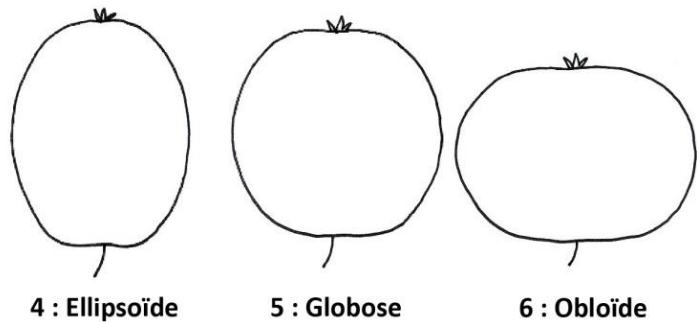
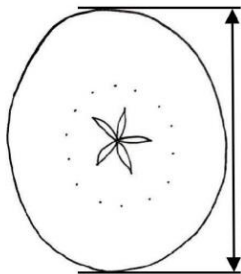
Hauteur de fruit (HF)



Forme du fruit (FF)



Diamètre du fruit (DF)



f-h = Profondeur de la cavité du pédoncule (PCP)

e-f = Largeur de la cavité du pédoncule (LCP)

a-c = Profondeur de la cuvette de l'œil (PCO)

a-b = Largeur de la cuvette de l'œil (LCO)

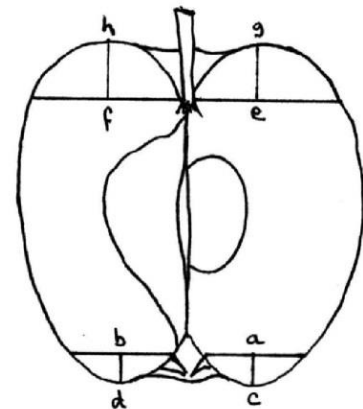


Figure 18: Schéma explicatif de quelques traits étudiés, UPOV (2005).

II.3 Analyses statistiques

Les données relatives aux paramètres pomologiques ont été analysées par différents logiciels en utilisant différentes procédures statistiques.

II.3.1 Analyse de la variance à un seul facteur (ANOVA)

Cette analyse permet de comparer les moyennes des paramètres mesurés et de définir l'écart entre les différents individus. L'ANOVA se base sur le test de Fisher (F) qui permet de tester l'hypothèse d'égalité ou non des moyennes. Cette analyse a été faite à l'aide du logiciel XLSTAT® (version 2017).

II.3.2 Analyse en composantes principales (ACP)

L'analyse en composantes principales est une analyse multivariée qui a pour but de résumer les variables (quantitative) étudiées à l'aide d'un petit nombre de nouvelles variables synthétiques, appelées composantes principales. Cette analyse descriptive permet de représenter dans un plan à deux dimensions le maximum de variabilité sans à priori entre les cultivars, permettant de mettre en évidence des tendances de corrélation ou des structurations dans le jeu de données. Dans cette étude, l'ACP a été menée pour explorer la structuration globale des cultivars en fonction des traits pomologiques étudiés. Le logiciel utilisé pour cette analyse est le XLSTAT® (version 2017).

II.3.3 Classification hiérarchique ascendante (CHA)

Nous avons opté à la classification hiérarchique ascendante selon la méthode d'agrégation UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean). Cette analyse a été effectuée par le logiciel STATISTICA ® software (version 5).

II.3.4 Coefficient de corrélation de Pearson

En utilisant le XLSTAT® software (version 2017), une matrice de corrélation a été établie entre les variables étudiées en se basant sur le coefficient de Pearson qui consiste à calculer le quotient de la covariance de deux variables aléatoires par le produit de leurs écarts-types. Plus ce coefficient est proche de -1 ou +1, plus l'association entre les deux variables est forte, jusqu'à être parfaite.

III. Résultats

L'objectif principal de l'analyse morphologique est de déterminer l'ampleur de la variabilité pomologique et identifier les critères les plus discriminants du pommier étudié. L'analyse de

la variance a révélé des différences significatives entre les cultivars pour tous les traits mesurés (Tableaux 6 et 7). Cela témoigne de la présence d'une hétérogénéité importante au sein des cultivars étudiés (Figure 18).

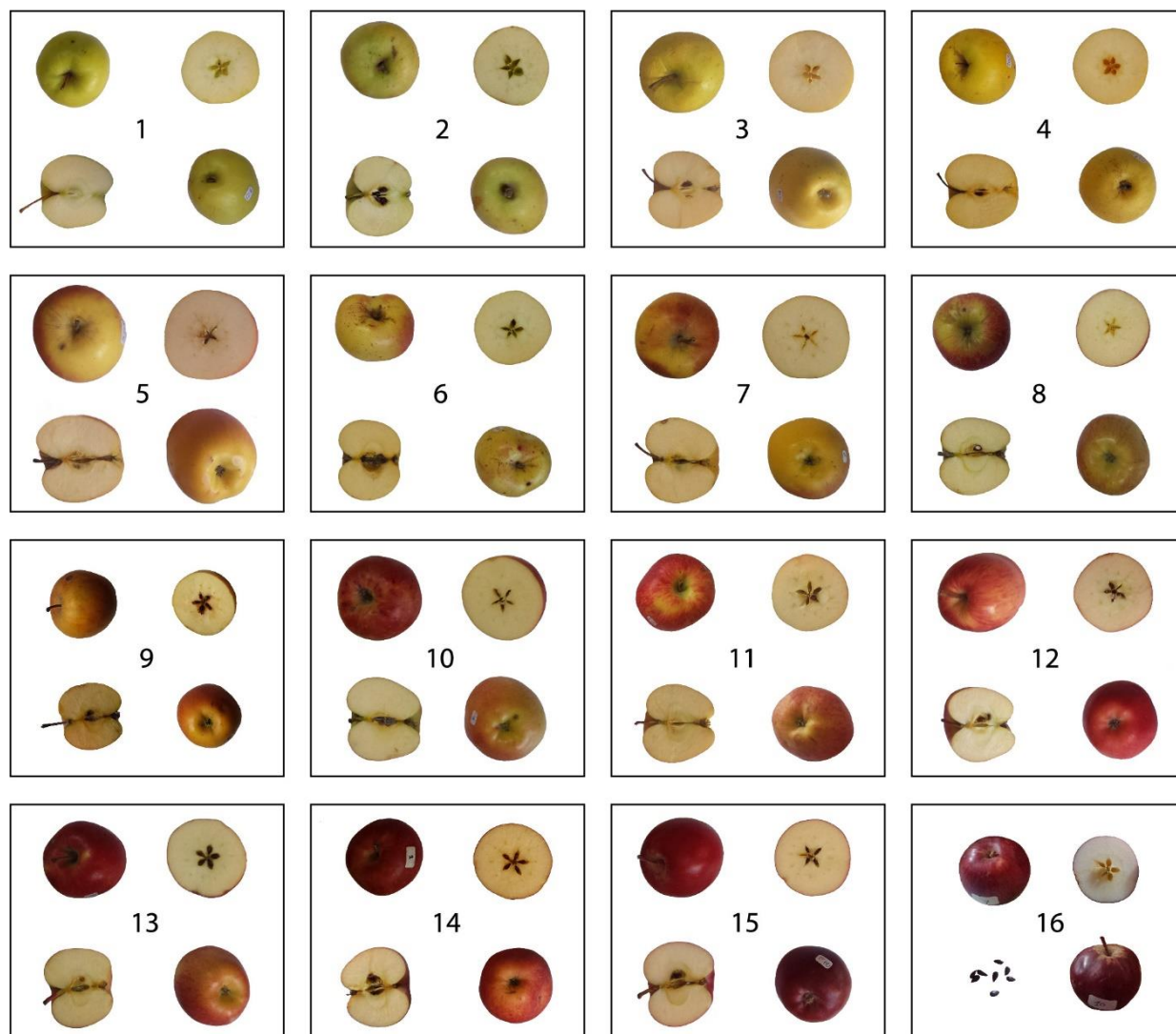


Figure 19: Fruits de quelques cultivars étudiés. (1) : Golden-2 ; (2) : Maticha ; (3) : Golden-3 ; (4) : Golden-4 ; (5) : Delicious-1 ; (6) : Labiad ; (7) : Starking-4 ; (8) : Delicious-2 ; (9) : Starking-3 ; (10) : Starking-2 ; (11) : Starking-1 ; (12) : Starkimson-1 ; (13) : Lahmar-1 ; (14) : Ahmri-1 ; (15) : Starkimson-2 ; (16) : Azougar-Beldi (Y.Khachtib, 2023).

III.1 Analyse des descripteurs morphologiques qualitatifs

La majorité des cultivars présentait une couleur de fond (CF) jaune-vert (77,8 %) suivi par une couleur jaune (11,5 %), tandis que la couleur de la chair (CC) était crème chez 39,5 % des cultivars étudiés suivi d'une couleur jaunâtre (38 %) et verdâtre (21,1 %) ([Tableau 6](#)).

2,1% des pommes étudiées ne présentent aucun parfum (P), 67,7% sont parfumées et 30,2% sont très parfumées. De même, la quantité de cire sur l'épiderme (ECE) de 10,4% des individus est forte, 31,1% des individus ont une quantité moyenne alors que 58,2% ont une quantité faible ou absente de cire sur leurs épidermes.

Le niveau d'ouverture des loges carpellaires (OLC) a montré des différences significatives entre les cultivars, avec une dominance de loges carpellaires modérément ouvertes (78,3 %). La forme des fruits (FF) était principalement ovoïde (41,2 %), suivie d'une forme conique (23,4 %), ellipsoïde (13 %) et globulaire (10 %).

III.2 Analyse des descripteurs quantitatifs (morphologiques et chimiques)

L'ensemble des descripteurs quantitatifs (15 pomologiques et 3 chimiques) ont montré une variabilité significative entre les cultivars étudiés ([Tableau 7](#)). Le nombre moyen de graines (NG) a varié de 3,26 chez le cultivar Delicious-2 à 9 chez le cultivar Lahlou (9). D'autre part, le cultivar Delicious-1 présente la valeur la plus élevée pour la taille de fruit (25,76 mm) et le cultivar Amlale la valeur la plus faible (15,64 mm).

Le poids des fruits moyen (PF) varie de 52,07 g pour le cultivar Talhloute à 229,34 g pour le cultivar Delicious-1. De même, la longueur du pédoncule (LOP) a montré un degré de variation significative entre les cultivars, la LOP minimale a été observée chez le cultivar Labiad (11,31 mm) tandis que la LOP maximale a été observée chez le cultivar Golden-4 (30,79 mm).

En matière de degré Brix, le taux de solides solubles (TSS) a montré une grande variation entre les cultivars, allant de 11,63 % chez le cultivar Lahlou à 18,80 % chez le cultivar starking-1. De même, l'acidité titrable (AT) varie de 0,20 % (équivalent acide malique) chez le cultivar Delicious-3 à 1,41 % chez le cultivar Azougar-Beldi.

Concernant le coefficient de variation, on note que parmi les 18 descripteurs quantitatifs considérés, 16 avaient des coefficients de variation supérieurs à 10 %, ce qui montre une large gamme de variations entre les cultivars étudiés.

III.3 Test de corrélation de Pearson :

L'analyse du test de corrélation a mis en évidence des corrélations significatives entre plusieurs caractères étudiés (Tableau 8).

Le poids du fruit (PF) a montré des corrélations positives avec la taille du fruit (TF, $r = 0,97$), la hauteur du fruit (HF, $r = 0,96$), la largeur de la cuvette de l'œil (LCO, $r = 0,90$), la taille de l'œil (TO, $r = 0,84$), la profondeur de la cavité du pédoncule (PCP, $r = 0,85$), la largeur de la cavité du pédoncule (LCP, $r = 0,85$), la profondeur de la cuvette de l'œil (PCO, $r = 0,78$), la taille des lenticelles (TL, $r = 0,60$) et le parfum (P, $r = 0,56$). De même, la surface de liège autour de la cuvette de l'œil (SLO) est corrélée positivement avec l'ouverture des loges carpellaires (OLC, $r = 0,71$). La longueur du pédoncule (LOP) est corrélée positivement avec le rapport : hauteur/diamètre (RHD, $r = 0,75$), la longueur de sépale (LS, $r = 0,56$) et l'acidité titrable (AT, $r = 0,55$). En revanche, l'acidité titrable (AT) était négativement corrélée avec la taille des lenticelles (TL, $r = -0,50$), ainsi que la longueur du pédoncule (LOP, $r = -0,54$). D'autre part, Le pH a montré une corrélation négative et significative avec l'ouverture des loges carpellaires (OLC, $r = -0,57$), le nombre de graines (NG, $r = -0,56$) et la largeur des graines (LAG, $r = -0,51$).

Tableau 6: Fréquences des caractères qualitatifs considérés chez les cultivars étudiés.

Caractère Mesurées	Échelle d'évaluation (Caractère dominant en Gras)	Fréquence du Caractère dominant	Niveaux de Signification ^a
Forme du fruit	Conique - Ovoïde - Cylindrique- Ellipsoïde - Globose – Obloïde	41.2 %	**
Parfum	Sans parfum - Parfumée - Très parfumée	67.7 %	**
Etat cireux de l'épiderme	Absent ou faible - Modéré – Fort	58.2 %	**
Couleur du fond	Non visible - Jaune blanchâtre - Jaune - Vert blanchâtre - Vert jaune – Vert	77.8 %	**
Aspect dû à une couleur Supplémentaire	Affleurant plein seulement - Affleurant plein avec rayures définies – Rayures seulement	73.9 %	**
Part de coloration Supplémentaire	Absent ou très petit - Petit - Moyen - Grand - Très grand	36.7 %	**
Couleur supplémentaire	Absent - Orange - Rose - Rouge - rouge foncé - violet – brun	45.5 %	**
Surface de liège autour du Pédoncule	Absent ou petit - Moyen – Grand	45.1 %	**
Surface de liège sur les joues	Absent ou petit - Moyen – Grand	99.2 %	**
Surface de liège autour de la cuvette de l'œil	Absent ou petit - Moyen – Grand	93.1 %	**
Couleur de la Chair	Blanc - crème - jaunâtre - verdâtre - rosâtre – rougeâtre	39.5 %	**
Fermeté de la chair	Très molle – Molle – Moyenne – Ferme - Très ferme	65.8 %	**
Ouverture des loges carpellaires	Fermé ou légèrement ouvert - Modérément ouvert - Entièrement ouvert	78.3 %	**
Nombre de lenticelles	Petit - Moyen – Grand	44.4 %	**
Taille des lenticelles	Petit - Moyen – Grand	68.2 %	**
Taille de l'œil	Petit - Moyen – Grand	52.7 %	**

^a : Niveau de signification de l'ANOVA : ** : p< 0.01

Tableau 7: Statistiques descriptives des caractères quantitatifs considérés chez les cultivars étudiés.

	PF (g)	LOP (mm)	LAP (mm)	TF (Cm)	HF (mm)	DF (mm)	RHD	PCP (mm)	LCP (mm)	PCO (mm)	LCO (mm)	NG	LAG (mm)	LOG (mm)	LS (mm)	TSS (%)	pH	AT (%)
Zarbana	86.71	17.71	2.12	19.58	51.62	61.86	0.83	9.53	23.81	4.6	24.48	6.48	4.26	8.67	6.23	13.67	3.64	0.54
Golden-1	147.57	24.71	1.77	21.64	64.33	69.22	0.93	15.9	28.84	6.03	27.07	7.06	4.54	8.43	5.74	15.37	3.71	0.54
Starkimson-1	124.97	20.69	2.36	20.92	59.03	67.5	0.87	13.18	32.09	7.24	25.54	6.84	4.14	7.64	6.36	13.97	3.82	0.44
Delicious-1	229.34	21.44	2.78	25.76	76.02	84.23	0.9	18.08	38.64	10.55	34.86	3.4	4.38	7.84	6.35	12.53	4.26	0.56
Starkimson-2	115.23	20.83	2.37	20.16	59.01	65.22	0.91	14.41	30.65	7.78	25.49	6.42	3.81	7.21	6.79	12.97	3.96	0.42
Golden-2	120.41	28.88	1.62	20.37	59.97	65.07	0.92	15.59	31.22	8.89	27.95	8.18	4.47	8.24	5.98	13.77	3.66	0.29
Starking-1	140.05	23.79	2.31	21.63	63.88	70.08	0.91	14.66	33.32	8.07	25.56	6.4	3.89	7.19	6.76	18.8	3.96	0.42
Lahmar-1	138.09	22.36	2.7	21.78	59.98	71.02	0.84	16.48	36.08	9.1	30.52	7.74	4.26	7.97	6.52	14.03	4.27	0.3
Gala-1	74.45	25.86	2.1	17.15	48.68	55.21	0.88	13.38	23.65	5.87	18.17	7.3	4.37	8.26	6.74	16.2	3.83	0.38
Lahlou	55.24	17.81	2.16	16.37	39.18	54.4	0.73	10.49	22.92	5.53	20.66	9	4.85	8.46	4.76	11.63	3.29	1.19
Amlale	57.29	24.43	1.8	15.64	46.97	50.59	0.93	10.69	18.63	4.94	19.36	5.85	4.27	8.18	7	12.8	3.51	0.74
Oumlile Beldi	136.61	13.91	2.77	22.58	57.47	73.24	0.79	14.22	32.58	5.13	29.59	7.2	4.7	8.17	5.51	14.03	3.4	0.62
Azougar Beldi	69.35	16.9	2.15	17.39	50.9	56.28	0.9	11.46	19.52	3.47	22.17	8.7	4.68	9.93	6.87	14.53	3.18	1.41
Starking-2	137.96	24.3	2.13	21.98	65.58	71.15	0.92	14.99	34.36	9.16	27.43	6.4	4.36	8.31	6.2	12.6	4.01	0.43
Azougar	193.07	21.07	2.2	23.75	71.95	78.37	0.92	17.12	37.86	10.87	30.33	6.5	4.58	8.67	7.67	12.73	4.01	0.41
Delicious-2	117.26	21.39	2	20.08	60.29	64.95	0.93	13.35	30.91	9.52	27.07	3.26	4.19	7.64	6.79	12.37	4.13	0.27
Labiad	119.91	11.31	2.67	21.22	56.11	69.13	0.81	13.04	34.43	6.97	29.01	7.6	4.61	7.79	5.06	15.83	2.95	1.03
Ahmri-1	129.4	20	2.27	21.27	59.72	68.61	0.87	14.66	33.17	8.53	27.19	6.54	4.29	7.83	6.21	16.07	4.11	0.31
Oumlile-1	105.26	20.85	2.07	19.06	54.85	60.29	0.91	14.44	28.83	6.98	25.39	7.4	4.29	8.12	6.35	12.93	4.06	0.32
Gala-2	124.75	25.08	2.21	20.93	61.16	66.28	0.92	18.33	29.8	8.07	28.58	5.6	4.35	7.9	6.66	15.5	3.59	0.53
Maticha	123.5	14.62	2.56	20.83	57.34	69.12	0.83	14.57	34.1	6.35	28.93	7.6	4.34	8.04	6.13	12.8	3.52	0.52
Golden-3	120.86	28.37	1.72	20.27	60.74	64.47	0.94	15.99	31.35	8.32	25.96	6.48	4.28	8.59	7.29	12.93	4.31	0.23
Delicious-3	75.3	26.29	2.21	17.32	49.22	55.52	0.89	11.09	23.35	6.61	22.04	4.9	2.28	4.66	6.27	16.97	4.26	0.20
Lahmar-2	73.21	22.99	2.12	17.36	49.24	56.01	0.88	10.69	24.31	5.01	21.96	5.1	2.72	5.38	5.39	12.53	4.1	0.22
Starking-3	97.04	27.75	2.17	18.97	53.39	60.38	0.89	11.72	29.39	7.44	25.38	7.35	4.03	7.58	7.02	14.43	4.07	0.27
Golden-4	182.7	30.79	1.97	23.84	69.4	78.23	1.02	18.24	29.1	9.4	29.94	6.15	4.42	8.89	7.28	13.27	4.16	0.25
Starking-4	205	25.66	2.36	24.62	72.76	80.04	0.91	17.1	39.21	9.52	30.6	7	4.38	8.21	6.83	15.7	4.09	0.22
Ahmri-2	138.56	25.4	2.38	21.29	63.19	68.94	0.92	15.7	33.26	8.02	26.33	5.9	4.13	7.87	6.9	16.63	4.04	0.38
Oumlile-2	81.76	28.62	2.06	17.9	52.69	56.88	0.93	13.52	27.23	4.84	22.15	7.45	4.12	8.59	6.47	12.57	3.84	0.24
Talhloute	52.07	13.4	1.89	17.16	43.04	53.15	0.81	9.07	24.95	6.11	21.76	1.3	2.61	4.86	5.42	11.93	4.35	0.27
Moyenne	119.1	22.24	2.2	20.29	57.92	65.51	0.89	14.06	29.92	7.3	26.05	6.44	4.15	7.84	6.38	14.07	3.87	0.47
CV (%)	36.87	22.26	13.51	12.38	14.89	13.05	6.28	18.48	18.01	26.03	14.58	25.05	14.32	14.17	10.6	12.38	9.21	62.74
F value	74,24**	33,76**	37,56**	68,57**	59,63**	46,75**	6,72**	35,36**	61,22**	37,57**	48,31**	19,19**	22,90**	45,68**	16,75**	8,81**	19,29**	12,70**

CV : coefficient de variation ; Niveau de signification : ** : p< 0.01; les valeurs maximal et minimal pour chaque trait sont écrites en gras.

Tableau 8: Matrice des corrélations entre les paramètres morphologiques et chimiques étudiés.

	FF	PF	P	SLJ	SLO	TL	LOP	LAP	TF	HF	DF	RHD	TO	PCP	LCP	PCO	LCO	OLC	NG	LAG	LOG	LS	FC	PH	AT
FF	1																								
PF	-0,51**	1																							
P	-0,33	0,57**	1																						
SLJ	0,38*	-0,23	-0,11	1																					
SLO	0,51**	-0,03	-0,14	0,12	1																				
TL	-0,59**	0,60**	0,49**	-0,45*	-0,24	1																			
LOP	-0,48**	0,18	0,03	-0,27	-0,45*	0,45*	1																		
LAP	-0,02	0,38*	0,30	0,06	0,32	0,11	-0,49**	1																	
TF	-0,42*	0,97**	0,59**	-0,23	0,07	0,58**	0,06	0,45*	1																
HF	-0,60**	0,97**	0,51**	-0,36	-0,10	0,63**	0,29	0,26	0,94**	1															
DF	-0,43*	0,98**	0,58**	-0,17	0,08	0,56**	0,04	0,49**	0,99**	0,93**	1														
RHD	-0,60**	0,38*	0,11	-0,58**	-0,38*	0,54**	0,75**	-0,43*	0,27	0,55**	0,25	1													
TO	-0,61**	0,84**	0,47**	-0,32	-0,28	0,57**	0,29	0,28	0,84**	0,85**	0,83**	0,38*	1												
PCP	-0,51**	0,85**	0,44*	-0,19	-0,10	0,65**	0,39*	0,21	0,81**	0,87**	0,81**	0,52**	0,72**	1											
LCP	-0,52**	0,85**	0,55**	-0,13	-0,07	0,49**	-0,01	0,52**	0,88**	0,82**	0,88**	0,11	0,86**	0,73**	1										
PCO	-0,60**	0,78**	0,46*	-0,19	-0,42*	0,44*	0,32	0,15	0,74**	0,79**	0,74**	0,41*	0,88**	0,74**	0,79**	1									
LCO	-0,31	0,90**	0,51**	-0,16	0,09	0,48**	-0,04	0,49**	0,94**	0,85**	0,93**	0,17	0,82**	0,77**	0,87**	0,72**	1								
OLC	0,32	-0,14	-0,27	0,32	0,71**	-0,29	-0,48**	0,22	-0,12	-0,20	-0,08	-0,31	-0,49**	-0,12	-0,19	-0,45*	-0,08	1							
NG	-0,04	-0,06	-0,03	0,36*	0,24	0,01	0,05	0,08	-0,05	-0,08	-0,01	-0,15	-0,16	0,09	-0,02	-0,24	-0,05	0,34	1						
LAG	-0,11	0,37*	0,15	0,25	0,27	0,14	-0,06	0,13	0,38*	0,34	0,41*	0,02	0,13	0,44*	0,28	0,15	0,37*	0,44*	0,61**	1					
LOG	-0,14	0,28	0,10	0,12	0,23	0,15	0,09	-0,03	0,28	0,31	0,30	0,21	0,04	0,39*	0,12	0,04	0,23	0,41*	0,63**	0,93**	1				
LS	-0,59**	0,34	0,04	-0,45*	-0,25	0,32	0,56**	-0,17	0,25	0,47**	0,24	0,74**	0,38*	0,43*	0,16	0,42*	0,14	-0,14	-0,03	0,14	0,33	1			
FC	-0,14	-0,45*	-0,32	-0,25	-0,23	-0,14	0,15	-0,54**	-0,47**	-0,30	-0,47**	0,32	-0,31	-0,26	-0,47**	-0,27	-0,49**	0,00	0,17	-0,09	0,14	0,326	1		
PH	-0,45*	0,28	0,21	-0,37*	-0,44*	0,32	0,47**	-0,14	0,22	0,32	0,19	0,41*	0,49**	0,24	0,28	0,54**	0,16	-0,57**	-0,57**	-0,52**	-0,43*	0,40*	-0,06	1	
AT	0,47**	-0,24	-0,13	0,43*	0,38*	-0,51**	-0,55**	0,19	-0,22	-0,30	-0,17	-0,42*	-0,52**	-0,28	-0,32	-0,45*	-0,16	0,57**	0,41*	0,47**	0,42*	-0,33	0,04	-0,82**	1

Corrélations significatives, positive (en rouge) et négatif (en bleu); * Significatif (P<0.05); ** Hautement significatif (P<0.01)

III.4 Analyse en composantes principales et classification hiérarchique ascendante

Afin d'étudier les relations phylogénétiques entre les cultivars étudiés, une analyse en composante principale et une classification hiérarchique ascendante ont été réalisées sur la base des paramètres morphologiques et chimiques étudiés. Les deux premières composantes (PC1 et PC2) absorbent 65 % de la variabilité totale (Figure 19). La première composante (PC1) qui représente 44,03 % de la variation totale, est corrélée positivement aux poids du fruit (PF), la hauteur du fruit (HF), la taille du fruit (TF), le diamètre du fruit (DF), la profondeur de la cavité du pédoncule (PCP) et la profondeur de la cuvette de l'œil (PCO). Concernant la deuxième composante qui absorbe 21,06 % de la variabilité observée, il est corrélée positivement avec la longueur du pédoncule (LOP), le rapport hauteur/diamètre (RHD) et le pH. En revanche, l'acidité titrable (AT), la largeur des grains (LAG), la longueur des grains (LAG), le nombre de grains (NG) et la largeur du pédoncule (LAP) sont corrélés négativement avec cette deuxième composante.

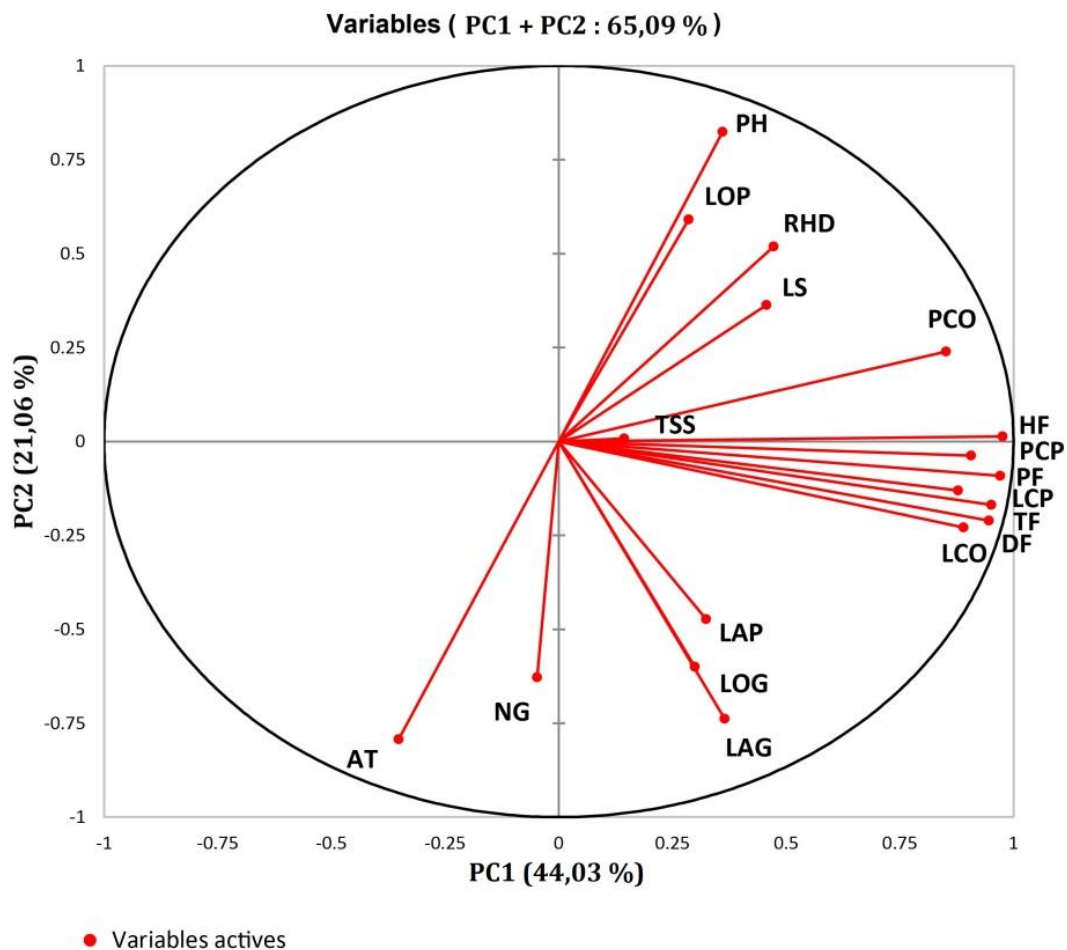


Figure 20: Corrélations entre les variables quantitatives et les deux premiers axes de l'ACP.

La projection des cultivars étudiés sur le plan ACP formé par les deux premières composantes a révélé la présence de trois groupes (Figure 20). Le premier groupe (1) comprend 6 cultivars y compris des cultivars introduits et locaux qui sont caractérisés par des pédoncules courts, un petit nombre de grains, une acidité moyenne à faible, un nombre de lenticelles relativement grand et des loges carpellaires fermées ou légèrement ouvertes. Le deuxième groupe (2) est constitué de 6 cultivars et il est principalement composé de cultivars locaux caractérisés par un faible poids de fruit, une acidité titrable élevée, des sépales longs, un grand nombre de grains et une surface de liège autour de la cuvette de l'œil relativement grande. Quant au troisième groupe (3), il comprend 18 cultivars et il est constitué majoritairement de cultivars introduits. Ces cultivars se différencient des autres groupes principalement par leurs grands poids et leurs grandes tailles de fruits et par des valeurs relativement élevées du rapport Hauteur/ Diamètre. D'une façon générale, on note que les cultivars étudiés sont regroupés indépendamment de leurs origines géographiques.

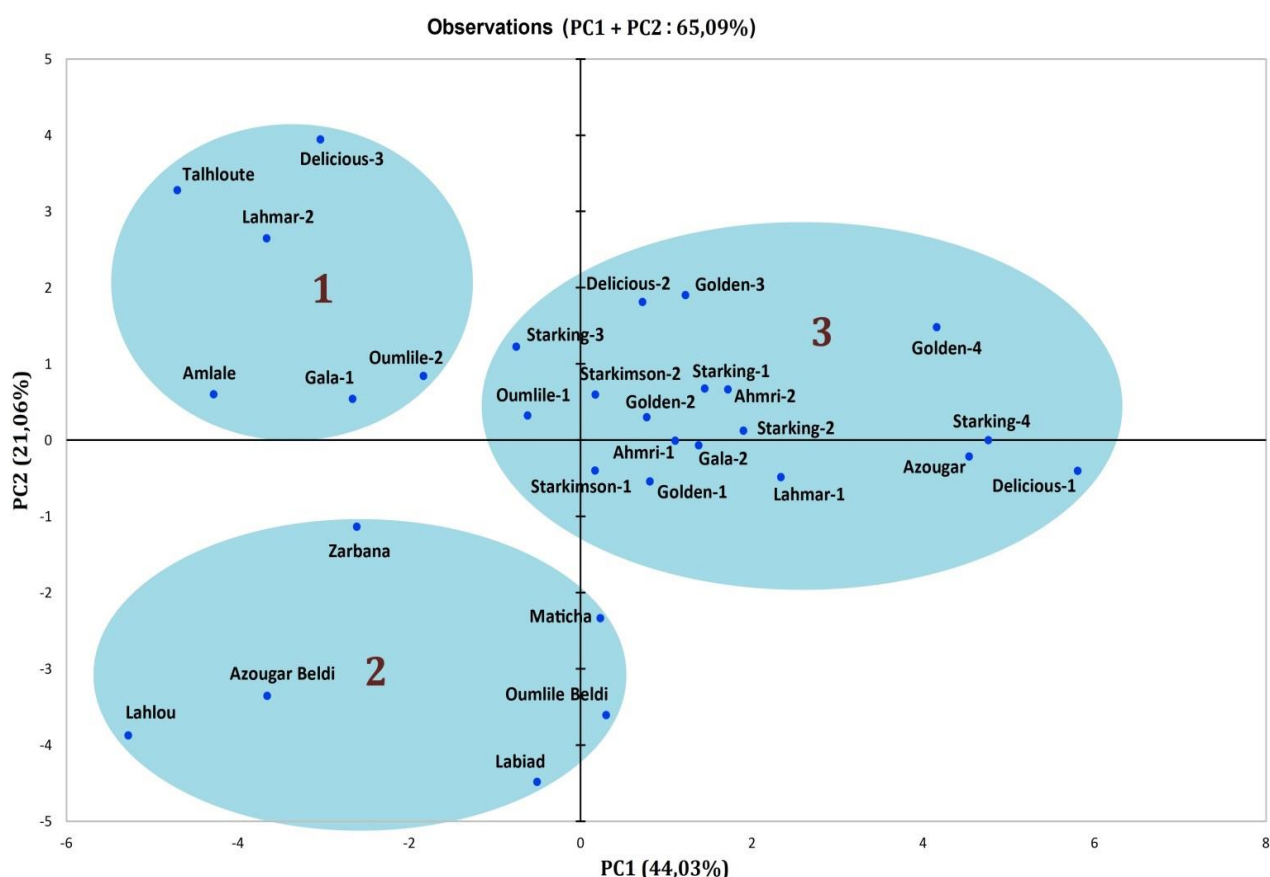


Figure 21: Diagramme de dispersion des cultivars étudiés, basé sur les deux composantes principales.

La classification hiérarchique ascendante (CHA) a révélé la séparation de deux clusters principaux (Figure 21).

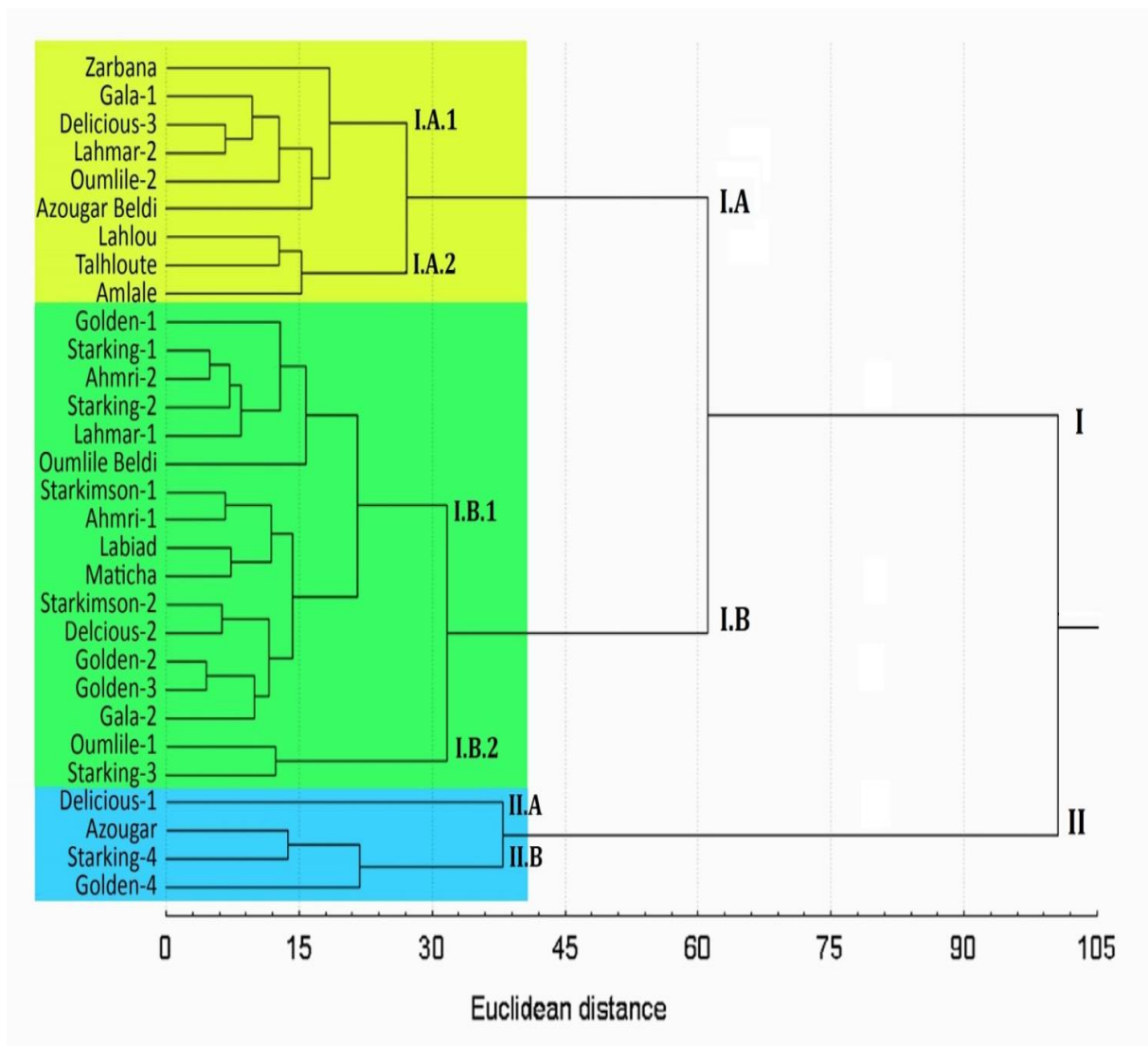


Figure 22: Dendrogramme résultant de la classification hiérarchique ascendante basée sur 34 caractères pomologiques.

Le premier cluster (I) est divisé en deux sous-clusters (I-A et I-B) ; le sous-cluster (I-A) comprend 9 cultivars à savoir Zarbana, Gala-1, Delicious-3, Lahmar-2, Oumlile-2, Azougar-Beldi, Lahlou, Tahloute et Amlale, caractérisés par un faible poids et une petite taille de fruit et des pédoncules Longs. Quant au deuxième sous-cluster (I-B), il est composé de 17 cultivars à savoir Golden-1, Starking-1, Ahmri-2, Starking-2, Lahmar-1, Oumlile-Beldi, Starkimson-1, Ahmri-1, Labiad, Maticha, Delicious-2, Starkimson-2, Golden-2, Golden-3, Gala-2, Oumlilie-1 et Starking-3, qui se distinguent des autres cultivars par des valeurs

moyennes pour la majorité des caractères tels que le poids et la taille de fruit, le nombre de grains et la fermeté de la chair.

Le deuxième cluster (II) formé est composé de quatre cultivars (Delicious-1, Azougar, Starking-4 et Golden-4) qui se caractérisent par des teneurs en solides solubles totaux moyennes, une faible acidité et des fruits de poids et taille importante. On note également que certains cultivars qui portent des noms différents sont regroupés dans le même groupe, ce qui nous laisse suggérer qu'ils peuvent être des synonymes, il s'agit des cultivars :

- Delicious-3 / Lahmar-2, placé dans le cluster I.A.1
- Lahlou / Talhloute, placé dans le cluster I.A.2
- Starking-1 / Ahmri-2, placé dans le cluster I.B.1
- Oumlile-1 / Starking-3, placé dans le cluster I.B.2

D'autre part, certains cultivars qui portent la même appellation sont regroupés dans des clusters différents, ce qui nous laisse suggérer qu'ils peuvent être des homonymes. Il s'agit des cultivars :

- Delicious-1/ Delicious-2 / Delicious-3 placé dans les clusters II.A, I.B.1 et I.A.1, respectivement.
- Gala-1 / Gala-2 placé dans les clusters I.A.1 et I.B.1, respectivement.

IV. Discussion

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont révélé une grande diversité au sein des cultivars de pommier étudiés pour la plupart des traits pomologiques analysés. Ainsi, près de 89 % des caractères quantitatifs mesurés présentent un coefficient de variation supérieure à 10 % et la totalité des caractères qualitatifs montrent des différences significatives entre les cultivars étudiés. D'une façon générale, les cultivars étudiés ont des fruits de taille moyenne avec une hauteur qui varie de 39.18 mm à 76 mm et un diamètre allant de 50.59 mm à 84.23 mm. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues par [Reig et al. \(2015\)](#) chez des cultivars de pommier en Espagne (HF : 50.2 -74.7 mm ; DF : 56.2 - 88.3 mm). D'autre part, les cultivars étudiés présentent un poids de fruit moyen qui varie de 52,1 g chez le cultivar local Talhloute à 229,34 g chez la variété introduite Delicious-1. Des résultats relativement similaires ont été rapportés pour les cultivars de pommier en Bosnie-Herzégovine (97,9 - 219,58 g) et en Espagne (77,6 - 265,8 g) ([Gasi et al. 2011](#) ; [Reig et al. 2015](#)). Cependant, [Damyar et al. \(2007\)](#) et [Karatas, \(2022\)](#) ont signalé des valeurs plus faibles pour les cultivars de pommier iranien (71-165 g) et les cultivars de pommier locaux en Turquie (89-132 g),

tandis que des valeurs plus élevées ont été révélées pour des cultivars de pommier en Inde et au Canada (91,68 - 274,37 g ; 7,57-460 g ; respectivement) (Mir et al. 2017 ; Watts et al. 2021). En effet, le poids des fruits est un bon indicateur du rendement et de la qualité des fruits très demandés par les consommateurs (Gao et al. 2011).

Quant aux analyses des paramètres chimiques, les résultats obtenus montrent une importante variabilité entre les cultivars étudiés. La teneur en sucre (TSS) varie de 11,63% chez le cultivar local Lahlou à 18,80% chez la variété introduite Starking-1. De même, l'acidité titrable (AT) varie entre 0,2 % chez le cultivar Delicious-3 et 1,41 % chez le cultivar Lahlou. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres travaux sur le pommier en Syrie (TSS varie de 11,8 à 19,1 % et l'AT de 0,2 à 1,5 %), en Italie (TSS varie de 11,9 à 18,5% et l'AT varie de 0,12 à 1,29%) et en Espagne (TSS varie de 10 à 18,1% et l'AT varie de 0,17 à 1,73%) (Bignami et al. 2003 ; Al Halabi & Muzher 2015 ; Reig et al. 2015). Cependant, des teneurs en sucre plus faibles ont été enregistrées chez des cultivars locaux de pommier en Turquie (9,10 - 15,4 % ; Karatas, 2022) et au sein d'une collection qui contient plus de 1000 accessions de pommier au Canada (7,04 – 16,4 % ; Watts et al. 2021). En revanche, des valeurs plus élevées de ce paramètre ont été signalées chez les cultivars de pommier en Serbie (12,55 à 19,24 % ; Mratinić & Fotirić-Akšić 2012) et en Inde (11,80 à 20,03 % ; Mir et al. 2017).

D'autre part, selon Sebek (2013), la teneur en sucre (TSS) pour la plupart des cultivars de pommier se situe entre 11,0 et 16,1 %. Ainsi, une valeur supérieure à 16 % de ce paramètre pourrait être acceptée comme un niveau élevé de sucrosité. D'après nos résultats, on note que certains cultivars présentent des teneurs en sucre (TSS) très élevées Gala-1 (16,20%), Ahmri-1 (16,07%), Delicious-3 (16,97%), Ahmri-2 (16,63%) et Starking-1 (18,80%), ce qui est en faveur de leur utilisation dans l'industrie pour la production de jus, de sirop concentré, de la confiture ou également des tranches de pommes séchées.

Les résultats des analyses multivariées ont révélé la formation de trois groupes de cultivars indépendamment de leur origine géographique. Ceci peut être expliqué par les échanges commerciaux du matériel végétal du pommier, multiplié principalement par voie végétative, entre les pomiculteurs de différentes régions du Maroc. En effet, ce résultat est en accord avec les résultats d'autres travaux antérieurs sur la diversité pomologique du pommier en Syrie, en Espagne et en Bosnie-Herzégovine (Al Halabi & Muzher, 2015 ; Pereira-Lorenzo et al. 2003 ; Gaši et al. 2011).

Parmi les résultats obtenus au cours de ce travail, on peut avancer des hypothèses sur la présence d'homonymie et de synonymie au sein des cultivars étudiés, ce qui rejoint les résultats signalés par [Pereira-Lorenzo et al. \(2003\)](#) et [Király et al. \(2015\)](#) chez le pommier espagnol et hongrois. Ceci peut être dû au fait que les agriculteurs donnent aux cultivars de pommier des noms locaux en fonction des caractéristiques de fruits entraînaient ainsi un problème d'appellation erronée.

V. Conclusion

La présente étude sur la diversité phénotypique du pommier au Maroc a révélé que la majorité des cultivars étudiés étaient différents sur la base de la majorité des caractères pomologiques considérés, principalement la taille, le poids, la forme et la couleur du fruit, la longueur du pédoncule, la surface de liège autour du pédoncule et l'acidité titrable. En outre, cinq cultivars à savoir Gala-1, Ahmri-1, Delicious-3, Ahmri-2 et Starking-1 présentent des valeurs élevées pour la teneur en solides solubles (TSS), ce qui suggère qu'ils peuvent être bien adaptés à la transformation industrielle. D'autre part, d'après les résultats de l'analyse hiérarchique ascendante, nous avons suspecté quelque cas de synonymies et d'homonymies impliquant 12 cultivars. Finalement, on conclut que le présent travail offre des résultats importants qui pourraient être utiles pour accroître nos connaissances sur le germoplasme du pommier à l'échelle nationale et aussi bien pour mener un programme pour la gestion et la valorisation des ressources génétiques de cette espèce.

*Chapitre 3 - Analyse de la
diversité génétique du
pommier au Maroc à l'aide
des marqueurs (ISSR)*

I. Introduction

La mesure des changements d'état des ressources génétiques domestiques végétales (RGDV) et leur niveau de diversité est importante, car ils représentent le matériel utilisable par l'Homme pour faire face aux enjeux que sont le changement climatique ou le développement d'une agriculture plus durable (Goffaux et al. 2011). De telles variations de ces RGDV interviennent en lien avec les techniques de sélection et de diffusion des variétés développées lors de la modernisation de l'agriculture (Van de Wouw et al. 2009). En effet, le second rapport de la FAO sur les Ressources Phytogénétiques (2010) et le Quatrième Rapport National de la France à la Convention sur la Diversité Biologique (Valarcher, 2009) soulignent que la pression exercée par les variétés modernes à forte productivité sur les variétés traditionnelles fait obstacle à la promotion de la conservation de la diversité génétique. D'autre part, diverses études ont montré que les noms des cultivars répertoriés ne reflétaient pas la diversité représentée (Jarvis et al. 2008 ; Sagnard et al. 2008). Certains noms peuvent couvrir des cultivars différents (homonymie), et une même variété peut être reconnue sous plusieurs noms (synonymie). Ces noms utilisés par les agriculteurs renvoient, dans une certaine mesure, à la diversité agro-morphologique, chimique ou moléculaire, et sont plus ou moins répandus à différentes échelles géographiques (Jarvis et al. 2008 ; Sagnard et al. 2008).

En effet, il ressort de ce qui précède que l'évaluation régulière de la diversité génétique des espèces végétales utilisées en agriculture est essentielle à la sécurité alimentaire. Dans ce sens et afin de fournir un aperçu général sur l'état des ressources génétiques du pommier au Maroc, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la diversité génétique des cultivars marocains à l'aide des marqueurs ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). En effet ces marqueurs réputés dominants ont montré leur efficacité pour distinguer les génotypes de pommier dans plusieurs pays (Gasi et al. 2010 ; Pathak & Dhawan 2012; Uzun et al. 2016; Mariano et al. 2019).

II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel végétal

29 génotypes (4 variétés introduites et 25 cultivars locaux d'origine inconnue) cultivés dans différentes localités ont été étudiés (Tableau 9, Figure 22). Pour chaque cultivar 15 à 20 jeunes feuilles ont été prélevées entre les mois d'avril et juin 2018, puis ils sont conservés à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

Puisque les cultivars de pommier étudiés ont des origines géographiques différentes, nous avons opté de les regrouper en quatre groupes différents à savoir, Marrakech, Azilal, Khénifra et Fès.

Tableau 9: Appellation et origine géographique des 29 cultivars étudiés.

Groupe (Code)	Cultivar	Code	Origine	Latitude/°	Longitude/°
Fès (FES)	Laakri	LAK	MD.Zerhoun	34° 36	5°31
	Golden	GOL*	Immouzar Kandar	33°44	5° 20
	Lahmar-3	LAH-3	Immouzar Kandar	33°44	5° 20
Khénifra (KHE)	Lamcharat	LAM	Khénifra	32°55	5°30
	Zarbana	ZAR	Bounwal	32°27	5°59
	Labiad-1	LAB-1	Tizi Nisli	32°25	5°45
	Lahmar-2	LAH-2	Tizi Nisli	32°25	5°45
	Gala	GAL*	Boutfarda	32°20	5°48
	Starkimson	STAR*	Imilchil	32° 90	5°37
Azilal (AZI)	Tahloute	TAL	Ouaouizagthe	32°10	6°21
	Tahloute-Beldi	TAB	Ouaouizagthe	32°10	6°21
	Oumlile-1	OUM-1	Tilougite	32° 2	6°13
	Azougar-2	AZO-2	Tilougite	32° 2	6°13
	Labiad-3	LAB-3	Iminwarge	31°59	6° 9
	Lahlou-1	LAL-1	Iminwarge	31°59	6° 9
	Azougar-3	AZO-3	Iminwarge	31°59	6° 9
	Azougar-Beldi	AZB	Ikoumine	31°53	6° 6
	Oumlile-Beldi	OMB	Ikoumine	31°53	6° 6
	Amlale	AML	Zaouite Ahnsale	31°50	6° 5
	Azougar-1	AZO-1	Zaouite Ahnsale	31°50	6° 5
	Lahmar-1	LAH-1	Ait Mhamed	31°52	6°29
	Labiad-2	LAB-2	Ait Mhamed	31°52	6°29
	Lahlou-2	LAL-2	Ait Mhamed	31°52	6°29
	Ahmri-2	AHM-2	Ait Bougmez	31°41	6°22
Oumlile-3	OUM-3	Ait Bougmez	31°41	6°22	
Maticha	MAT	Ait Bougmez	31°41	6°22	
Marrakech (MAR)	Oumlile-2	OUM-2	Ourika	31°21	7°42
	Ahmri-1	AHM-1	Ourika	31°21	7°42
	Delicious	DEL*	Asni	31°15	7°58

* variétés introduites

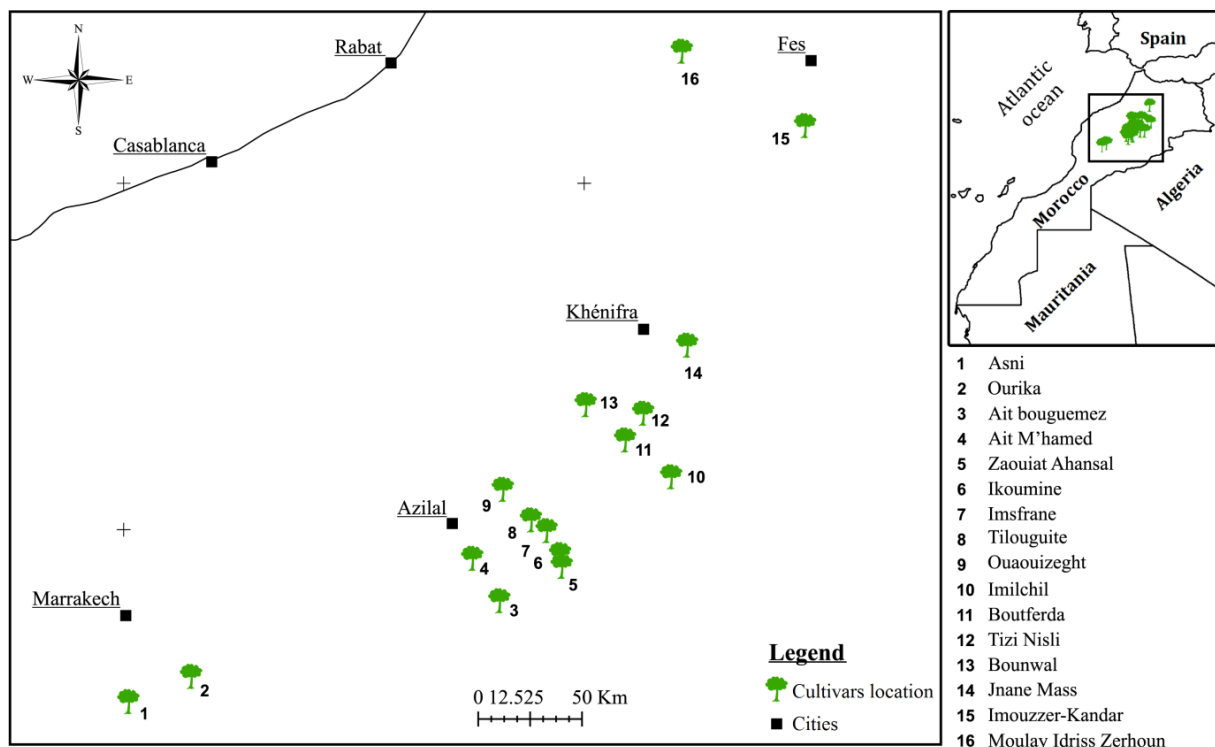


Figure 23: Distribution géographique des vergers de pommiers échantillonnés.

II.2 Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée à partir de jeunes feuilles fraîches selon la méthode CTAB (bromure de cétyltriméthylammonium) (Doyle et Doyle, 1990) avec quelques modifications. Il s'agit notamment de réajustement du volume des tampons, optimisation des durées de centrifugation et l'ajout d'un tensioactif (Laury sarcosine).

L'intégrité de l'ADN extrait a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %, et sa concentration a été estimée par spectrophotométrie (Spectrophotomètre Selecta UV-3100). Ensuite, des concentrations d'ADN de 10 ng/μl ont été préparées et conservées à -20°C pour une utilisation ultérieure.

II.3 Amplification par PCR de marqueurs ISSR

II.3.1 Amorces ISSR utilisées

Au total, vingt amorces ISSR conçues par l'Université British Columbia (UBC, Vancouver, Canada), largement utilisées pour les études de diversité génétique chez les plantes cultivées ont été testées. Par la suite, nous avons sélectionné 15 amorces en fonction de la clarté et la reproductibilité des bandes (Tableau 10).

Tableau 10: Séquences des amorces ISSRs utilisées. Tm : Température de fusion ; a : Y = (C, T), R = (A, G) ; les 15 amorces sélectionnées sont colorées en gris.

Amorces	Séquence ^a	Tm (C°)	GC%
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	48.1	47
UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	46.8	47
UBC 814	CTCTCTCTCTCTCTA	47.1	47
UBC 815	CTCTCTCTCTCTCTG	47.1	47
UBC 817	CACACACACACACAA	46.7	47
UBC 818	CACACACACACACAG	47.9	53
UBC 827	ACACACACACACACG	49.2	53
UBC 828	TGTGTGTGTGTGTGA	47.3	47
UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGAYT	51.2	44
UBC 836	AGAGAGAGAGAGAGAYA	51.9	44
UBC 840	GAGAGAGAGAGAGAYT	49.1	44
UBC 841	GAGAGAGAGAGAGAYC	49.7	50
UBC 843	CTCTCTCTCTCTCTRA	50.9	50
UBC 844	CTCTCTCTCTCTCTRC	50.9	50
UBC 845	CTCTCTCTCTCTCTRG	51	50
UBC 853	TCTCTCTCTCTCTCRT	50.9	44
UBC 855	ACACACACACACACYT	49.1	44
UBC 856	ACACACACACACACYA	49.7	44
UBC 857	ACACACACACACACYG	50.7	50
UBC 889	ACACACACACACAC	50.3	50

II.3.2 Amplification par PCR

Afin de sélectionner le programme d'amplification (PCR-ISSR) qui donne les meilleurs résultats, plusieurs essais d'optimisation ont été effectués. La qualité et le rendement du produit des réactions PCR-ISSR dépendent de plusieurs paramètres dont la température d'hybridation (Ta). Concernant la spécificité de la réaction PCR -ISSR, la Ta est considéré comme le point le plus critique (Rychlik, 1990). Ainsi, une étape d'optimisation du Ta pour chaque amorce a été réalisée à l'aide de la technique PCR à gradient de température. Cette technique nous a permis de déterminer pour chaque amorce la Ta optimale parmi un minimum de 6 valeurs de températures testées.

Comme l'efficacité d'extraction varie d'un échantillon à l'autre et que le rendement et la reproductibilité d'amplification d'une réaction PCR varie avec la quantité d'ADN, une gamme de concentrations qui varie de 10 à 70 ng d'ADN / 12,5 µL a été testée. Les meilleurs résultats d'amplification ont été obtenus dans les conditions suivantes :

- Le volume réactionnel final utilisé est de 12,5 μ L, contenant 30 ng d'ADN matrice, 1x du tampon de réaction My Taq (comprenant 5 mM de dNTPs, 15 mM de $MgCl_2$), 0,4 μ M de l'amorce et 0,625 U de MyTaq™ DNA polymérase (Bioline) et la quantité suffisante d'eau distillée stérile pour compléter le volume final. Pour éviter tout risque de contamination, la préparation des réactifs ainsi que les mélanges réactionnels ont été faits sous une hotte PCR (dotée d'un système de filtration d'air et d'un dispositif de décontamination par lampes UV).
- Les amplifications PCR ont été réalisées dans un thermocycleur MultiGene™ (Labnet International, USA) avec le programme suivant : une pré-dénaturation préparatoire à 95°C pendant 3 min, suivie de 30 cycles d'amplification. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 95 °c pendant 15s, une étape d'hybridation pendant 30 s à la température optimale d'hybridation (T_a) déterminée préalablement par PCR à gradient de température et une étape d'élongation à 72°C durant 2 min. Enfin, un cycle d'élongation finale à 72°C pendant 5 min a été effectué.

Après amplification, les produits PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,7 % avec une concentration de bromure d'éthidium de 1 μ g/ml. La migration a été effectuée en utilisant le TBE (0,5 X) comme tampon de migration sous une tension de 90 volts constante pendant 2 heures. La taille des fragments amplifiés a été estimée à l'aide du marqueur du poids moléculaire Hyper Ladder™ 1kb (Bioline) et l'image du gel a été capturée par le système Gel Doc (Enduro™ GDS, Labnet International, USA).

II.4 Analyses statistiques

II.4.1 Calcul des paramètres de diversité

La lecture des profils électro-phorétiques des amorces ISSR a été réalisée sur la base de la présence ou l'absence des différentes bandes amplifiées chez les 29 cultivars analysés. Le chiffre « 1 » est attribué pour la présence de la bande et le chiffre « 0 » pour son absence. Ainsi, une matrice binaire a été établie. Cette matrice binaire va servir au calcul des différents paramètres de diversité génétique des cultivars étudiés. De plus, pour évaluer l'efficacité et la capacité de ces marqueurs à révéler le polymorphisme chez les cultivars étudiés, d'autres paramètres ont été calculés, à savoir le P_{ic} et le R_p .

✚ Pourcentage de bandes polymorphes (PBP)

Pour chaque amorce ISSR, nous avons calculé le total des bandes amplifiées, le nombre des bandes polymorphes et le pourcentage des bandes polymorphes (PBP).

✚ Contenu informationnel du polymorphisme (PIC)

La qualité d'un marqueur génétique peut être estimée par l'indice du contenu informatif du polymorphisme (PIC) (Botstein et al. 1980). Pour les marqueurs dominants, la valeur du PIC indique la probabilité de trouver ce marqueur dans deux états différents (présent/absent) chez deux individus choisis au hasard dans une population. Sa valeur varie de zéro pour les marqueurs monomorphes à 0,5 pour les marqueurs présents chez 50 % des individus et absents chez les 50 % restants. Comme ces marqueurs n'ont que deux allèles possibles, la définition du PIC est similaire à celle de l'hétérozygotie (Serrote et al. 2020). Selon De Riek et al. (2001), le PIC est calculé par la formule suivante :

$$PIC = 1 - [f^2 + (1 - f)^2]$$

Où f est la fréquence du marqueur dans l'ensemble de données (f peut être la fréquence des loci amplifiés ou la fréquence des loci non amplifiés).

Selon les valeurs de PIC, Serrote et al. (2020) ont proposé la classification de l'informativité des marqueurs dominants suivants:

- $0 \leq PIC \leq 0,10$: informativité faible
- $0,10 \leq PIC \leq 0,25$: informativité moyenne
- $0,30 \leq PIC \leq 0,40$: informativité élevée
- $0,40 \leq PIC \leq 0,50$: informativité très élevée

✚ Pouvoir résolutif (Rp)

Pour estimer l'efficacité des amorces utilisées, un autre indice a été calculé. Il s'agit du pouvoir résolutif (Rp), connu comme étant un bon critère permettant de déterminer l'efficacité des amorces utilisées pour différencier entre les populations. Le calcul du Rp a été fait selon la formule de Gilbert et al. (1999) :

$$Rp = \sum Ib \quad \text{Avec} \quad Ib = 1 - 2 \times |0,5 - P|$$

Où P : la fréquence des individus possédant la bande I

✚ Indices de diversité de Nei

L'indice H de Nei est utilisé pour évaluer la diversité génétique à l'intérieur d'un pool génétique. Il est basé sur les fréquences des allèles identifiés sur un certain nombre de locus répartis dans le génome (Nei, 1979). Il traduit l'éloignement génétique moyen de deux variétés choisies au hasard. Sa valeur est comprise entre 0 (sur chaque locus tous les allèles relevés sont les mêmes entre chaque variété) et 1 (sur chaque locus tous les allèles relevés sont différents entre chaque variété). Il est défini par la formule suivante:

$$H = \frac{\sum_{j=1}^J (1 - \sum_{i=1}^I p_{ij}^2)}{J}$$

Où, J = nombre total de locus

I = nombre total d'allèles au locus j

p_{ij} = fréquence de l'allèle i au locus j au sein d'un ensemble de variétés

Lorsque les loci sont multialléliques, Nei utilise les indices suivants : la diversité génétique totale (H_t) qui représente la somme de la diversité génétique intra-population (H_s) et la diversité génétique inter-population (D_{st}) (Crossa et al., 1993).

$$H_t = H_s + D_{st}$$

De même, ces indices ont été également utilisés pour déterminer les relations génétiques entre les sous-populations (groupes géographiques) en calculant le coefficient de différenciation génétique (G_{st}) selon la formule suivante :

$$G_{st} = \frac{H_t - H_s}{H_t} = 1 - \frac{H_s}{H_t} = \frac{D_{st}}{H_t}$$

Le logiciel POPGEN version 1.32 (Yeh et al. 1997) a été utilisé pour calculer ces différents indices.

✚ Flux du gène (Nm)

Le flux génétique (Nm) est un concept en génétique des populations qui fait référence au mouvement de gènes ou d'allèles entre des populations croisées d'une espèce particulière. Lorsque des membres d'un pool de gènes s'accouplent avec des membres d'un autre pool de gènes, cela peut modifier les fréquences des allèles, ayant comme résultat final

l'homogénéisation des allèles entre les deux populations (Slatkin, 1985). A partir des valeurs de G_{ST} , le flux de gènes (Nm , représente le nombre absolu de migrants par génération) entre les cultivars est estimé à l'aide de logiciel POPGEN, selon la formule suivante :

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

Plus la valeur de Nm est supérieure à 1, plus l'échange de gènes est important.

✚ **Indice de diversité de Shannon (I)**

Cet indice apporte une information supplémentaire sur le degré de diversité de la population en prenant en compte sa structure via la fréquence relative (probabilité) des allèles (Bussel, 1999). Pour un nombre d'allèles donnés, cet indice prend des valeurs fortes lorsque les allèles ont des taux de recouvrement équivalents, et prend des valeurs faibles lorsque quelques allèles ont de forts recouvrements, tendant ainsi à dominer la population. Plus sa valeur est élevée plus l'hétérozygotie de la population est importante (Shannon, 1948). Il est calculé à l'aide du logiciel POPGEN, selon la formule suivante :

$$I = -1 \times (p \times \ln(p) + q \times \ln(q))$$

Où $q = (1 - \text{fréquence de la bande}) \times 0.5$ et $p = 1 - q$.

✚ **Distances génétiques et établissement des relations génétiques**

Pour évaluer le degré de ressemblance des cultivars étudiés, nous avons calculé les distances génétiques de Nei (Nei, 1972) entre ces cultivars en se basant sur les données de fréquences alléliques des locus ISSR analysées. Puis, afin d'estimer les divergences génétiques entre les cultivars, nous avons construit un dendrogramme (sur la base de la matrice des distances génétiques) en utilisant la méthode UPGMA et le coefficient de Dice (Dice, 1945). La matrice des distances génétiques et le dendrogramme UPGMA (Unweighted Pair Groups Method of Analysis) ont été réalisés à l'aide du programme NTSYS PC version 2.02 (Rohlf, 2000).

✚ **Test de corrélation de Mantel**

Le test de Mantel est utilisé pour calculer la corrélation linéaire entre deux matrices de distance (dissimilarité ou similarité) distinctes (Mantel, 1967). Il est souvent utilisé en écologie pour tester si les différences entre plusieurs sites, d'une part en termes de diversité

génétique des espèces étudiées, d'autre part en termes de caractéristiques géophysiques, peuvent être reliées ou non. Dans notre étude, la corrélation entre une matrice de distances génétiques et une matrice de distances géographiques a été calculée grâce au package Mx-Comp du logiciel NTSYS-PC (version 2.02).

II.4.2 Analyse de la structure de la population

Pour bien comprendre la structure génétique d'une population, il est primordial de déterminer le nombre théorique de populations ancestrales auxquelles appartiennent les individus qui forment cette population. Une des premières méthodes bayésiennes basées sur un modèle explicite permettant de détecter la structure génétique des populations a été proposée par [Pritchard et al. \(2010\)](#) ; elle est implémentée dans la première version du logiciel STRUCTURE. Il s'agit d'un modèle hiérarchique bayésien qui constitue la base de nombreuses méthodes actuelles. Le modèle de [Pritchard et al. \(2010\)](#) suppose l'existence de K populations (non prédéfinies), et chacune d'entre elles est caractérisée à chaque locus par un ensemble de fréquences alléliques. Ces fréquences alléliques vont être utilisées par le logiciel pour calculer des probabilités d'appartenance plus fiables et puis réaffecter chaque individu à une population donnée estimant ainsi le nombre de population (k) optimal auquel appartiennent les échantillons. Dans la présente étude, nous avons effectué cette analyse bayésienne en utilisant le logiciel STRUCTURE pour tester un nombre de clusters (K) allant de 1 à 10. Dix répétitions indépendantes pour chaque K ont été effectuées avec les paramètres statistiques suivants :

- ✓ La longueur de la période initiale « burn-in » a été réglée à 10000
- ✓ Le nombre de permutations MCMC (Markov chain Monte-Carlo) fixé à 200000

Pour identifier le nombre optimal K expliquant la structure génétique des cultivars, nous avons utilisé le logiciel Structure Harvester ([Earl et Von Holdt, 2012](#)) qui permet de calculer l'indice ΔK d'[Evanno et al. \(2005\)](#) à partir des fichiers zippés des résultats obtenus avec STRUCTURE. De même, pour obtenir un alignement optimal des exécutions (répétitions) indépendantes, le programme CLUMPP version 1.1.2 ([Jakobsson et Rosenberg 2007](#)) a été utilisé pour calculer la similitude moyenne par paire (H') d'exécutions. Plus les valeurs de ΔK et H' sont grandes, plus le K testé est le plus probable.

III. Résultats

III.1 Polymorphisme des marqueurs ISSR

L'analyse des profils d'amplifications obtenus avec les 15 amorces utilisées montre un total de 177 bandes dont 156 (88,13 %) sont polymorphes. Le nombre de bandes varie de 7 pour l'amorce UBC857 à 16 pour les deux amorces UBC836 et UBC855, avec une moyenne de 11,8 bandes par amorce. La taille des bandes générées est comprise entre 200 et 2000 pb. La [figure 23](#) montre les bandes obtenues avec l'amorce UBC-845.

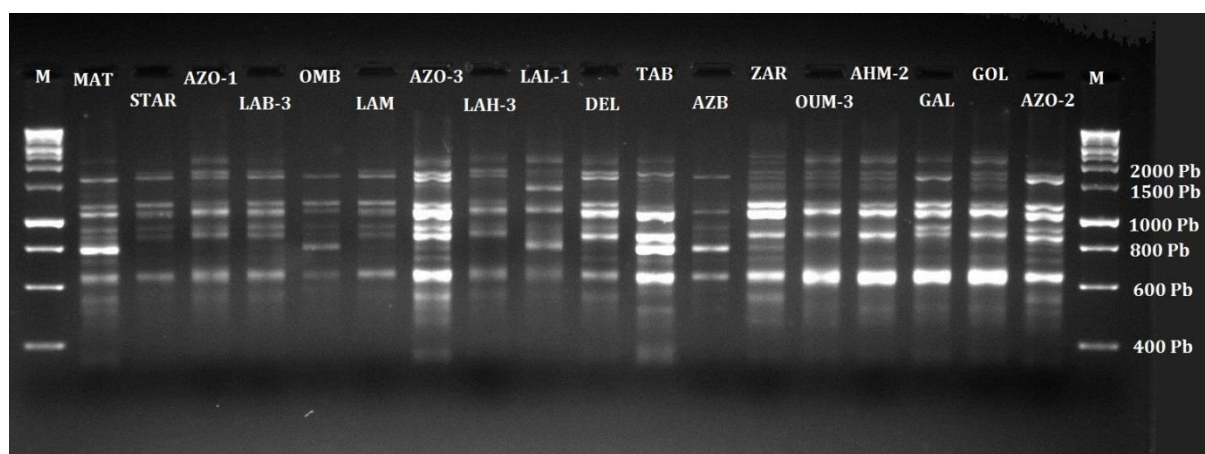


Figure 24: Exemple de profil électrophorétique obtenu par l'amorce UBC 845.

Le pourcentage de polymorphisme (PPB) varie de 50 % pour l'amorce UBC-807 à 100 % pour les amorces UBC-815 et UBC-841 avec une moyenne de 88,13 % ([Tableau 11](#)), ce qui témoigne du grand niveau de polymorphisme des cultivars étudiés. L'efficacité des amorces utilisées a été estimée par les deux indices PIC et Rp. Les valeurs de PIC varient de 0,39 pour l'amorce UBC-818 à 0,49 pour les amorces UBC-827, UBC-828, UBC-836, UBC-840, UBC-844 et UBC-845, avec une moyenne de 0,46. Selon [Roldán-Ruiz et al. \(2000\)](#), la valeur du PIC est représentée par la probabilité de trouver un marqueur dans deux états différents (présent et absent) dans deux individus tirés au hasard de la population, et les marqueurs dominants comme ISSR avec des valeurs proches de 0,50 sont les meilleurs. Concernant le RP qui est considéré comme un paramètre qui indique indirectement le potentiel des amorces pour évaluer le polymorphisme, il n'y a pas de valeur optimale, et donc l'amorce avec la valeur la plus élevée est la meilleure. Les résultats obtenus dans cette étude montrent des valeurs de Rp qui oscillent de 1,76 (UBC857) à 8 (UBC834) avec une moyenne de 4,58.

Tableau 11: Les Paramètres de la diversité génétique générée par les marqueurs ISSRs utilisés.

Amorce	Ta	Nb	PPB	PIC	Rp	H	I
UBC-807	45.1	8	50	0.44	2.28	0.14	0.22
UBC-814	44.6	10	90	0.42	2.90	0.34	0.49
UBC-815	46.7	12	100	0.47	5.10	0.38	0.56
UBC-818	43.5	10	70	0.39	3.45	0.28	0.41
UBC-827	46.1	11	81.81	0.49	3.66	0.23	0.35
UBC-828	44.6	11	81.81	0.49	5.10	0.25	0.39
UBC-834	51.2	15	93.33	0.45	8	0.39	0.56
UBC-836	50.5	16	100	0.49	5.03	0.27	0.42
UBC-840	49	12	83.33	0.49	3.1	0.19	0.30
UBC-841	49.1	11	100	0.48	5.38	0.38	0.56
UBC-844	45.9	12	91.66	0.49	5.45	0.35	0.50
UBC-845	46.3	14	92.85	0.49	6	0.27	0.41
UBC-853	43.3	12	83.33	0.48	5.72	0.30	0.45
UBC-855	49.1	16	93.75	0.48	6.34	0.26	0.41
UBC-857	50.2	7	85.71	0.43	1.24	0.13	0.22
Moyenne	-	11.8	88.13	0.46	4.58	0.28	0.42

Ta : Température d'hybridation en C°; *Nb* : Nombre total de fragments amplifiés ; *PPB* : Pourcentage de bandes polymorphes ; *PIC* : Contenu Informatif du Polymorphisme; *Rp* : Pouvoir résolutif ; *H* : Diversité génétique de Nei ; *I* : Indice de Shannon.

Pour estimer la diversité génétique au sein des génotypes étudiés, l'indice de Nei (H) et l'indice de Shannon (I) sont calculés. L'indice de Nei (H) varie de 0,14 obtenu par l'amorce UBC-807 à 0,39 obtenu par l'amorce UBC-834, avec une moyenne de 0,28 et l'indice de Shannon (I) varie de 0,22 pour l'amorce UBC-807 à 0,56 pour l'amorce UBC-834, avec une moyenne de 0,427.

III.2 Structuration des génotypes

La diversité génétique totale (Ht) et la diversité génétique au sein des groupes (Hs) sont respectivement de 0,27 et 0,20. Le coefficient de différenciation génétique (Gst) entre les groupes correspond à 0,27; indiquant que 73 % de la diversité génétique existaient au sein des groupes alors que 27 % de la variabilité se trouvent entre les groupes (Tableau 12).

Tableau 12: Paramètres d'analyses génétique de Nei chez les cultivars de pommier étudiés.

Groupe	TE	PPB (%)	Ht	Hs	Gst	Nm
MAR-AZI	20	84.18	0.26	0.22	0.13	3.31
MAR-KHE	9	71.19	0.24	0.19	0.20	2
MAR-FES	6	65.54	0.24	0.15	0.36	0.86
AZI-KHE	23	83.62	0.26	0.24	0.08	5.58
AZI-FES	20	85.31	0.25	0.2	0.18	2.22
KHE-FES	9	70.62	0.22	0.17	0.25	1.51
CL-VI	29	87.57	0.26	0.23	0.10	4.30
Total	29	87.57	0.27	0.20	0.27	1.34

TE : Taille de l'échantillon ; *PPB* = Pourcentage de bandes polymorphes ; *Ht* = Diversité génétique totale ; *Hs* = Diversité génétique au sein de la population ; *Gst* = Différenciation génétique entre les groupes ; *Nm* = Flux de gènes; *CL*: cultivars locaux, *VI*: Variété Introduites.

La différenciation génétique la plus élevée ($Gst = 0,36$) a été révélée entre les groupes de Marrakech et de Fès (MAR-FES) et la différenciation génétique la plus faible ($Gst = 0,08$) a été observée entre les groupes d'Azilal et Khénifra (AZI-KHE). Le flux génétique (Nm) entre les groupes était de 1,34; il variait de 0,86 entre les groupes MAR-FES à 5,58 entre les groupes AZI-KHE. Parmi l'ensemble des cultivars étudiés, le coefficient de différenciation génétique (GST) et le flux génétique (Nm) entre les cultivars introduits (4 génotypes) et les cultivars locaux (25 génotypes) étaient de 0,10 et 4,30 respectivement. Ces résultats suggèrent la présence d'une diversité génétique considérable avec une différenciation intergroupe assez remarquable.

III.3 Distance génétique et regroupement des cultivars

La matrice des distances génétiques de Nei entre les différents cultivars est représentée dans le [tableau 13](#). L'analyse de cette matrice montre des valeurs qui varient de 0,10 à 0,55. La distance génétique maximale (0,55) témoignant d'une forte divergence a été obtenue entre les cultivars Talhloute-Beldi (TAB) et Amlale (AML), tandis que la distance génétique la plus faible (0,10) est révélée entre les cultivars Golden (GOL) et Oumlile-3 (OUM-3) suggérant leurs grandes similitudes. D'autre part, la corrélation entre la distance génétique et la distance géographique, calculée à l'aide du test de Mantel, s'est avérée statistiquement non significative ($r = 0,23$, $t = 2,45$, $p = 0,075$).

Tableau 13: Matrice des distances génétiques des 29 cultivars étudiés.

	MAT	STAR	AZO-1	LAH-3	OMB	LAM	AZO-3	LAB-3	LAL-1	DEL	TAB	AZB	ZAR	OUM-3	AHM-2	GAL	GOL	AZO-2	AHM-1	OUM-1	LAL-2	LAB-2	OUM-2	LAH-2	LAK	LAH-1	LAB-1	TAL	AML
MAT	***																												
STAR	0.43	***																											
AZO-1	0.39	0.23	***																										
LAH-3	0.30	0.29	0.26	***																									
OMB	0.15	0.38	0.31	0.26	***																								
LAM	0.29	0.23	0.29	0.11	0.26	***																							
AZO-3	0.31	0.39	0.33	0.22	0.29	0.27	***																						
LAB-3	0.30	0.20	0.23	0.29	0.29	0.22	0.34	***																					
LAL-1	0.40	0.36	0.25	0.27	0.35	0.29	0.41	0.29	***																				
DEL	0.32	0.26	0.26	0.19	0.32	0.20	0.29	0.22	0.39	***																			
TAB	0.36	0.46	0.33	0.36	0.39	0.40	0.35	0.42	0.37	0.35	***																		
AZB	0.34	0.42	0.36	0.28	0.34	0.30	0.40	0.32	0.28	0.38	0.33	***																	
ZAR	0.44	0.37	0.35	0.34	0.44	0.38	0.41	0.42	0.42	0.36	0.36	0.36	***																
OUM-3	0.37	0.49	0.36	0.36	0.37	0.38	0.36	0.37	0.41	0.32	0.38	0.35	0.35	***															
AHM-2	0.34	0.42	0.33	0.32	0.34	0.36	0.30	0.39	0.42	0.33	0.35	0.38	0.36	0.17	***														
GAL	0.35	0.36	0.42	0.41	0.35	0.44	0.42	0.45	0.41	0.46	0.41	0.42	0.32	0.41	0.26	***													
GOL	0.34	0.46	0.32	0.31	0.37	0.35	0.32	0.39	0.41	0.33	0.30	0.38	0.33	0.10	0.17	0.31	***												
AZO-2	0.29	0.29	0.25	0.19	0.31	0.23	0.24	0.28	0.41	0.23	0.32	0.36	0.35	0.36	0.38	0.48	0.30	***											
AHM-1	0.37	0.31	0.26	0.22	0.39	0.27	0.29	0.32	0.34	0.26	0.41	0.41	0.41	0.32	0.29	0.46	0.24	0.24	***										
OUM-1	0.29	0.42	0.35	0.28	0.34	0.32	0.29	0.36	0.42	0.36	0.38	0.35	0.36	0.30	0.29	0.37	0.21	0.27	0.26	***									
LAL-2	0.44	0.44	0.35	0.34	0.39	0.41	0.41	0.41	0.36	0.40	0.40	0.33	0.45	0.35	0.40	0.51	0.36	0.33	0.32	0.35	***								
LAB-2	0.29	0.38	0.36	0.27	0.32	0.29	0.31	0.30	0.35	0.36	0.39	0.29	0.41	0.34	0.34	0.40	0.29	0.28	0.29	0.21	0.34	***							
OUM-2	0.33	0.47	0.34	0.35	0.33	0.37	0.34	0.36	0.38	0.37	0.34	0.36	0.42	0.22	0.22	0.40	0.19	0.29	0.26	0.17	0.28	0.27	***						
LAH-2	0.33	0.26	0.26	0.26	0.35	0.25	0.34	0.24	0.36	0.28	0.39	0.34	0.39	0.34	0.32	0.35	0.31	0.24	0.31	0.28	0.37	0.27	0.24	***					
LAK	0.32	0.40	0.28	0.30	0.27	0.32	0.28	0.32	0.38	0.31	0.25	0.41	0.37	0.36	0.32	0.45	0.34	0.28	0.37	0.34	0.37	0.36	0.32	0.27	***				
LAH-1	0.29	0.35	0.26	0.23	0.33	0.22	0.29	0.27	0.35	0.26	0.37	0.32	0.34	0.32	0.31	0.43	0.25	0.17	0.23	0.26	0.29	0.27	0.27	0.23	0.29	***			
LAB-1	0.36	0.41	0.39	0.35	0.41	0.36	0.34	0.35	0.38	0.34	0.44	0.39	0.51	0.31	0.29	0.38	0.26	0.36	0.22	0.25	0.36	0.26	0.23	0.27	0.38	0.30	***		
TAL	0.35	0.52	0.44	0.36	0.35	0.39	0.34	0.38	0.48	0.37	0.48	0.49	0.49	0.28	0.37	0.47	0.34	0.36	0.32	0.23	0.44	0.29	0.23	0.35	0.33	0.30	0.29	***	
AML	0.41	0.50	0.40	0.40	0.41	0.40	0.39	0.38	0.45	0.37	0.55	0.49	0.44	0.32	0.34	0.35	0.32	0.39	0.26	0.29	0.42	0.33	0.30	0.30	0.36	0.35	0.24	0.21	***

Pour estimer les relations phylogénétiques entre les cultivars étudiés, les comparaisons deux à deux des distances génétiques entre les 29 génotypes sont représentées sous forme d'un dendrogramme de type UPGMA (Figure 24).

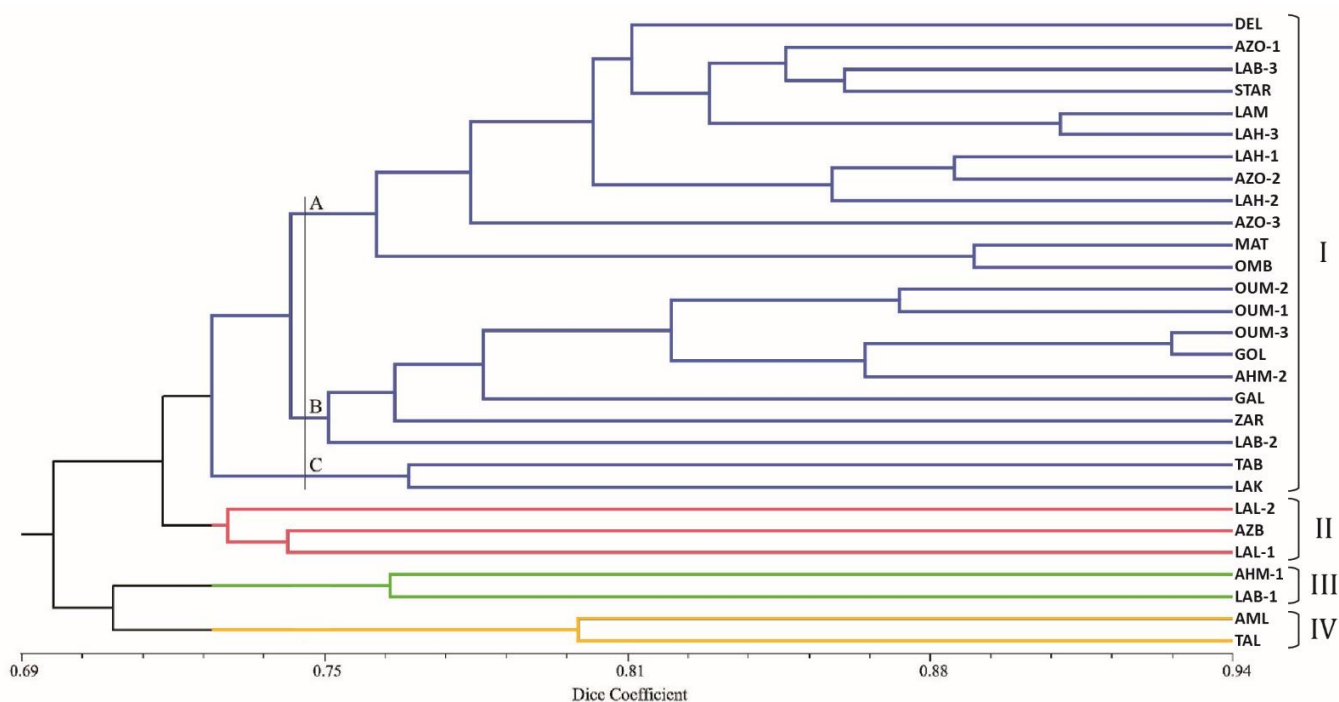


Figure 25: Dendrogramme UPGMA obtenu sur la base des distances génétiques entre les 29 cultivars de pommier étudiés.

L'analyse du dendrogramme obtenu montre la répartition des cultivars en quatre groupes principaux. Le premier groupe (I) comporte le grand nombre de cultivars (22) et il est subdivisé en trois sous-groupe : A, B et C. Le premier sous-groupe (IA) comprenait les cultivars Delicieuse, Azougar-1, Labiad-3, Starkimson, Lamcharat, Lahmar-3, Lahmar-1, Azougar-2, Lahmar-2, Azougar-3, Maticha et Oumlile-Beldi; le deuxième sous-groupe (IB) est composé des cultivars Oumlile-2, Oumlile-1, Oumlile-3, Golden, Ahmri-2, Gala, Zarbana et Labiad-2. Les deux cultivars Talhlout-Beldi et Laakri constituent le troisième sous-groupe (IC). Quant au deuxième groupe (II), il est formé de 3 cultivars, à savoir Lahlou-2, Azougar Beldi et Lahlou-1, dont les deux derniers présentaient plus de similarité génétique. Le troisième et le quatrième groupe (III et IV) comprennent chacun deux cultivars. Les cultivars Ahmri-1 et Labiad-1 forment le cluster-III alors que les cultivars Amllale et Talhloute forment le cluster-IV. En outre, l'analyse de ces résultats montre bien que certains cultivars avec la même nomination (Labiad-1/Labiad-2/Labiad-3 et Ahmri-1/Ahmri-2), sont regroupés dans des clusters différents (cluster-III/cluster-IC/cluster-IA et cluster-III/cluster-IB, respectivement), ce qui suggère qu'ils pourraient être des homonymes. En revanche, d'autres cultivars portant des noms différents

(Lamcharat/Lahmar-3 ; Oumlile-3/Golden et Maticha/Oumlile-Beldi), mais présentent des caractéristiques pomologiques similaires ont été regroupés dans les mêmes clusters (cluster-IA et cluster-IB), ce qui suppose qu'ils pourraient être des synonymes.

On note également que la majorité des cultivars qui appartient à la même région ont tendance à se répartir sur l'ensemble du dendrogramme sans former leurs propres regroupements. En effet, certains cultivars sont génétiquement très proches malgré leur éloignement géographique, ce qui montre bien que le regroupement des cultivars étudiés est indépendant de l'appartenance géographique. De même les variétés Introduites étaient distribuées d'une manière indépendante les unes des autres dans le dendrogramme.

Pour confirmer les résultats précédents, la structure génétique des cultivars de pommier étudiée a été reconstruite en utilisant un modèle basé sur l'approche de regroupement bayésienne présenté par Pritchard et ses collaborateurs (Pritchard et al. 2010). Il consiste à regrouper les échantillons en fonction de la composition génétique des individus, sans tenir compte de leur origine ou provenance. Les résultats ont révélé un pic de la valeur Delta-K ($\Delta K = 62,96$), généré à $K = 3$ (Figure 25). De même, la similitude moyenne par paire d'exécutions révèle sa valeur maximale ($H' = 0,992$) à $K=3$, ce qui signifie que le nombre de populations le plus probable estimé était trois. Donc, il est possible de distinguer trois groupes génétiquement différents au sein de l'ensemble des cultivars considérés dans cette étude (Figure 26). Les résultats de cette analyse ont montré qu'il n'y avait pas de tendance géographique définie dans la distribution des cultivars ce qui était cohérent avec les résultats obtenus par l'analyse hiérarchique.

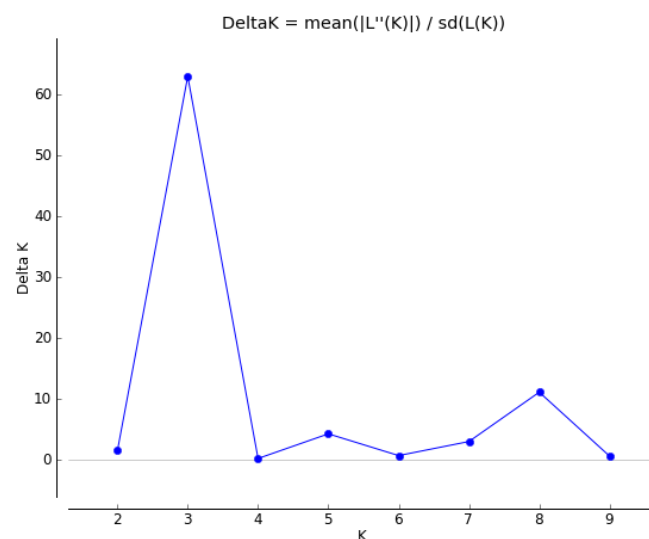


Figure 26: Indices $\ln P(D)$ et K calculés afin de déterminer le nombre de populations (K) le plus probable.

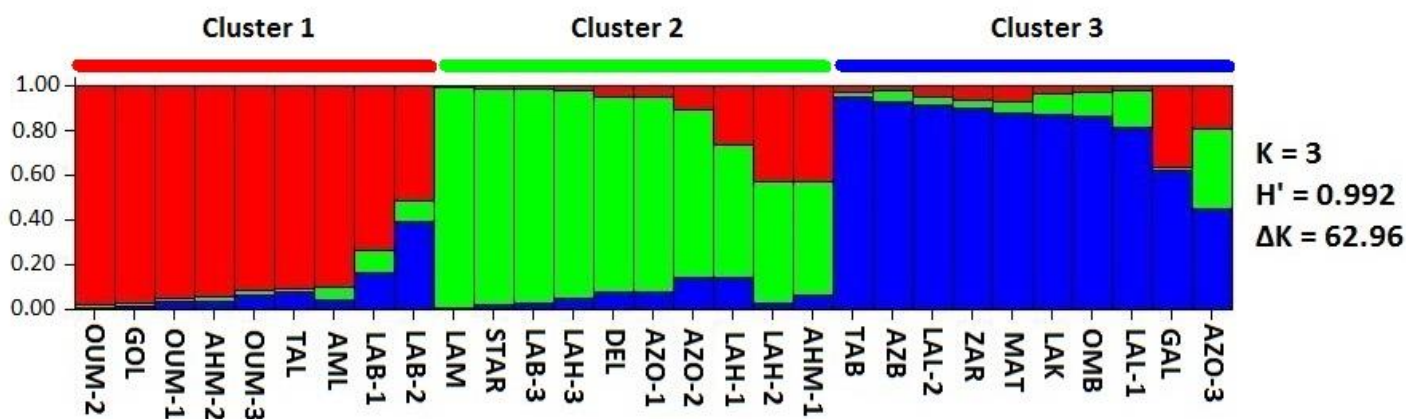


Figure 27: Structuration des cultivars étudiés par population suivant la méthode de Pritchard et al. (2010).

Selon Pritchard et al. (2010), si un individu montre un coefficient d'appartenance (q_i) supérieur à 0,8 pour un groupe (Cluster) donné, il est considéré comme pur et qu'il originaire de ce groupe tandis que les individus avec un coefficient d'appartenance inférieur à 0,8 pour un des groupes révélés, ont été considérés comme "admixture" ou hybrides ; c'est-à-dire que le logiciel n'arrive pas à les assigner à un des groupes révélés.

Les trois groupes estimés par cette analyse ont montré des pourcentages relativement faibles à intermédiaire des admixtures. Cependant, les pourcentages des cultivars purs dans les groupes I (rouge), II (vert) et III (bleu) étaient respectivement de 77,7 % (7), 60 % (6) et 80 % (8) ce qui signifie que l'analyse bayésienne réussit à assigner la majorité des génotypes étudiés confirmant ainsi les résultats des analyses précédentes. Concernant les quatre variétés introduites, elles ont été regroupées séparément dans les trois groupes sans former leur propre groupe, ce qui appuie les résultats de l'analyse hiérarchique.

IV. Discussion

Plusieurs types de marqueurs moléculaires ont été largement utilisés pour évaluer la variabilité génétique du pommier dans plusieurs pays (Goulão et Oliveira 2001 ; Ping et al. 2011; Pereira-Lorenzo et al. 2018b ; Mariano et al. 2019). Dans le présent travail, les 15 amorces ISSR utilisés ont généré 177 bandes avec un pourcentage de polymorphisme de 88,13 % ce qui témoigne d'une variabilité génétique intra-spécifique très élevée. La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature (tableau 14), montre que le nombre moyen de bandes polymorphes par amorce (MBPA) et le pourcentage de polymorphisme (PPB) obtenus sont relativement élevés (MBPA = 10.33; PPB = 88,13%). En effet, chez

les plantes hautement hétérozygotes comme le pommier, il faut s'attendre à des taux élevés de polymorphisme (Mariano et al. 2019). Les taux de polymorphisme relativement faibles (entre 55,20 et 68,50 %) observés dans les études faites par Ping et al. (2011) ; Uzun et al. (2016) et Mariano et al. (2019) peuvent être expliqués par le fait que ces travaux ont été réalisés sur des génotypes issus à partir de quelques croisements, avec une base génétique commune.

Tableau 14: Quelques paramètres de diversité génétique basés sur les marqueurs ISSR obtenus par différentes études sur le pommier.

Auteurs	Pays	TE	NA	MBPA	PPB
Goulão & Oliveira (2001)	Portugal	41	7	32	89.10%
Smolik et al. (2004)	Pologne	8	11	32	83.00%
Smolik & Krzysztozek (2010)	Pologne	8	17	7.5	69.50%
Ping et al. (2011)	Chine	31	20	9.95	55.20%
Pathak & Dhawan (2012)	Inde	22	15	8.9	----
Uzun et al (2016)	Turquie	158	14	5,4	68,5 %
Fazeli et al (2016)	Iran	25	10	----	85%
Mariano et al (2019)	Brésil	60	9	8.33	58.13%
<u>La présente étude</u>	Maroc	29	15	10.33	88,13%

TE : Taille de l'échantillon ; NA : Nombre d'amorces utilisés ; MBPA : Moyenne des bandes polymorphes par amorce ; PPB : Pourcentage de bandes polymorphes

De même, les valeurs obtenues pour les PIC sont assez élevées ; la valeur moyenne obtenue pour l'ensemble des amorces est de 0,46 ce qui indique que l'ensemble des amorces ISSR utilisées s'avèrent très efficace dans l'évaluation de la diversité génétique des différents cultivars étudiés. À titre de comparaison, des valeurs faibles de PIC (0,15 et 0,41) ont été reportées dans les études d'Uzun et al. (2016) et de Mariano et al. (2019) pour des collections de pommier turques et brésiliennes, respectivement. En outre, la valeur moyenne du RP (4,58) obtenue dans cette étude est supérieure à celle obtenue par Mariano et al. (2,48 ; 2019). Ceci consolide et justifie bien le choix d'utiliser ce type de marqueurs pour analyser la diversité génétique des cultivars de pommier au Maroc.

Les distances génétiques observées entre les génotypes étudiés se situent entre 10 et 55% ce qui est largement supérieur aux intervalles de distances génétiques obtenues par d'autres études similaires sur le pommier. En effet, Goulão et Oliveira (2001), Smolik et Krzysztozek (2010) et Zhang et al. (2012) ont trouvé des distances génétiques qui varient de 8 à 29 %, 15 à 35 % et 6 à 30 %, respectivement. Ce résultat montre bien que les génotypes de pommier

considéré dans cette étude ont une variabilité génotypique importante ce qui peut être exploité par les sélectionneurs du pommier au Maroc.

L'espèce *Malus domestica*, comme de nombreuses autres espèces de la famille des Rosacées, présente une auto-incompatibilité gamétophytique, ce qui force l'allogamie (Pereira-Lorenzo et al. 2018b). Par conséquent, l'espèce présente une grande variabilité génétique. Dans le cas présent, notre étude a montré une valeur élevée de la diversité génétique ($H_t=0,27$). Cette valeur est supérieure à celle trouvée par Wu et al. (2019) chez des cultivars de prune chinoise ($H_t=0,23$) révélée à l'aide des marqueurs ISSRs. En revanche, la diversité génétique au sein des groupes ($H_s=0,20$) était légèrement inférieure à celle rapportée par Wu et al. (2019, $H_s=0,21$).

En ce qui concerne la différenciation génétique entre les groupes ($G_{st}=0,27$), elle s'est révélée supérieure à celle obtenue par Carrasco et al. (2012) et par Wu et al. (2019) pour des cultivars de prunes chinoises ($G_{st}=0,055$) et japonaises ($G_{st}=0,083$) respectivement. Ce niveau élevé de différenciation génétique en congruence avec un flux de gènes relativement faible ($N_m=1,34$) entre les quatre groupes géographiques pourrait être dû à la distance géographique qui limite l'échange du matériel végétal entre ces régions. En effet, la différenciation génétique la plus grande ($G_{st} = 0.36$) et le flux de gènes le plus faible ($N_m = 0.86$) ont été enregistrés entre les régions les plus éloignées géographiquement, Marrakech et Fès, tandis que la différenciation génétique la plus faible ($G_{st} = 0.08$) et le flux de gènes le plus grand ($N_m = 5.58$) ont été enregistrés entre les régions les plus proches géographiquement, Azilal et Khénifra indiquant une corrélation positive entre la différenciation génétique et la distance géographique et une corrélation négative entre le flux de gènes et la distance géographique. Lorsqu'on compare les génotypes étudiés deux à deux, à l'aide du test de Mantel, les résultats montrent qu'il n'y pas de corrélation significative entre les distances génétiques et géographiques ce qui peut apparaître contradictoire, mais ça peut être expliqué par le fait que chaque génotype étudié est représenté par un seul individu, la chose qui pourrait être statistiquement insuffisante pour mettre en évidence ce type de corrélation.

Le regroupement basé sur un modèle bayésien et l'analyse hiérarchique ont permis de regrouper les génotypes étudiés dans des clusters significatifs. Cependant, certains cultivars dont le nom et les caractéristiques des fruits sont similaires ont été regroupés séparément, ce qui suggère que ces cultivars pourraient être des homonymes. De même, certains cultivars avec des nominations différentes ont été regroupés conjointement, ce qui suggère qu'ils pourraient être des synonymes. En effet, les cultivars de pommier sont généralement dénommés par les agriculteurs sur la base des caractéristiques de leurs fruits (forme et couleur

du fruit, saveur, date de maturité), ce qui conduit souvent à des confusions d'appellations. D'autre part, nos résultats montrent qu'il n'y avait pas de séparation nette entre les génotypes introduits et locaux ce qui peut être expliqué par une base génétique commune entre eux. Cette explication est supportée par un grand flux de gènes ($N_m = 4,30$) et une différenciation génétique faible ($G_{st} = 0,10$) entre ces deux types de génotypes. À titre de comparaison, [Uzun et al. \(2016\)](#) ont constaté que les cultivars de pommier turc étaient mélangés et regroupés avec des variétés étrangères ce qui indique leurs origines génétiques similaires. En revanche, [Pereira-Lorenzo et al. \(2008\)](#) ont trouvé des différences génétiques significatives entre des accessions de pommiers espagnols et les cultivars étrangers. De même, [Gasi et al. \(2010\)](#) ont constaté que les cultivars de pommier traditionnels de Bosnie-Herzégovine se différenciaient assez clairement des cultivars étrangers, à l'exception de quelques génotypes.

V. Conclusion

Au cours de cette partie, la technique ISSR a été mise à profit en vue d'examiner la diversité génétique et d'explorer les relations phylogénétiques entre les cultivars du pommier au Maroc. Les résultats obtenus mettent en évidence la présence d'une corrélation positive entre la différenciation génétique à travers les régions et la distance géographique qui les sépare. Par conséquent, les régions de Marrakech et Fès sont les plus différenciées et les régions d'Azilal et Khénifra les moins différenciées. Nous avons révélé aussi l'existence de possibles homonymes et synonymes dans les noms des cultivars donnés par les agriculteurs. D'autre part, Les analyses statistiques n'arrivent pas à distinguer entre les génotypes locaux et les variétés introduites qui se sont révélées étroitement liées. D'une façon générale, le polymorphisme détecté a révélé une variabilité génétique considérable ($H_t=0,27$) avec un intervalle de distances génétiques assez larges (10% - 55%) entre les cultivars étudiés, ce qui montre que les génotypes étudiés peuvent présenter une ressource phylogénétique à fort potentiel qui ouvre la voie vers la sélection des cultivars performants. Finalement, bien que les marqueurs ISSR utilisés aient montré une bonne structuration des génotypes de pommiers étudiés, l'utilisation des marqueurs co-dominants comme l'SSR serait avantageuse et nous permettrait de mieux comprendre la structure génétique du germoplasme du pommier au Maroc.

*Chapitre 4 : Évaluation des
marqueurs SSR en étudiant
quatre populations du
pommier au Maroc*

I. Introduction

Le patrimoine génétique de n'importe quelle espèce peut être caractérisé en utilisant des marqueurs morphologiques ou moléculaires ou les deux, bien que le génotypage soit le plus répandu pour résoudre la majorité des problèmes associés à la caractérisation morphologique (Donini et al., 2000 ; Ban et al., 2014). Dans les deux chapitres précédents, nous avons essayé de caractériser la plupart des cultivars de pommier qui existe au Maroc en utilisant des marqueurs pomologiques et moléculaires du type ISSR et les résultats obtenus sont satisfaisants. Cependant, dans le contexte du développement très rapide que reconnaissent les techniques de biologie moléculaire, l'utilisation d'autres techniques plus puissantes devient nécessaire pour consolider et ou enrichir les résultats obtenus. Le choix d'une nouvelle technique de biologie moléculaire dépend de l'objectif de l'étude, des contraintes financières, du savoir-faire (compétences) et du matériel disponible (Kafkas et al., 2008; Pavlovic et al., 2012). Au sein des différents types de marqueurs moléculaires, les microsatellites (SSR) sont parmi les plus utilisés pour l'identification des cultivars en raison de leur hérédité co-dominante, de leur polymorphisme, de leur grand pouvoir discriminatoire, de leur reproductibilité, de leur méthode relativement facile et de leur coût relativement faible par rapport aux autres techniques (Larsen et al., 2018). De plus, les marqueurs SSR sont encore très utilisés pour les études de diversité génétique chez les espèces ligneuses (Van Laere et al. 2018), et, spécifiquement, pour la caractérisation génétique du pommier. En effet, ces marqueurs ont été utilisés pour la caractérisation génétique de nombreuses collections nationales de pommier, comme celles de Lituanie (Mažeikienė et al. 2019), du Brésil (Mariano et al. 2019), de Grèce (Ganopoulos et al. 2018), de l'Italie (Marconi et al. 2018), du Danemark (Larsen et al. 2017), de la France (Lassois et al. 2016), du Portugal (Ferreira et al. 2016), de la Turquie (Uzun et al. 2016), de la Hongrie (Király et al. 2012) et de l'Iran (Gharghani et al. 2009). L'objectif de ce travail peut-être résumé en deux points :

Premièrement, dans une perspective d'économiser le temps et l'argent dans les prochaines études de caractérisation génétiques du pommier au Maroc, nous avons essayé d'évaluer 26 amorces SSR dans 27 génotypes du pommier afin de sélectionner les meilleures.

Deuxièmement, le choix des génotypes à étudier n'est pas fait au hasard. En effet nous avons essayé d'évaluer la diversité génétique de 27 génotypes locaux appartenant aux quatre zones montagneuses pour accroître la connaissance des ressources génétiques locales du pommier au Maroc. Cette connaissance peut être primordiale dans les futures décisions de conservation et ou de valorisation.

II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de 27 génotypes collectés entre le mois de mars et avril 2018 dans quatre régions de culture de pommier au Maroc (Tableau 15 ; Figure 27).

Tableau 15: Les génotypes de pommier analysés et leurs origines géographiques.

N°	Génotypes	Code	Origine	Latitude	Longitude
1	Lahlou-1	LAL-1	Ait Mhamed	31°52'	6°29'
2	Lahlou-2	LAL-2	Ait Mhamed	31°53'	6°30'
3	Lahlou-3	LAL-3	Ait Mhamed	31°54'	6°31'
4	Lahmar	LAH	Ait Mhamed	31°55'	6°32'
5	Labiad-1	LAB-1	Ait Mhamed	31°56'	6°33'
6	Labiad-2	LAB-2	Ait Mhamed	31°57'	6°34'
7	Labiad-3	LAB-3	Ait Mhamed	31°58'	6°35'
8	Labiad-4	LAB-4	Ait Mhamed	31°59'	6°36'
9	Labiad-5	LAB-5	Ait Mhamed	31°60'	6°37'
10	Beldi-1	BLD-1	Naour	32°29'	5°55'
11	Beldi-2	BLD-2	Naour	32°29'	5°55'
12	Beldi-3	BLD-3	Naour	32°29'	5°55'
13	Talhloute-1	TAL-1	Ouaouizeght	32°10'	6°21'
14	Talhloute-2	TAL-2	Ouaouizeght	32°11'	6°22'
15	Talhloute-3	TAL-3	Ouaouizeght	32°12'	6°23'
16	Talhloute-4	TAL-4	Ouaouizeght	32°13'	6°24'
17	Talhloute-5	TAL-5	Ouaouizeght	32°14'	6°25'
18	Talhloute-6	TAL-6	Ouaouizeght	32°15'	6°26'
19	Talhloute-7	TAL-7	Ouaouizeght	32°16'	6°27'
20	Talhloute-Beldi	TAL-B	Ouaouizeght	32°17'	6°28'
21	Laakri-1	LAK-1	Moulay Idriss Zerhoun	34° 36'	5°31'
22	Laakri-2	LAK-2	Moulay Idriss Zerhoun	34° 37'	5°32'
23	Laakri-3	LAK-3	Moulay Idriss Zerhoun	34° 38'	5°33'
24	Laakri-4	LAK-4	Moulay Idriss Zerhoun	34° 39'	5°34'
25	Laakri-5	LAK-5	Moulay Idriss Zerhoun	34° 40'	5°35'
26	Laakri-6	LAK-6	Moulay Idriss Zerhoun	34° 41'	5°36'
27	Laakri-7	LAK-7	Moulay Idriss Zerhoun	34° 42'	5°37'

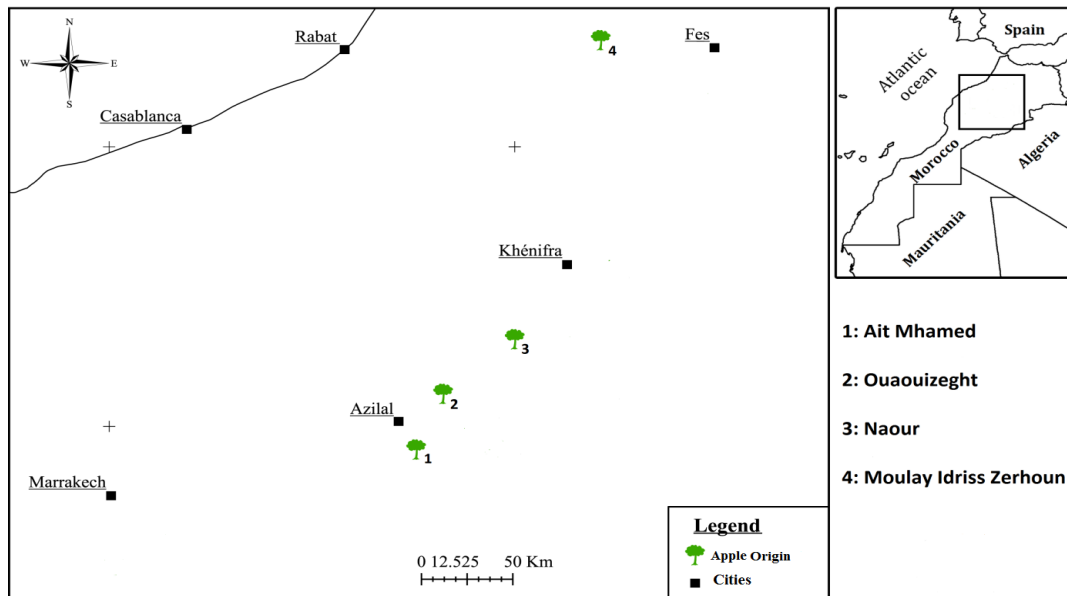


Figure 28: Localisation géographique des génotypes étudiés de Malus × domestica.

II.2 Extraction d'ADN

Dans cette étude, l'ADN total des échantillons a été extrait à partir de feuilles fraîches à l'aide du kit d'extraction d'ADN végétal Nucleo Spin II (Macherey & Nagel, Düren, Allemagne) conformément aux instructions du fabricant. En effet, l'utilisation des échantillons frais collectés dans la phase active de croissance de la plante donne généralement de meilleurs résultats (Black-Samuelsson et al. 1997, Ferreira & Grattapaglia 1998). Diverses techniques d'extraction traditionnelle ont été développées par plusieurs auteurs qui sont devenues des références en la matière (Doyle & Doyle 1987, 1990 ; Edwards et al. 1991). Par ailleurs, il existe des kits d'extraction commercialisés par des firmes spécialisées (Gentra Systems Puregene DNA isolation Kit, DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen, Viogene Plant Genomic DNA Extraction System Kit), lesquels permettent principalement une meilleure extraction d'ADN de point de vue qualitative et quantitative dans un temps relativement court.

II.3 Analyse des microsatellites

26 amorces microsatellites (SSR) ont été utilisées dans cette étude (Tableau 16). Elles ont été organisées dans 10 réactions RCR multiplexes (Hi6, Hi4ab, Hi5-10, Hi13a, Hi13b, Hi4b, MP01, MP02, MP03 et MP04) précédemment optimisées chez diverses espèces génétiquement proches de *Malus domestica* (Patocchi et al. 2009).

L'analyse du polymorphisme des séquences SSR est basée sur une amplification spécifique par PCR de loci microsatellites à l'aide d'une paire d'amorce unique (l'amorce sens est marquée par un Fluorochrome détectable), spécifique des régions flanquantes. Le séquenceur intègre les différentes émissions de fluorescence (émises suite à l'excitation par un laser des fluorochromes marquant les différents marqueurs SSR) sous forme de Pic et à l'aide du logiciel, on peut distinguer les différents marqueurs par leur marquage fluorescent et les allèles par leur taille (estimée en fonction des différents pics générés par un marqueur de taille).

Tableau 16: Caractéristiques des 26 amorces SSRs utilisées dans cette étude.

Amorce	Séquence de l'amorce sens.	Séquence de l'amorce anti-sens	Fluorochromes
Ch01f03	GAGAAGCAAATGCAAAACCC	CTCCCCGGCTCCTATTCTAC	FAM
Ch01h01	GAAAGACTTGCAAGTGGGAGC	GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT	FAM
Ch01h10	TGCAAAGATAGGTAGATATATGCCA	AGGAGGGATTGTTTGTGCAC	PET
Ch02c06	TGACGAAATCCACTACTAATGCA	GATTGCGCGCTTTTAAACAT	PET
Ch02d08	TCCAAAATGGCGTACCTCTC	GCAGACACTCACTACTATCTCTC	VIC
Ch05f06	TTAGATCCGGTCACTCTCCACT	TGGAGGAAGACGAAGAAGAAAG	NED
Ch01f02	ACCACATTAGAGCAGTTGAGG	CTGGTTTGTTCCTCCAGC	FAM
Ch02c11	TGAAGGCAATCACTCTGTGC	TTCCGAGAATCCTCTTCGAC	PET
Hi02c07	AGAGCTACGGGATCCAAAT	GTTTAAGCATCCCGATTGAAAGG	VIC
Ch02c09	TTATGTACCAACTTTGCTAACCTC	AGAAGCAGCAGAGGAGGATG	VIC
Ch03d07	CAAATCAATGCAAACTGTCA	GGCTTCTGGCCATGATTTTA	VIC
Ch04c07	GGCCTTCCATGTCTCAGAAG	CCTCATGCCCTCCACTAACA	VIC
GD12	TGAGGTGTTTCTCCATTGGA	CTAACGAAGCCGCCATTTCTTT	NED
CH02b03b	ATAAGGATACAAAAACCTACACAG	GACATGTTTGTTGAAAACCTTG	HEX
CH02b12	GGCAGGCTTTACGATTATGC	CCCCTAAAAGTTCACAGGC	PET
Hi03a10	GGACCTGCTTCCCCTTATTC	GTTTCAGGGAACCTGTTTGATGG	NED
MS06g03	CGGAGGGTGTGCTGCCGAAG	GCCCAGCCCATATCTGCT	FAM
CH_Vf1	ATCACCACCAGCAGCAAAG	CATACAAATCAAAGCACAACCC	FAM
CH03d12	GCCCAGAAGCAATAAGTAAACC	ATTGCTCCATGCATAAAGGG	FAM
CH05a05	TGTATCAGTGGTTTGCATGAAC	GCAACTCCCAACTCTTCTTTCT	HEX
CH05f04	GATGATGGTGTCTCTCGTTATT	TTATGTTGGGTAATGTCTTCCG	NED
CH05g08	CCAAGACCAAGGCAACATTT	CCCTTCACCTCATTCTCACC	PET
NH009b	CCGAGCACTACCATTGA	CGTCTGTTTACCGCTTCT	FAM
CH04e03	TTGAAGATGTTTGGCTGTGC	TGCATGTCTGTCTCCTCCAT	NED
CH02g01	GATGACGTCGGCAGGTAAG	CAACCAACAGCTCTGCAATC	NED
NZ02b01	CCGTGATGACAAAAGTGCATGA	ATGAGTTTGATGCCCTTGGA	HEX

Les six réactions PCR multiplexes Hi6, Hi4ab, Hi5-10, Hi13a, Hi13b et Hi4b ont été réalisées en utilisant les protocoles décrits par [Patocchi et al. \(2009\)](#). Les quatre réactions PCR multiplexes qui restent MP01, MP02, MP03 et MP04 ont été réalisées dans un volume

réactionnel de 15 ml : 7,5 ml de QIAGEN Multiplex Master Mix, 10 à 20 μ M de chaque amorce et 10 ng d'ADN matrice (Tableau 17).

Tableau 17: Description des réactions PCR multiplexes (MP01, MP02, MP03, MP04) utilisées pour l'amplification des microsatellites.

MP01			MP02			MP03			MP04		
Volume(μ L)			Volume(μ L)			Volume(μ L)			Volume(μ L)		
Mix qiagen		7.5	Mix qiagen		7.5	Mix qiagen		7.5	Mix qiagen		7.5
CH01H1			NZ05g08			Hi02c07			CH04c07		
0	VIC	0.15	(20 μ M)	HEX	0.30	(10 μ M)	VIC	0.15	(10 μ M)	VIC	0.15
(10 μ M)		0.15			0.30			0.15			0.15
CH01H0			CH05f06			CH01f02			GD12		
1	PET	0.15	(10 μ M)	PET	0.30	(20 μ M)	6-FAM	0.30	(10 μ M)	PET	0.15
(10 μ M)		0.15			0.30			0.30			0.15
CH01f03			CH02d08			CH02c11			CH03d07		
b	6-FAM	0.15	(10 μ M)	NED	0.15	(10 μ M)	NED	0.15	(20 μ M)	6-FAM	0.30
(10 μ M)		0.15			0.15			0.15			0.30
CH02c06			CH04e05						CH02c09		
(20 μ M)	NED	0.30	(20 μ M)	6-FAM	0.30				(10 μ M)	NED	0.15
		0.30			0.30						0.15
Eau distillée		4	Eau distillée		3.40	Eau distillée		4.30	Eau distillée		4
DNA		2	DNA		2	DNA		2	DNA		2
Total		15	Total		15	Total		15	Total		15

VIC, PET, 6-FAM, NED, HEX : Fluorochromes utilisés.

Le programme de PCR par essais (en anglais touchdown PCR) suivant : (température d'hybridation initiale de 60° C, diminuant de 1° C par cycle jusqu'à 55° C) a été utilisé. Pour le génotypage, les produits PCR marqués ont été analysés dans un séquenceur automatique (ABI PRISM X3730XL, Applied Biosystems) et les allèles ont été validés et notés à l'aide du logiciel GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems).

II.4 Analyses statistiques

II.4.1 Calcul des paramètres de diversité

Le nombre d'allèles par locus (N_a), le nombre d'allèles effectifs par locus (N_e), l'indice de Shannon (I), l'hétérozygotie observée (H_o), l'hétérozygotie attendue (H_e), la distance génétique de Nei (Nei, 1978) et l'indice de fixation (F_{st}) ont été calculés à l'aide du logiciel GenAlex (Peakall and Smouse, 2006). Selon Serrote et al. (2020), les fréquences

alléliques dans l'échantillon total ont été utilisées pour calculer le Contenu informationnel du polymorphisme (PIC).

II.4.2 Classification hiérarchique

En vue d'évaluer la diversité génétique et d'estimer les distances génétiques entre les paires de génotypes, le coefficient de similarité de Jaccard a été calculé entre les génotypes de pommier étudiés à l'aide du logiciel DARwin (Perrier et Jacquemoud-Collet 2006). En se basant sur la matrice de similarité, l'arbre de classification (dendrogramme) entre les génotypes a été obtenu par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) en utilisant le même logiciel.

II.4.3 Analyse en coordonnées principales (PCoA)

Les données générées ont également été soumises à une analyse en coordonnées principales (PCoA) à l'aide du programme GenAlex. Il s'agit d'une analyse en composante principale (ACP) mais appliquée à une matrice de dissimilarités. C'est une méthode de visualisation de données qui consiste à transformer des variables liées entre elles en nouvelles variables décorrélatées les unes des autres. Ces nouvelles variables sont les composantes principales. L'ACP et l'ACoP sont proches, car elles permettent de représenter des individus dans un espace de faible dimension avec des axes optimaux en termes de variabilité.

II.4.4 Analyse bayésienne

Afin de déduire la structure génétique des génotypes étudiés et de définir le nombre de groupes génétiques auxquels il appartient, une analyse bayésienne a été réalisée à l'aide du logiciel STRUCTURE (Pritchard et al. 2010). Cette analyse est basée sur des simulations de type MCMC (Markov Chain Monte Carlo) pour déduire le meilleur « K », paramètre représentant le nombre théorique de populations ancestrales desquelles appartiennent les individus.

La première étape dans cette analyse consiste à rechercher le meilleur K, en testant K de 1 à 10. Dix séries (répétition) indépendantes ont été effectuées pour chaque K en utilisant les paramètres statistiques suivants :

- ✓ Length of Burnin period: 1000
- ✓ Number of MCMC reps after Burnin: 50 000

Plus les valeurs de ces deux paramètres statistiques sont grandes plus l'analyse est puissante et elle peut prendre de quelques heures à quelques jours. Le nombre idéal de groupes génétiques (le meilleur K) a été déterminé ensuite par une statistique ad-hoc (ΔK) basée sur le taux de changement entre les valeurs successives de K à l'aide du programme Structure Harvester (Earl and Von-Holdt 2012). Ce programme met en œuvre la méthode d'Evanno (Evanno et al. 2005). Pour obtenir un alignement optimal des séries indépendantes, le logiciel CLUMPP (Kopelman et al. 2015) a été utilisé pour calculer la similarité moyenne par paire des séries (H'). Plus les valeurs de ΔK et H' sont grandes, plus K est le plus probable.

II.4.5 Analyse de filiation

Afin d'étudier la relation entre les cultivars étudiés, une analyse de paternité a été réalisée pour l'ensemble des 27 génotypes à l'aide du logiciel CERVUS 3.0.7 (Kalinowski et al. 2007) et ceci pour vérifier l'identité du parent maternel et l'identité du parent paternel. Cette analyse a été réalisée avec 26 génotypes comme parents candidats. Les autres paramètres de simulation étaient les suivants : "offspring"= 100 000 ; "prop. Sampled"= 0,3 ; "prop. Loci typés"= 0,8 ; "prop. Loci mistyped"= 0,01 ; et le nombre maximal de discordances (mismatch) de loci tolérées était de deux seulement. Enfin, pour ne révéler que les parentés robustes, nous avons limité l'étude aux inférences de relations "deux parents- descendants". Pour chaque trio détecter. Le rapport de vraisemblance (LOD score) et la valeur Delta (c'est-à-dire la différence entre les scores LOD des deux parents candidats les plus probables) ont été calculés, tous les deux avec un niveau de confiance supérieur à 95 %. Le rapport de vraisemblance (LOD score) est le logarithme décimal du ratio entre la probabilité qu'un individu (père potentiel) soit le vrai père et la probabilité que cet individu ne soit pas le vrai père. Plus ce score est élevé, plus le père candidat est probablement le vrai père.

II.4.6 Analyse statistique pour la sélection des amorces SSR

Afin d'identifier les meilleures amorces pour les études de variabilité génétique chez le pommier, les 26 amorces utilisées ont été organisées en fonction des valeurs du contenu informationnel du polymorphisme (PIC). Les amorces qui présentaient les valeurs les plus élevées de PIC ont été sélectionnées. Ensuite, la robustesse de la sélection des amorces a été évaluée par une analyse comparative entre le dendrogramme et le graphe PCoA obtenu avec les dix amorces sélectionnées et le dendrogramme et le graphe PCoA obtenu à partir de toutes les amorces utilisées.

III. Résultats

III.1 Polymorphisme des microsatellites et diversité génétique

Dans la présente étude, un ensemble informatif de 26 marqueurs SSR a été utilisé pour estimer la diversité génétique de 27 génotypes de pommier au Maroc. Il est important de noter que la technique SSR est utilisée pour la première fois pour le typage et l'identification du pommier au Maroc. Ces amorces SSR ont généré un total de 195 allèles. Le nombre d'allèles par locus variait de 5 pour les amorces Ch01h01, Ch01h10, CH02b03b, CH05f04 et NZ02b01 à 10 pour les amorces Ch01f02, GD12, CH02b12, CH03d12 et CH04e03, avec une moyenne de 7,5 (Tableau 18). La taille des allèles révélés varie de 78 paires de base (pb) pour l'amorce CH02b03b à 209 pb pour l'amorce CH05g08. Le nombre effectif d'allèles (N_e) varie de 1,54 (CH05g08) à 6,51 (Ch04c07) avec une moyenne de 4,62 allèles par locus. L'indice de Shannon (I) allait de 0,80 (CH05g08) à 1,98 (CH02c11). En outre, le niveau le plus élevé d'hétérozygotie attendue ($H_e=0,85$) a été enregistré par les amorces Ch01f03 et Ch04c07, tandis que le niveau le plus faible a été obtenu par l'amorce CH05g08 ($H_e=0,35$). L'hétérozygotie observée (H_o) montre des valeurs comprises entre 0,32 (CH05g08) et 1 (Ch05f06, Ch01f02, Ch02c09). La probabilité d'identité P (ID) calculée pour les loci individuels varie de 0,042 pour les locus Ch01f03 et Ch04c07 à 0,434 pour le locus CH05g08 et le P (ID) cumulé sur l'ensemble des 26 loci était de $4,62 \times 10^{-29}$.

Le contenu informationnel du polymorphisme (PIC) varie de 0,11 pour l'amorce CH05g08 à 0,82 pour les amorces Ch01f03, Ch02c11 et Ch04c07 avec une moyenne de 0,71. A l'exception du locus CH05g08, tous les autres locus ont des valeurs PIC supérieures à 0,50, ce qui indique un pouvoir discriminant élevé des SSR utilisées. D'autre part, la fréquence allélique majeure (Maf) varie de 0,22 pour le locus Ch04c07 à 0,80 pour le locus CH05g08, avec une moyenne de 0,35. En outre, les résultats indiquent que parmi les 195 allèles amplifiés dans cette étude, 55 allèles (28,20 %) présentent une fréquence inférieure à 0,05, et 41 allèles (21,03 %) ont été amplifiés dans un seul génotype de pommier. Ils peuvent être donc considérés comme des allèles rares et uniques, respectivement. Ce résultat montre un niveau de polymorphisme significatif et laisse suggérer que les cultivars de pommier local au Maroc ont une diversité génétique considérable.

Tableau 18: Estimation de la diversité génétique de 27 géotypes de pommier au Maroc à l'aide de 27 marqueurs SSR, Plage des allèles (PA), nombre d'allèles (Na), nombre effectif d'allèles (Ne), indice d'information de Shannon (I), hétérozygotie observée (Ho), hétérozygotie attendue (He), contenu en information du polymorphisme (PIC), fréquences alléliques majeures (Maf), probabilité d'identité non lié P(ID). *: Dans la colonne " P(ID)", la moyenne est remplacée par le P(ID) cumulé, qui est le produit des P(ID) des loci individuels. Les dix amorces ombrées sont les plus informatives (valeurs élevées de PIC).

Amorces	PA (bp)	Na	Ne	I	Ho	He	PIC	Maf	P(ID) unrelated
Ch01f03	141-182	8	6.49	1.95	0.76	0.85	0.82	0.24	0.042
Ch01h01	110-126	5	3.73	1.4	0.59	0.73	0.67	0.37	0.118
Ch01h10	94-110	5	2.95	1.3	0.7	0.66	0.56	0.52	0.155
Ch02c06	219-255	9	5.31	1.89	0.62	0.81	0.78	0.33	0.057
Ch02d08	213-228	6	5.59	1.76	0.58	0.82	0.79	0.25	0.057
Ch05f06	170-192	8	5.25	1.85	1	0.81	0.77	0.34	0.058
Ch01f02	173-218	10	4.31	1.79	1	0.77	0.72	0.4	0.081
Ch02c11	210-240	9	6.34	1.98	0.96	0.84	0.82	0.24	0.044
Hi02c07	103-148	7	4.52	1.69	0.94	0.78	0.73	0.35	0.079
Ch02c09	234-258	9	5.28	1.82	1	0.81	0.78	0.29	0.062
Ch03d07	184-228	6	4.84	1.64	0.83	0.79	0.75	0.25	0.075
Ch04c07	98-137	9	6.51	1.98	0.93	0.85	0.82	0.22	0.042
GD12	158-200	10	5.32	1.94	0.89	0.81	0.78	0.35	0.054
CH02b03b	78-127	5	2.72	1.2	0.48	0.63	0.52	0.52	0.190
CH02b12	126-156	10	5.32	1.9	0.77	0.81	0.78	0.31	0.058
Hi03a10	205-290	7	3.53	1.53	0.46	0.72	0.64	0.46	0.114
MS06g03	155-191	8	5.48	1.85	0.76	0.82	0.79	0.3	0.056
CH_Vf1	135-179	6	4.12	1.5	0.85	0.76	0.70	0.31	0.101
CH03d12	110-158	10	5.32	1.91	0.52	0.81	0.78	0.28	0.058
CH05a05	199-231	6	4.54	1.61	0.91	0.78	0.73	0.32	0.082
CH05f04	160-170	5	3.17	1.35	0.77	0.68	0.60	0.48	0.142
CH05g08	154-209	6	1.54	0.8	0.32	0.35	0.11	0.8	0.434
NH009b	138-167	9	5.22	1.85	0.58	0.81	0.77	0.29	0.062
CH04e03	188-225	10	4.17	1.7	0.69	0.76	0.71	0.37	0.092
CH02g01	198-228	7	4.72	1.69	0.78	0.79	0.75	0.28	0.076
NZ02b01	216-238	5	3.72	1.42	0.56	0.73	0.66	0.35	0.118
Mean*	–	7.5	4.62	1.66	0.74	0.76	0.71	0.35	4.6210⁻²⁹

Les paramètres de diversité génétique calculés pour chaque origine géographique sont résumés dans le [tableau 19](#).

Le nombre d'allèles par locus (Na) varie de 1,69 dans la région de Naour à 5,23 dans la région d'Ouaouizeght ([tableau 19](#)). Le nombre d'allèles effectifs (Ne) est compris entre 1,68

à Naour et 3,70 à Ouaouizeght. De même, L'indice de Shannon (I) varie de 0,47 à Naour à 1,39 à Ouaouizeght.

L'hétérozygotie attendue (He) et le nombre d'allèles privés (Np) varie selon l'origine géographique. Cependant, les valeurs les plus faibles de ces deux paramètres ont été trouvées dans la région d'Naour (0,34 et 0,27) et les valeurs les plus élevées dans la région d'Ouaouizeght (0,69 et 1,42). Ce résultat indique bien que la diversité génétique la plus élevée se trouve dans la région d'Ouaouizeght et la plus faible se trouve dans la région d'Naour.

Tableau 19: Estimation de la diversité génétique des génotypes étudiés regroupés par origine. Nombre d'individus (N), nombre d'allèles (Na), nombre effectif d'allèles (Ne), indice de Shannon (I), nombre d'allèles privés (Np), hétérozygotie attendue (He).

Origin	N	Na	Ne	I	Np	He
Ait Mhamed	9	4.46	3.1	1.22	0.96	0.64
Ouaouizeght	8	5.23	3.7	1.39	1.42	0.69
Naour	3	1.69	1.68	0.47	0.27	0.34
Moulay Idriss Zerhoun	7	2.27	2.04	0.73	0.85	0.49

III.2 Classification hiérarchique et analyse en coordonnées principales :

Le dendrogramme UPGMA, basé sur la matrice de distance génétique, a classé les génotypes étudiés en quatre groupes principaux avec un coefficient de similarité de 40 % (Figure 28). Le premier groupe (I) renferme des génotypes originaires de la région d'Ouaouizeght (Talhloute-1, Talhloute-6, Talhloute-7 et Talhloute-Beldi) et un génotype de la région Ait Mhamed, Lahlou-1. Quant au deuxième groupe (II), il est formé par les génotypes Labiad-3, Labiad-4, Labiad-5, Lahlou-2 et Lahlou-3, originaires de la région d'Ait Mhamed. Les génotypes originaires de Moulay Idriss Zerhoun (Laakri-1, Laakri-2, Laakri-3, Laakri-4, Laakri-5, Laakri-6 et Laakri-7) constituent le troisième groupe, tandis que le quatrième groupe (IV), rassemble deux génotypes (Labiad-1 et Labiad-2) originaires d'Ait Mhamed, deux génotypes (Talhloute-4 et Talhloute-5) originaires d'Ouaouizeght et trois génotypes (Beldi-1, Beldi-2 et Beldi-3) originaires de Naour. En outre, deux groupes de doublons (c'est-à-dire des individus qui présentent un profil génétique identique) ont été obtenus,

Beldi-1/Beldi-2 et Laakri-5/Laakri-6. D'une façon générale, on note que la majorité des génotypes qui viennent de la même région ont tendance à se regrouper. Cependant, certains génotypes portant les mêmes noms comme (Labiad-1 et Labiad-3), (Talhloute-1, Talhloute-2, Talhloute-3 et Talhloute-4) et (Lahlou-1, Lahlou-2, Lahlou-3) sont regroupés dans différents groupes, ce qui suggère qu'ils peuvent être des homonymes.

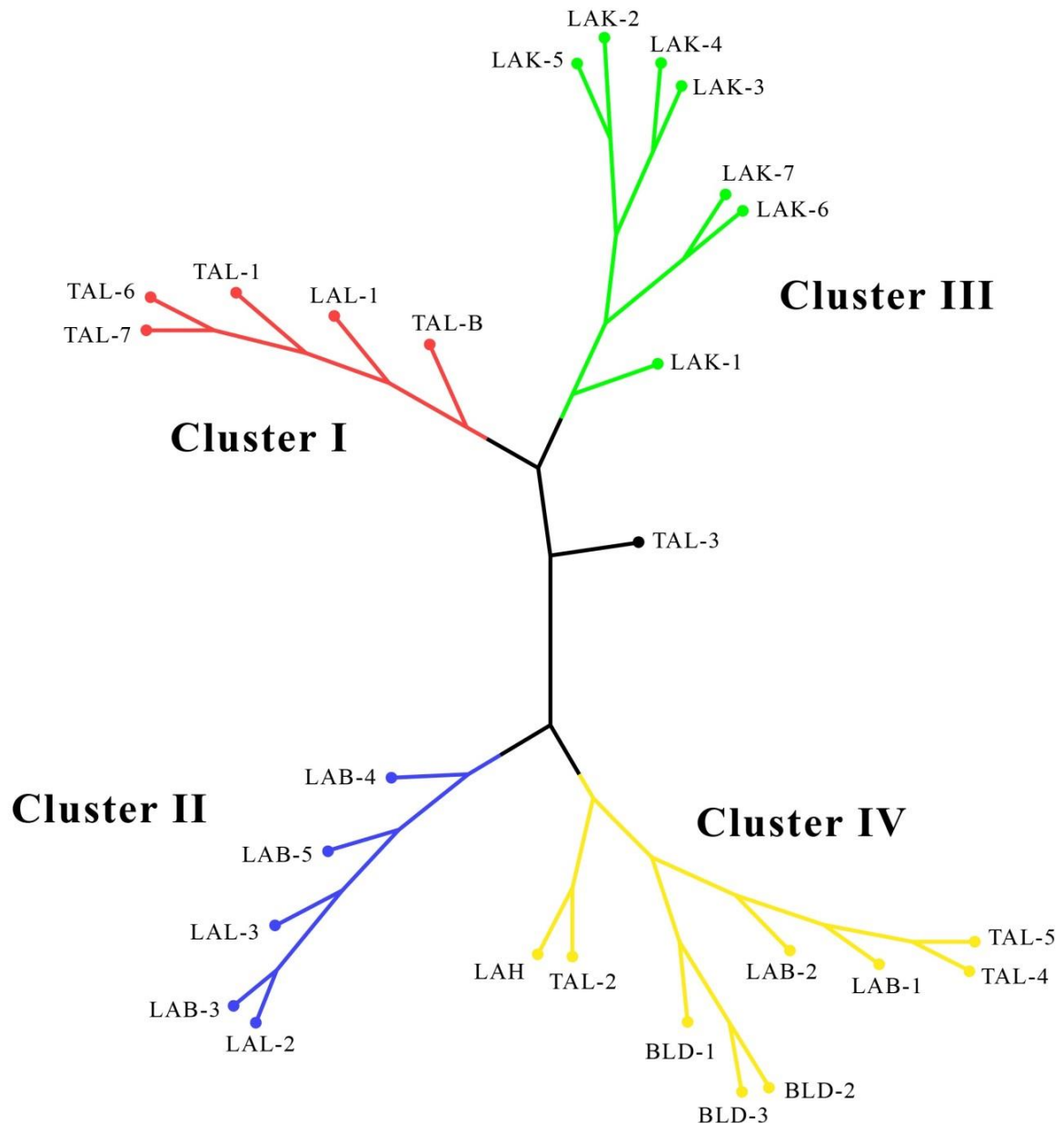


Figure 29: Dendrogramme UPGMA basé sur les 26 marqueurs SSR.

D'autre part, les données générées par les marqueurs SSR ont été soumises à une analyse en coordonnées principales (PCoA). Les deux premiers axes ont expliqué 40,72 % de la variance totale, 24,21 % et 16,51 %, respectivement. De même l'examen de la dispersion des cultivars dans les deux premiers axes, montre la formation de quatre groupes distincts (Figure 29), ce qui corrobore les résultats observés dans le dendrogramme UPGMA. On note que la plupart des génotypes ont été regroupés. Néanmoins, trois génotypes, dont Talhloute-2, Talhloute-3 et Lahmar, ont été isolés des autres, sans former leur propre groupe.

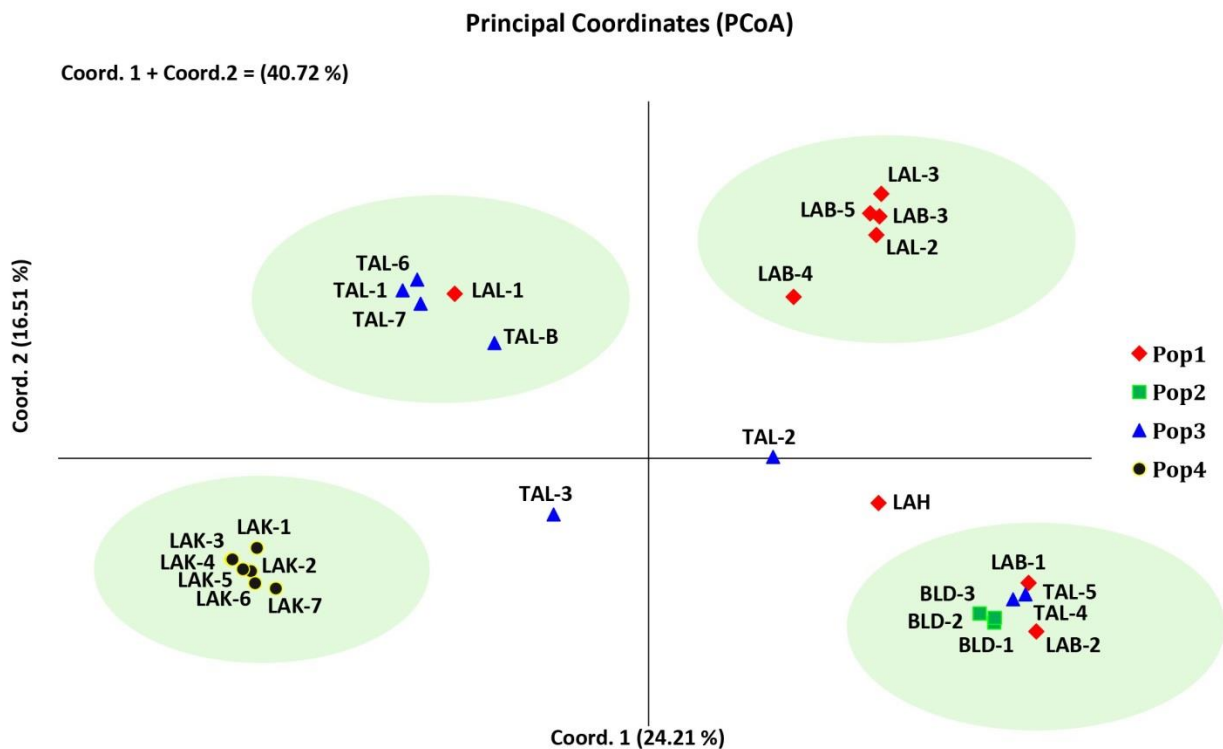


Figure 30: Analyse en coordonnées principales (PCoA) des génotypes étudiés. Populations (Pop1 : Ait Mhamed, Pop2 : Ouaouizeght, Pop3 : Naour, Pop4 : Moulay Idriss Zerhoun).

III.3 Structure et différenciation génétique

À l'aide du logiciel STRUCTURE (Pritchard et al. 2010), une approche bayésienne a été utilisée pour déterminer le groupement le plus probable de clusters génétiques (K). Cette méthode a révélé une valeur maximale de ΔK (9,84) pour $K = 4$ (Figure 30). Ces résultats nous laissent suggérer que quatre est le nombre le plus probable des groupes génétiques (Figure 31), ce qui confirme les résultats observés dans le dendrogramme UPGMA et le graphe PCoA.

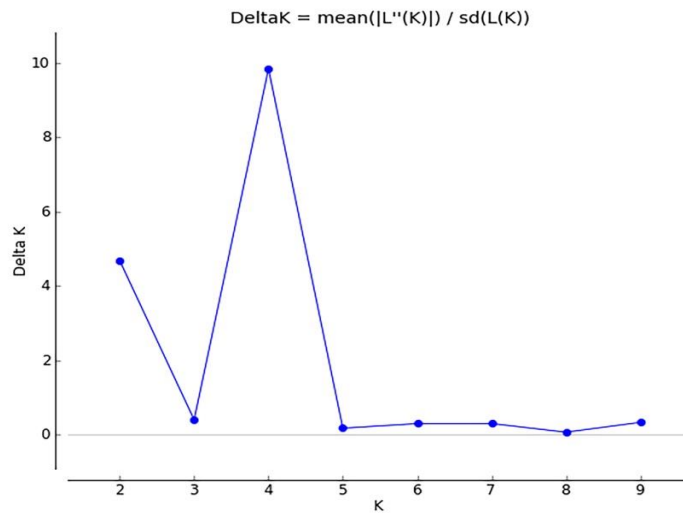


Figure 31: Méthode graphique permettant la détermination du nombre optimal K de clusters selon les paramètres d'Evanno et al. (2005).

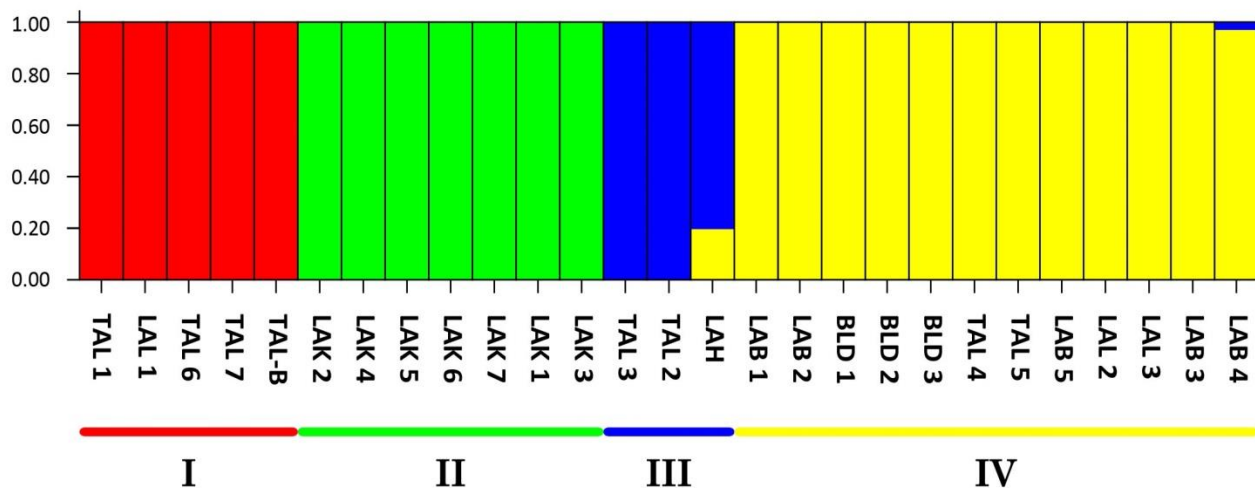


Figure 32: Analyse de la structure génétique des cultivars étudiés, basée sur les données de 26 marqueurs SSR en utilisant le logiciel STRUCTURE.

Le premier groupe (en rouge) est composé de cinq génotypes (Talhloute-1, Lahlou-1, Talhloute-6, Talhloute-7 et Talhloute-Beldi) appartenant à deux origines géographiques (Ait Mhamed et Ouauizeght). Le deuxième groupe (en Vert) rassemble les génotypes Laakri qui proviennent exclusivement de Moulay Idriss Zerhoun. Trois génotypes ont été rassemblés dans le troisième groupe (bleu) à savoir, Talhloute-3, Talhloute-2, et Lahmar originaire des régions d'Ait Mhamed et d'Ouaouizeght. Quant au quatrième groupe (jaune), il réunit 12 génotypes (Labiad-1, Labiad-2, Labiad-3, Labiad-4, Labiad-5, Lahlou-2, Lahlou-3, Beldi-1, Beldi-2, Beldi-3, Talhloute-4 et Talhloute-5) qui proviennent de trois origines géographiques différentes (Ait Mhamed, Naour et Ouauizeght).

Selon [Pritchard et al. \(2010\)](#), on considère les génotypes comme purs lorsque le coefficient d'appartenance (q_i) à un cluster génétique est supérieur à 0,80 et comme hybrides ou admixed lorsque ce coefficient est inférieur à 0,80. Il convient de mentionner que tous les génotypes, à l'exception de Lahmar (LAH), présentent une grande affinité à leurs groupes (cluster génétique), avec un coefficient d'appartenance supérieur à 0,80.

Les valeurs moyennes de la différenciation génétique (F_{st}) au sein des quatre groupes I, II, III et IV sont respectivement 0,61, 0,54, 0,01 et 0,26. Les valeurs F_{st} de tous les groupes, sauf le troisième (0,01), indiquent une forte différenciation génétique. De plus, la divergence des fréquences alléliques entre les groupes était de 0,21 entre le groupe I et II, 0,17 entre le groupe I et III, 0,27 entre le groupe I et IV, 0,14 entre le groupe II et III, 0,28 entre le groupe II et IV et enfin 0,06 entre le groupe III et IV. Ces valeurs relativement élevées de divergence allélique ($> 0,05$) montrent des différences génétiques significatives entre ces groupes.

III.4 Analyse de filiation

Les relations parents/descendants des 27 génotypes étudiés ont été explorées par le logiciel CERVUS ([Kalinowski et al. 2007](#)). Grâce aux résultats obtenus nous avons identifié 13 relations (parents/descendants) comprenant 23 génotypes avec un niveau de confiance de 95 % ([Figure 32](#)).

La comparaison des relations entre parents et descendants, soutenue par des rapports de vraisemblance (LOD score) élevés, a mis en évidence une étroite similitude entre les cultivars qui partagent la même origine. Cependant, les relations parents/descendants entre les génotypes provenant de :

- Moulay Idriss Zerhoun (Aakri-3 x Aakri-5 = Aakri-4, LOD : 46.1),
- Ouaouizeght (Talhloute-1 x Talhloute-7 = Talhloute-6, LOD : 46.7),
- Ait Mhamed (Labiad-3 x Lahlou-2 = Lahlou-3, LOD : 48,5) et
- Naour (Beldi-1 x Beldi-3 = Beldi-2, LOD : 55,2) ont été correctement déduites.

D'autre part, deux liens de parenté entre les génotypes originaire de Ouaouizeght (Talhloute-4, Talhloute-5, Talhloute-6, Talhloute-7) et d'Ait Mhamed (Lahlou-1, Labiad-1) ont été identifiés. Le génotype Lahlou-1 est inféré comme étant une descendance de Talhloute-7 et Talhloute-6 (LOD : 39.2), alors que le génotype Talhloute-5 est inféré comme étant une descendance de Talhloute-4 et Labiad-1 (LOD : 51).

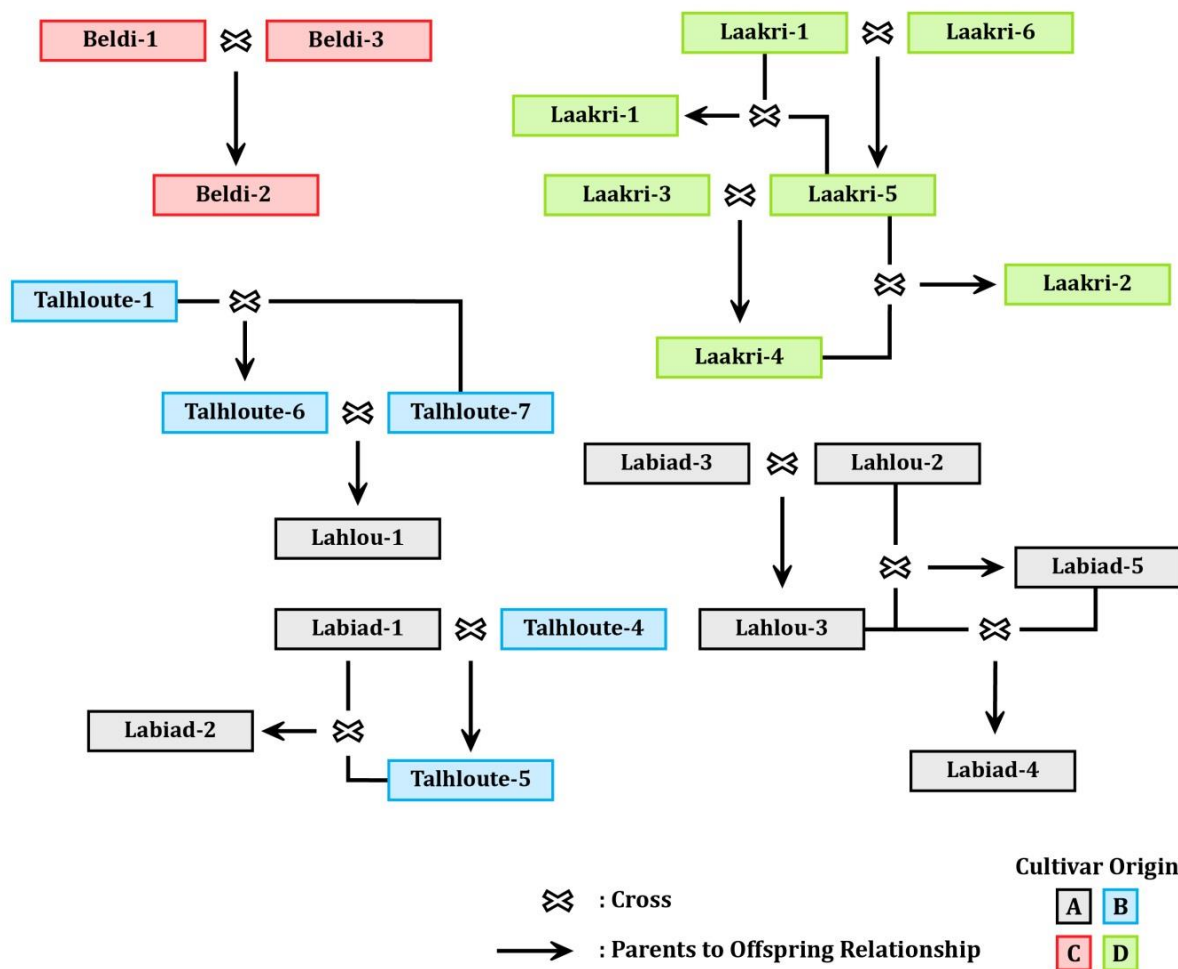
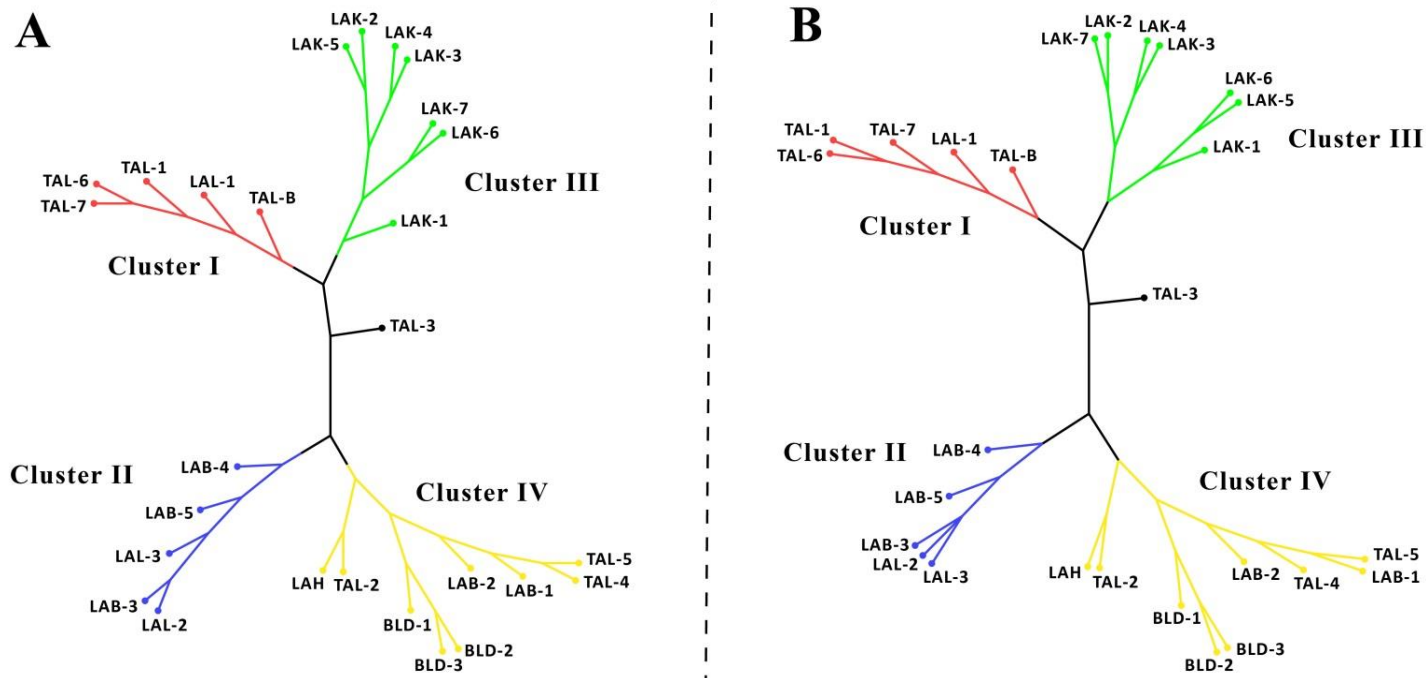


Figure 33: Relations génétiques de premier ordre (des trios, parents/descendance) détectées au sein des génotypes étudiés. Les origines des génotypes sont indiquées avec des couleurs différentes selon le code inséré : (A : Ait Mhamed, B : ouaouizegrht, C : Naour et D : Moulay driss Zerhoune).

III.5 Sélection des amorces SSR pour les études de diversité génétique chez le pommier

Les meilleures (les plus élevées) valeurs de PIC ont été utilisées pour sélectionner les dix amorces les plus informatives : Ch01f03, Ch02c06, Ch02d08, Ch02c11, Ch02c09, Ch04c07, GD12, CH02b12, MS06g03, CH03d12. Le test de robustesse des amorces sélectionnées a prouvé leurs grandes fiabilités. Cependant, l'analyse hiérarchique a montré une grande similarité entre le regroupement des génotypes en utilisant les données des 10 amorces sélectionnées et le regroupement des génotypes préalablement obtenu en utilisant les données des 26 amorces étudiées (Figure 33).



*Figure 34: Dendrogrammes de 27 génotypes de pommier obtenus avec les données de 26 amorces SSR (A) et avec les données de 10 amorces SSR sélectionnées comme les meilleures pour les études génétiques chez *Malus domestica* (B).*

Parmi tous les génotypes étudiés, la similarité génétique obtenue avec les données des 26 amorces variait de 0,06 à 0,95, avec une moyenne de 0,40 et la similarité génétique obtenue avec les données des 10 amorces sélectionnées variait de 0,07 à 0,96, avec la même valeur moyenne de 0,40. De plus, en se basant sur les données générées par les 26 amorces et les données générées par les 10 amorces, l'analyse en coordonnées principales présente des résultats similaires (Figure 34).

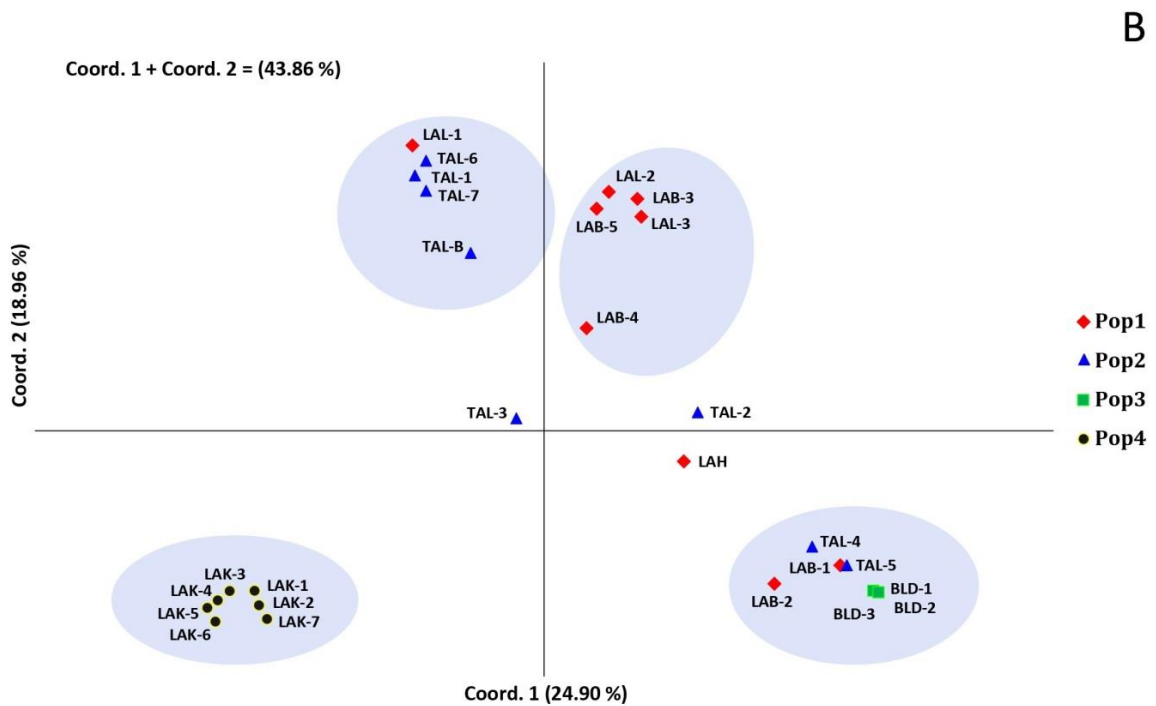
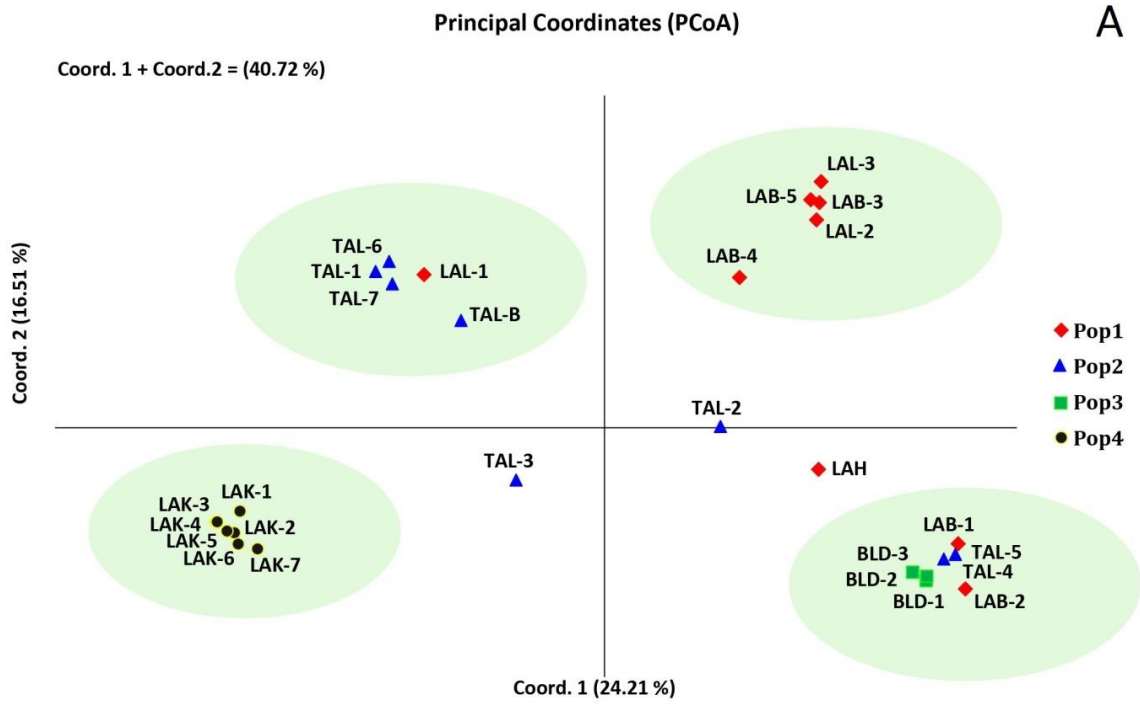


Figure 35: Analyse en coordonnées principales de 27 géotypes de pommier obtenus avec les données de 26 amorces SSR (A) et les données de 10 amorces SSR choisies comme les meilleures pour les études de diversité génétique chez *Malus domestica* (B). (Pop 1 : Ait Mhamed ; Pop 2 : ouaouizegrht ; Pop 3 : Naour et Pop 4 : Moulay driss Zerhoune).

En effet, les deux graphes PCoA produits par les deux types de données (26 et 10 amorces) ont montré la séparation des 27 génotypes en quatre groupes distincts. Les deux premiers axes dans les deux graphes PCoA (générés par 26 et 10 amorces) ont expliqué 40,72 % et 43,86 % de la variance totale, respectivement.

IV. Discussion

IV.1 Polymorphisme des microsatellites et diversité génétique

Les marqueurs moléculaires ont été utilisés avec succès pour évaluer la diversité génétique de nombreuses espèces fruitières (Reddy et al. 2002). Ils sont particulièrement utiles dans la caractérisation des accessions et des cultivars, dans la détection des duplications de matériel génétique. (Goulão et al. 2001). A travers ces marqueurs moléculaires, les microsatellites (SSR) sont parmi les plus efficaces pour l'évaluation de la diversité génétique des espèces végétales y compris le pommier (Alcaraz and Hormaza 2007 ; Ferrara et al. 2014 ; Liang et al. 2015 ; Lassois et al. 2016 ; De Carvalho Santos et al. 2019). À notre connaissance, le présent travail constitue la première étude de la diversité génétique du pommier au Maroc à l'aide des marqueurs SSR.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont révélé un niveau modéré de polymorphisme. Le nombre d'allèles par locus variait de 5 à 10 avec un moyen de 7,5. Comparé à d'autres études dont le nombre de génotypes (N) analysés est grand, le nombre moyen d'allèles par locus dans notre étude ($N_a = 7,5$) est beaucoup plus faible que celui rapporté par Lassois et al. (2016, $N = 2163$ et $N_a = 19,5$), Pereira-Lorenzo et al. (2018b, $N = 634$ et $N_a = 18,61$) et Marconi et al. (2018, $N = 175$ et $N_a = 14,6$). Ce nombre faible d'allèles par locus obtenu dans notre travail peut être expliqué par le faible nombre de génotypes étudiés ($N = 27$). En effet, d'autres études avec une taille relativement similaire montrent un nombre moyen d'allèles par locus (N_a) qui varie entre 3,29 et 9,78 (Gasi et al. 2010 ; Garkava-Gustavsson et al. 2013 ; Ganopoulos et al. 2018 ; Kumar et al. 2019 ; Arnal et al. 2020). En effet, selon Liang et al. (2015), la diversité allélique des locus SSR chez le pommier variait en fonction de la taille de la population. Le nombre d'allèles effectifs (N_e) pour tous les locus SSR était de 120,03, ce qui représente plus de la moitié (61,53 %) du nombre total d'allèles par locus. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Arnal et al. (2020), Ferreira et al. (2016), et Zhang et al. (2012), chez des cultivars de pommier espagnols, portugais et chinois. D'autre part, la valeur moyenne de l'hétérozygotie attendue obtenue au cours de ce travail (0,76) est assez similaire à celle rapportée par Ferreira et al. (2016) chez des cultivars du pommier au Portugal (0,75).

Cependant, elle est inférieure à celle enregistrée chez les cultivars de pommier en Italie (0,81) (Marconi et al. 2018), mais elle est supérieure à celle rapportée chez les cultivars du pommier grecques (0,63) (Liang et al. 2015). En outre, l'hétérozygotie observée ($H_o = 0,74$) est relativement proche de l'hétérozygotie attendue ($H_e = 0,76$) ce qui est en accord avec les résultats observés par Lassois et al. (2016) chez les cultivars de pommier en France ($H_o = 0,83$; $H_e = 0,82$). Parmi les 26 marqueurs SSR utilisés dans cette étude, 19 ont montré une valeur PIC supérieure à 0,70, ce qui indique que ces marqueurs SSR ont un niveau élevé d'informativité. D'autre part, les résultats obtenus ont montré la présence de 55 allèles rares (leur fréquence inférieure à 0,05) (28,20 %) et 41 allèles uniques (présent dans un seul génotype) (21,03 %) dans l'ensemble des allèles détectés. En effet, la détection des allèles rares et uniques au sein des génotypes peut fournir une information utile pour maintenir la diversité génétique de l'espèce (Potts et al. 2012 ; Szczecińska et al. 2016). En comparaison avec d'autres travaux chez le pommier, des valeurs plus faibles ont été rapportées par Omasheva et al. (2018) chez les cultivars de pommiers cultivés au Kazakhstan (10,9 % des allèles sont uniques) et par Kumar et al. (2019) chez les génotypes de pommiers sauvages indiens (8,33% et 11,4 % des allèles sont rares et uniques, respectivement).

IV.2 Structure et différenciation génétique

Le PCoA et l'analyse hiérarchique ont révélé une séparation claire des génotypes étudiés en quatre groupes distincts, à l'exception des génotypes Lahmar, Talhloute-2 et Talhloute-3 qui ont été isolés de ces quatre groupes. D'autre part, les marqueurs SSR utilisés ont été révélés capables d'identifier les accessions dupliquées avec un haut degré de précision. Cependant, deux groupes de génotypes, Beldi-1/Beldi-2 et Laakri-5 / Laakri-6 se sont avérés être des doublons. Il convient de signaler que les génotypes Beldi-1/Beldi-2 et Beldi-3 ne se différencient que par un seul locus microsatellite, ce qui peut être attribué à une mutation spontanée pendant la propagation végétative. Habituellement, les noms des cultivars de pommier sont donnés par les agriculteurs sur la base de traits phénotypiques, fortement influencés par l'environnement et les pratiques agricole, (Feroni et al. 2012 ; Heinonen et al. 2019), ce qui augmente les problèmes de nomination erronée et la confusion au sein des ressources génétiques locales. C'est probablement le cas pour les groupes de génotypes " Talhloute-1, Talhloute-2, Talhloute-3 et Talhloute-4 ", " Lahlou-1, Lahlou-2, Lahlou-3 " et " Labiad-1, Labiad-3 " qui partagent le même nom mais ont été regroupés dans des clusters différents. D'autres études sur les marqueurs SSR ont également montré ce problème d'appellations erronées chez le pommier dans d'autre pays, notamment en France, en Italie, en Espagne et au Portugal (Liang et al. 2015 ; Lassois et al. 2016; Ferreira et al. 2016;

[Pereira-Lorenzo et al. 2018b](#)). Les résultats du PCoA et de l'analyse hiérarchique ont montré aussi que, les génotypes de Moulay Idriss Zerhoun (Laakri) ont moins de chances d'échanger leurs gènes avec les génotypes des autres régions. Ceci peut être expliqué par le fait que la région de Moulay Idriss Zerhoun est relativement isolée géographiquement dans une région montagneuse de la province de Meknès.

Pour obtenir une image encore plus claire des relations génétiques entre les génotypes analysés, une méthode de regroupement basée sur un modèle bayésienne a été utilisée. Cette analyse a confirmé la différenciation entre les génotypes étudiés et validé le modèle de regroupement en quatre groupes distincts, principalement en fonction de l'origine géographique, confirmant ainsi les résultats des analyses précédentes. Selon [Li et al. \(2014\)](#), si la valeur alpha générée par cette analyse tend vers zéro, cela signifie que la majorité des génotypes étudiés appartenant à des populations bien distinctes, alors qu'une valeur alpha supérieure à 1 indique que tous les génotypes étudiés sont des hybrides ([Ostrowski et al. 2006](#)). Dans la présente étude, la faible valeur d'alpha (0,026) obtenue indique la présence d'un petit nombre d'hybrides. Cependant, les fractions d'appartenance ont révélé qu'un seul génotype (Lahmar, $qI < 80$) est considéré comme hybride, ce qui indique un flux génétique restreint entre les individus. Enfin, il convient de mentionner que l'ensemble de la variation génétique est maintenu à l'intérieur des groupes plutôt qu'entre les groupes ($F_{st} = 0,28$). Cela peut être expliqué par le faible flux génétique entre les quatre régions. Par rapport à d'autres études, la valeur de l' F_{st} obtenue (0,28) était considérablement plus grande que celles rapportées par [Pereira Lorenzo et al. \(2007, \$F_{st} = 0.058\$ \)](#) ; [Gharghani et al. \(2009, \$F_{st} = 0.087\$ \)](#); [Gasi et al. \(2010, \$F_{st} = 0.019\$ \)](#) ; [Lassois et al. \(2016, \$F_{st} = 0.014 - 0.048\$ \)](#) et [Pereira-Lorenzo et al. \(2018b, \$F_{st} = 0.072\$ \)](#), indiquant que les génotypes étudiés constituent un réservoir de gènes qui mérite d'être sauvegardé.

IV.3 Analyse de filiation

Selon le test de filiation, la plupart des relations déduites impliquent des génotypes de même origine. Néanmoins, les génotypes d'Ait Mhamed et d'Ouaouizeght ont tendance à s'hybrider. Ceci peut être expliqué par la faible distance géographique et l'échange relativement important du matériel végétal entre ces deux origines. Ce résultat confirme la similitude pomologique entre les génotypes originaires de ces deux régions. En effet, nos travaux précédents sur la variabilité pomologique ont montré que les trois cultivars Labiad, Lahlou et Talhloute de ces régions présentent des fruits de la même couleur ([Khachtib et al. 2020](#)). De même, la forme des fruits, le poids des fruits et la teneur en solides solubles ($^{\circ}$ Brix)

des cultivars Lahlou et Talhloute sont similaires et les génotypes Labiad et Lahlou présentent un degré d'acidité très proche (Khachtib et al. 2020). D'autre part, les liens de parentés déduits dans cette étude sont solidement établis de sorte que les liens génétiques entre les génotypes sont valides indépendamment de leurs noms. En effet, ces résultats ont montré une concordance élevée avec les analyses précédents, l'analyse bayésienne, l'analyse hiérarchique et l'analyse en coordonnées principales. Enfin, dans une étude similaire Salvi et al. (2014) suggèrent que 27 marqueurs SSR sont le minimum à utiliser pour une reconstruction complète de l'arbre de filiation. Cependant, les relations généalogiques établies, doivent être considérées comme préliminaires jusqu'à ce que des données supplémentaires soient disponibles pour la confirmation.

IV.4 Sélection des amorces SSR pour les études de diversité génétique chez le pommier

La sélection des amorces ne peut être considérée comme efficace que lorsque les amorces sélectionnées pour différencier une espèce présentent des résultats similaires à ceux obtenus en utilisant toutes les amorces disponibles (Fedrigo et al. 2016). Généralement, dans une étude de variabilité génétique, un grand nombre d'amorces est utilisé. Par contre, beaucoup de travaux ont signalé qu'il est possible de diminuer le nombre des amorces utilisées sans perdre en efficacité dans les résultats (Isshiki et al. 2008). Ces auteurs ont testé 100 amorces ISSR pour la discrimination de huit cultivars d'aubergine (*Solanum melongena*) et ont conclu que 34 amorces sont suffisantes pour différencier avec fiabilité les différents génotypes.

L'utilisation des indices comme le PIC s'est avérée efficace dans la sélection des amorces AFLP et ISSR chez plusieurs espèces, telles que *Jathopha curcas* (Tatikonda et al. 2009 ; Grativol et al. 2011), *Ipomoea batatas* (Camargo et al. 2013), *Stenocarpella maydis* (Fedrigo et al. 2016), *Achyrocline flaccida* (Rosa et al. 2017) et *Malus domestica* (Mariano et al. 2019).

Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que l'indice PIC a permis de sélectionner avec succès 10 amorces SSR à partir de 26 utilisées au début pour caractériser 27 génotypes de pommier. En effet, la similarité génétique moyenne entre les 27 génotypes était la même (0,40) lorsqu'on utilisait les 10 amorces sélectionnées ou les 26 amorces polymorphes. De même, en utilisant les deux jeux de données, les groupes formés dans le dendrogramme et le graphe PCoA sont similaires (Figures 33 et 34).

La stratégie de sélection d'amorces pour réduire les coûts des analyses de variabilité génétique est la première étape de l'utilisation des marqueurs moléculaires dans les différents programmes de sélection de plantes (Mariano et al. 2019). Dans cette étude, la réduction du nombre des amorces utilisées de 26 à 10 n'a pas modifié la fiabilité des résultats obtenus ce qui indique qu'une caractérisation robuste d'une collection de pommier est possible en utilisant environ 40% des ressources et du temps qui sont normalement dépensés.

V. Conclusion

Le présent travail est la première étude visant à évaluer la diversité et les relations génétiques entre les génotypes de pommiers cultivés au Maroc, en utilisant des marqueurs SSR. Dans un premier temps, les résultats obtenus montrent que les génotypes analysés représentent une source intéressante de diversité. Cependant, la plupart des génotypes étudiés semblent être purs et minimalement hybridés, ce qui indique leur meilleure intégrité génétique. D'autre part, la présence d'un pourcentage relativement élevé d'allèles uniques (21,03 %) et rares (28,20 %) confirme l'efficacité des marqueurs SSR utilisés pour l'évaluation de la diversité génétique. La présente étude a également révélé la présence de deux cas de duplications, des cas possibles d'homonymie et de 13 relations parents/descendance confirmées avec un niveau de confiance élevé (95 %), ce qui indique que les marqueurs SSR peuvent fournir des informations utiles sur l'identité, la diversité génétique et des éventuels liens de parenté de premier ordre au sein de germoplasme marocain de pommier. Dans un second temps, l'évaluation des 26 amorces SSR nous a permis de sélectionner les 10 amorces les plus informatives. Les étapes de sélection de ces amorces ont été robustes puisque les résultats de l'analyse hiérarchique et de l'analyse en coordonnées principales basés sur les données obtenues avec les 10 amorces sélectionnées sont semblables à celles obtenues avec les données de toutes les amorces utilisées (26). Donc, la méthode de sélection des amorces SSR à l'aide de l'indice PIC s'avère efficace. Finalement, les résultats de cette étude vont nous permettre d'économiser environ 60 % du temps et des coûts dans les prochaines études de la variabilité génétique du pommier au Maroc (surtout, dans les études à grande échelle avec un grand nombre de génotypes).

*Chapitre 5 - Analyse de la
diversité génétique du puceron
cendré du pommier (*Dysaphis
plantaginea*, Passerini) au
Maroc*

I. Introduction

Parmi les multiples pucerons qui s'attaquent au pommier cultivé (*Malus domestica* Borkh), le puceron cendré du pommier (*Dysaphis plantaginea* Passerini), est l'un des pucerons les plus nuisibles. Il provoque beaucoup de dégâts (enroulement puis jaunissement des feuilles, déformation des rameaux et des fruits) causant des pertes économiques importantes dans les pays producteurs du pommier, notamment en Europe, en Afrique du Nord et en Amérique du Nord (Wilkaniec 1993 ; Guillemaud et al. 2011 ; Warneys et al. 2018).

D. plantaginea accomplit son cycle de vie sur deux plantes hôtes successives : le pommier cultivé comme hôte primaire, du début de l'automne à la fin du printemps, et le plantain (*Plantago lanceolata*) comme hôte secondaire pendant l'été (Bonnemaison, 1959). Dans les vergers de pommiers commerciaux, les dégâts causés par des densités même très faibles de pucerons peuvent diminuer la valeur commerciale de la récolte. Cette perte économique justifie les techniques de gestion des pucerons, basées principalement sur l'utilisation de pesticides. Les recommandations suggèrent généralement l'utilisation de plusieurs traitements pesticides dans les vergers de pommiers : au début du printemps, avant la floraison et après la floraison ou à la fin de l'été (Cross et al. 2007). Cependant, l'utilisation intensive d'insecticides chimiques contre ce puceron a entraîné un régime de sélection intense et par conséquent des mécanismes de résistance aux insecticides dans les champs (Delorme et al. 1999). Des stratégies de lutte alternatives, telles que l'application de pesticides organiques (Cross et al. 2007), l'utilisation de produits répulsifs ou à effet barrière (Wyss et al. 2004, Burgel et al. 2005, Marko et al. 2008), la lutte biologique (Wyss et al. 1999b, Minarro et al. 2005, Brown et al. 2007) et la résistance des plantes (Qubbaj et al 2005, Angeli et al. 2006, Minarro et al. 2007, 2008), sont développées et testées dans plusieurs pays. Quelle que soit la stratégie de lutte appliquée, la probabilité de développer une résistance à la lutte dépend des caractéristiques de l'espèce cible: sa capacité de migration, son mode de reproduction, sa variabilité génétique et donc sa capacité d'adaptation aux mesures de lutte.

Au Maroc, la structure génétique des populations de *D. plantaginea* et l'ampleur des flux de gènes entre les sous-populations sont largement inconnues. D'où la nécessité d'analyser la diversité génétique de ces populations avant d'entamer n'importe quelle stratégie de lutte.

II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel génétique

Nos prospections à travers les principales régions reconnues par la culture du pommier au Maroc, ont montré la présence de ce puceron dans presque la totalité des vergers dépistés. Bien que le degré des infestations varie d'une année à l'autre, le puceron cendré du pommier doit désormais être considéré comme un ravageur bien adapté aux conditions climatiques et aux pratiques culturales dans les vergers du pommier au Maroc.

Au cours du printemps 2018, un total de 63 échantillons de puceron cendré (9 à 15 échantillons par région) a été collecté dans des vergers commerciaux du pommier à travers 5 régions du Maroc (Figure 35). Chaque échantillon est constitué d'une seule colonie de pucerons (15 à 20 femelles) développée sur un seul arbre de pommier (Tableau 20). Le fait de n'échantillonner qu'une seule colonie par arbre a permis de s'assurer que l'échantillon ne comprenait pas différents clones. En effet plusieurs colonies peuvent exister sur le même arbre. En portant des gants stériles et à l'aide d'un cure-dent stérile, chaque colonie a été transférée dans un tube Eppendorf déjà rempli d'éthanol à 99 % et transporté jusqu'au laboratoire. Puis, chaque colonie a été conservée dans de l'éthanol (96%) à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

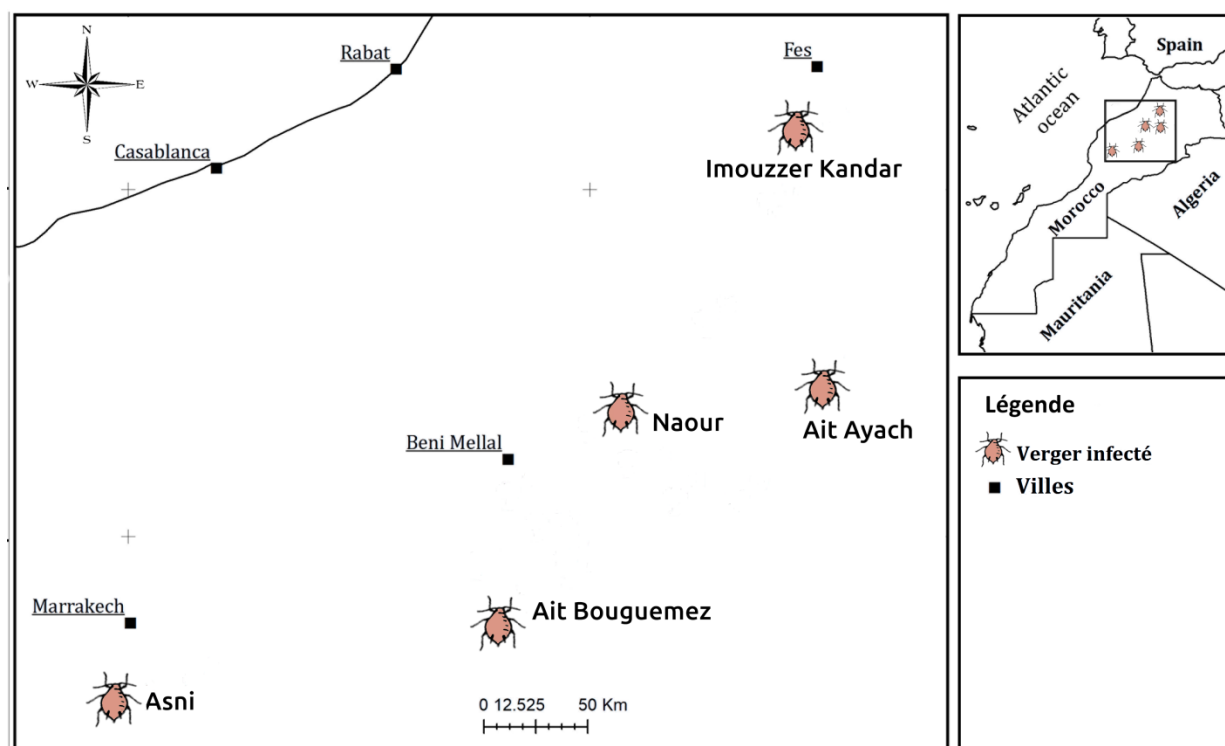


Figure 36: Localisation des échantillons de *D. plantaginea* étudiés.

Tableau 20: Origine des populations de D. plantaginea utilisés dans le cadre de cette étude.

Régions (Code)	Nombre de colonie	Variété du pommier (hôte)	Latitude	Longitude
Asni (ASN)	13	Gala Brookfield & Golden & Buckeye	31°16	7°57
Ait Ayache (AYA)	15	Gala & Golden Delicious & Starking Delicious	32°36	5°00
Ait Bouguemez (BOU)	15	Gala	31°42	6°21
Imouzzer Kandar (IMO)	9	Gala & Golden Reinders & Golden Smoothee	33°44	5°02
Naour (NAO)	11	Golden Delicious & Starking Delicious	32°29	5°55'

II.2 Extraction d'ADN

L'ADN a été isolé à partir d'un seul individu par colonie en utilisant le protocole suivant :

- La nuit précédant l'extraction d'ADN, un individu a été prélevé de la colonie conservée dans l'éthanol à 96 % et placée à -80 °C. Le lendemain, le puceron a été broyé en poudre fine par deux cycles de cryobroyage à 23 Hz pendant 30 s.
- **Étape d'extraction** : 300 µL de tampon d'extraction contenant du tampon TNES (50 mM Tris pH 7.5, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0.5% SDS, eau), de la protéinase (50 µg) et de la RNase (100µg) ont été ajoutés au tube contenant la poudre de puceron, avant d'être incubés à 55°C pendant une heure avec une agitation de 1000 rpm.
- **Étape de déprotéinisation et de filtration** : Nous avons ensuite ajouté 85µL de NaCl (5M) au mélange, en agitant vigoureusement pendant 15 secondes. Par la suite, les tubes ont été centrifugés à 4°C et 5000 rpm pendant 20 minutes.
- **Étape de fixation de l'ADN** : 300 µL de surnageant ont ensuite été transférés sur une plaque Whatman montée sur une plaque à puits profonds, à laquelle nous avons ajouté 500 µL de tampon CGE (chlorure de guanidinium 2,6 M, eau, éthanol 64%). La plaque a ensuite été centrifugée pendant 2 minutes à 5000 rpm à température ambiante.
- **Étape de lavage** : Nous avons ensuite procédé à deux lavages consécutifs. Un premier lavage avec 600 µL de tampon de lavage (8mM Tris pH 8, 0.04 mM EDTA, 60 mM acétate de potassium, et 60% éthanol) et avec deux minutes de centrifugation à 5000 rpm à température ambiante ; l'éluat a été jeté. Le second lavage a consisté en la même

quantité de tampon de lavage avec 15 minutes de centrifugation à 5 600 rpm à température ambiante. L'éluat a été jeté.

- **Étape d'éluion de l'ADN** : La plaque Whatman a ensuite été placée sur une plaque PCR. Un total de 30 µL d'eau préchauffée à 65°C a été ajouté à chaque colonne. Après 5 minutes, la plaque a ensuite été centrifugée pendant 2 minutes à 1000 rpm à température ambiante. Cette étape d'éluion a été répétée.

II.3 Analyse des microsatellites

Nous avons utilisé 30 marqueurs SSR, dont un qui avait été utilisé précédemment pour *D. plantaginea* (Guillemaud et al. 2011), et 29 qui ont été nouvellement développés à partir du séquençage d'un génome à faible couverture. Nous avons testé la neutralité, et l'absence de déséquilibre de liaison, des 29 marqueurs SSR en utilisant le test de neutralité d'Ewens-Watterson (Watterson, 1978), puis chaque marqueur SSR a été amplifié séparément par PCR.

La PCR a été réalisée dans un volume final de 20 µL contenant 0,2 µM de chaque amorce directe et inverse avec l'amorce directe est marquée par fluorescence, 0,2 µM de dNTP, entre 1 et 1,5 mM de MgCl₂, 1X tampon (5X), 2 µL Homemade Taq, 5 µL d'ADN (dilution 1/30) et H₂O stérile pour atteindre le volume final. Nous avons utilisé le programme PCR suivant : 94°C pendant 5 minutes, suivi par 35 cycles de 30s à 94°C, 30s à 60 à 65°C et 45s à 72°C, puis 5 minutes à 72°C et enfin 10 minutes à 4°C. Dans le programme PCR, la température de recuit a varié entre 55°C et 65°C. Les températures de recuit pour chaque marqueur SSR sont détaillées dans le tableau 21. Les produits PCR sont par la suite regroupés selon les quatre multiplexes décrits dans le même tableau.

Le génotypage des marqueurs SSR a été réalisé sur la plateforme GENTYANE (INRAE, Clermont-Ferrand, France). Les allèles de chaque marqueur SSR ont été identifiés, et leur taille a été évaluée avec Genemapper v.4.0 (Applied Biosystems TM, Foster City, USA) par deux personnes indépendamment. En cas de divergence, l'électrophérogramme a été vérifié par une troisième personne pour prendre une décision finale.

La notation des allèles résultant de Genemapper a ensuite été traitée avec la macro Excel Autobin ([https://www6.bordeauxaquitaine.inra.fr/biogecoeng/Scientific Production/Computer software/ Autobin](https://www6.bordeauxaquitaine.inra.fr/biogecoeng/Scientific%20Production/Computer%20software/Autobin)). Nous n'avons retenu que les génotypes multilocus présentant moins de 30% de données manquantes et contenant moins de 5% d'allèles nuls. Les allèles nuls ont été détectés avec le logiciel GENEPOP v4.7 (Rousset, 2008).

Tableau 21: Caractéristiques des marqueurs SSR utilisés dans le cadre de cette étude. F : Amorce sens ; R : Amorce anti-sens ; bp : paire de bases ; T° : Température d'hybridation.

Fluorochromes	Locus SSR	Sequence de l'amorce (5'- 3')	Plage de l'allèle (bp)	T°
Alexa fluor	SSR-16	F: GCACCGACGGCATTATTAGT R: GCGTAATGGCGAGCGTATT	268-314	60
	SSR-19	F: TTGACGATAAAGCGAAGGCG R: GTGGGTGCACGTACACGATA	184-247	65
	SSR-2	F: CGCCAACCGGATAATTAATTCG R: GGAATGATTTGGAGAAGAAGTTT	241-289	60
	SSR-3	F: GTGCATATCGTATAATATCGATCGCT R: TCCTTCCAATCAGACAGTTTGA	236-264	55
	SSR-49	F: GGACCACCCTCAAACATTAAGT R: TTTCATCAAATTGTACAGCTACACT	186-213	60
	SSR-5	F: TGCTAGCCGACATCAGATCG R: CGTGTGACGTATTAGGTATGACC	276-288	60
	SSR-6	F: CTCCACGGACGACAACCATA R: TAAAGACCGATGACTTGCGC	261-297	60
	SSR-8	F: CCAAGCCATCCACGCCTATG R: GCCGCGACTAAACGTTACTG	268-271	60
ATTO 565	L4	F: CGTGTAAGTAGTATACGAACCCACC R: GCAACAGCCATCTCCTTCTC	232-253	62
	SSR-17	F: AGTCTCCTGCTGACATTGCC R: GGTTCAAATCTAGTCGATCCGC	162-210	60
	SSR-21	F: CAACTAGGTACACGCCACGT R: CGTTGAAATGTTTCAAATCGCG	183-194	65
	SSR-38	F: CCTGACAGCTGTGCCCTC R: GCTCGGGCGTCGTACTTATA	158-190	65
	SSR-4	F: ACAACAATTATTAATTCATCGGACCG R: CCCAAGACAACATCGAGTCT	181-222	60
	SSR-7	F: ACGCAGGTTCCCTACTGTGAT R: ACTCCTTACTGCATATACGTTTCGA	219-232	60
	SSR-40	F: TCAACCTCATTTGATGTCTTACACT R: ACCATTGAGTGAACCTGGGAA	135-160	57
	ATTO 560	SSR-18	F: TTACCCATCGTGAACGCCTG R: GGGCTTTCACCTCGTGGATGT	280-299
SSR-23		F: ACCGTCTTGTAACCGCAGC R: GGCAACAGAGTTCAATCGGC	292-298	65
SSR-26		F: CGACCGTTCAGGGAATGTTG R: AGCGCACAATCAAATATTATGGCA	299-309	65
SSR-27		F: GAGTTATGTGCTGCATGGCG R: CACAATCGTATTTATGTATAGGGCACT	286-306	65
SSR-28		F: AAACCGTGACCCGAAGCG R: CCTCTTTCCCAACCAGGTGT	299-303	65

HEX	SSR-32	F: CGTTGCCGTGTCACGTATAAT R: ATTGTCACGAGTTCGCGCTA	288-373	65
	SSR-51	F: TCATCTCTGGGACGAGGACC R: ATGTGCAGCTGAGCTCACTC	282-328	65
	SSR-1	F: CGACGCTGAGTGCCTACTAG R: GGGTCGATAGTTCAGTGTGCA	160-207	60
	SSR-11	F: ACCTGGCCATCTCACCCTA R: CGGTTACCACCACTAAATCGGA	135-164	60
	SSR-13	F: TCGTGGTTAGTCTTAGCGAC R: ACTCACGAATAATCTCCATCACTC	111-119	60
	SSR-15	F: GGGATGAGGTGCTTCGCAA R: GTGATAGAGCGAGAATGGACGT	108-143	60
	SSR-22	F: TGTTTGGTGAAGGATCGATACG R: GGGCGATGGTTCACGGTAA	182-195	65
	SSR-31	F: ATGCAGTTGTAATATCTATGTGGAA R: AACGGTAGTACACTAATACCTCTT	149-165	60
	SSR-46	F: CGTGAGTTTCTAAACACCGTGG R: AGGTTGGCATGTTTGACGTAA	122-150	65
	SSR-9	F: CGGCAGATGAACCAAATCGG R: GGCATATTATCATGTGTACACTGTAT	151-167	60

II.4 Polymorphisme et diversité génétique

Des estimations du polymorphisme et de la diversité génétique au sein et entre les populations ont été obtenues à l'aide du logiciel GenALEX 6.5 ([Peakall and Smouse, 2006](#)). Nous avons calculé le nombre d'allèles par locus (N_a), le nombre d'allèles effectifs par locus (N_e), l'indice de Shannon (I), l'hétérozygotie observée (H_o), l'hétérozygotie attendue (H_e), l'indice de fixation (F_{st}), la distance génétique de Nei ([Nei, 1978](#)) et le flux génétique (N_m). L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA ; [Excoffier et al. 1992](#)) a été également calculée pour évaluer statistiquement la répartition de la variabilité génétique au sein et entre les populations à l'aide du même logiciel. De plus, pour mesurer le caractère informatif des marqueurs utilisés, les fréquences alléliques dans l'échantillon total ont été utilisées pour calculer le contenu informationnel du polymorphisme (PIC ; [Serrote et al. 2020](#)).

II.5 Structure et différenciation génétique

La structure et la différenciation génétique des populations de pucerons étudiées ont été analysées en utilisant différents algorithmes et méthodologies. Dans un premier temps, la répartition et la différenciation des individus et des populations ont été visualisées en effectuant l'analyse en coordonnées principales (PCoA) à l'aide du programme GenAlex.

Par la suite, l'arbre de classification hiérarchique (dendrogramme) basé sur l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Average) a été réalisé à l'aide du logiciel DARwin (Perrier and Jacquemoud-Collet 2006). Finalement, une analyse bayésienne a été effectuée pour évaluer le niveau de structuration génétique parmi les cinq sous-populations à l'aide du logiciel STRUCTURE (Pritchard et al. 2010). Cette analyse a été exécutée en dix répétitions pour chaque valeur de K allant de 1 à 10, avec une période de rodage (Length of Burnin period) de 10 000 et des étapes de Markov Chain Monte Carlo (Number of MCMC reps after Burnin) de 100 000 itérations. Par la suite, le nombre optimal de clusters génétiques (K) a été déterminé par la méthode décrite par Evanno et al. (2005) en utilisant la plateforme en ligne STRUCTURE HARVESTER (Earl et vonHoldt 2012).

III. Résultats

III.1 Polymorphisme des microsatellites et diversité génétique

Les 63 échantillons de pucerons considérés dans cette étude, ont été génotypés avec succès par les 30 marqueurs SSR. Les résultats obtenus ont montré que tous les loci sont polymorphes. L'écart de l'équilibre de Hardy-Weinberg n'est pas significatif pour l'ensemble des marqueurs utilisés, ce qui suggère que sont tous génétiquement indépendants.

Pour l'ensemble des échantillons étudiés, on note que le nombre d'allèles (N_a) varie de 2 pour le locus SSR-5 à 19 pour le locus SSR-2, avec une moyenne de 7.87 allèles par locus (Tableau 22). D'autre part, le nombre d'allèles effectif ($N_e=3.27$) et l'indice de Shannon ($I=1.30$) variaient de 1.19 à 9.98 et de 0.34 à 2.55 respectivement. Concernant, l'hétérozygotie observée (H_o) et l'hétérozygotie attendue (H_e), les valeurs moyennes sont 0.54 et 0.60, respectivement. Le locus SSR-2 présente les taux d'hétérozygotie observée et attendue les plus élevés ($H_o = 0.95$, $H_e = 0.90$), tandis que le locus SSR-28 présente les taux d'hétérozygotie observée et attendue les plus faibles ($H_o=0.07$, $H_e=0.16$). D'autre part, le contenu informationnel du polymorphisme (PIC) varie de 0,02 pour le locus SSR-11 à 0,89 pour le locus SSR-2 avec une moyenne de 0,48. Selon les critères décrits par Serrote et al. 2020, parmi les 30 loci SSR utilisés, quinze sont hautement informatifs ($PIC > 0,50$), huit sont modérément informatifs ($0,50 > PIC > 0,25$) et sept ont un faible niveau informatif avec des valeurs $PIC < 0,25$.

Tableau 22: Estimation de la diversité génétique des échantillons de *D. plantaginea*. Na : Nombre d'allèles, Ne : Nombre d'allèles effective, I : Indice de Shannon, Ho : Hétérozygotie observée, He : Hétérozygotie attendue, PIC : Contenu informationnel du polymorphisme.

Locus	Na	Ne	I	Ho	He	PIC
SSR-1	14	3.76	1.78	0.61	0.73	0.71
SSR-2	19	9.98	2.55	0.95	0.90	0.89
SSR-3	9	5.13	1.83	0.76	0.81	0.77
SSR-4	11	3.41	1.61	0.73	0.71	0.62
SSR-5	2	1.34	0.42	0.24	0.26	0.03
SSR-6	9	1.96	1.16	0.51	0.49	0.29
SSR-7	4	2.32	1.05	0.10	0.57	0.40
SSR-8	3	1.76	0.67	0.44	0.43	0.16
SSR-9	7	2.93	1.41	0.57	0.66	0.55
SSR-11	6	1.32	0.55	0.27	0.24	0.02
SSR-13	5	1.86	0.79	0.44	0.46	0.22
SSR-15	6	2.32	1.08	0.56	0.57	0.40
SSR-16	11	5.07	1.83	0.48	0.80	0.76
SSR-17	13	4.82	1.87	0.75	0.79	0.75
SSR-18	4	2.20	0.95	0.56	0.55	0.35
SSR-19	8	3.54	1.48	0.68	0.72	0.64
SSR-21	4	2.83	1.16	0.62	0.65	0.52
SSR-22	7	2.29	1.16	0.60	0.56	0.39
SSR-23	4	1.74	0.75	0.39	0.42	0.17
SSR-26	5	1.60	0.81	0.19	0.38	0.12
SSR-27	8	3.16	1.39	0.61	0.68	0.59
SSR-28	3	1.19	0.34	0.07	0.16	0.06
SSR-31	7	4.40	1.64	0.63	0.77	0.72
SSR-32	12	2.20	1.30	0.54	0.55	0.37
SSR-38	9	3.04	1.35	0.57	0.67	0.56
SSR-40	9	2.46	1.30	0.59	0.59	0.44
SSR-46	12	6.52	2.06	0.59	0.85	0.82
SSR-49	7	3.50	1.41	0.70	0.71	0.63
SSR-51	13	7.40	2.22	0.63	0.86	0.85
L4	5	2.14	1.02	0.49	0.53	0.49
Moyen	7.87	3.27	1.30	0.53	0.60	0.48

III.2 Différenciation génétique et flux de gènes

L'indice de différenciation génétique (F_{st}) est un paramètre qui permet de révéler la séparation génétique entre les sous-populations. Il mesure la réduction relative des hétérozygotes, lié aux différences alléliques entre les sous-populations. Selon [Wright \(1978\)](#), on peut définir 5 niveaux de différenciation génétique en fonction de la valeur d' F_{st} :

- $F_{st}=0$: les sous-populations sont identiques,
- $0 < F_{st} < 0,05$: différenciation entre sous-populations est faible,
- $0,05 < F_{st} < 0,15$: différenciation entre sous-populations est modérée
- $0,15 < F_{st} < 0,25$: différenciation entre sous-populations est importante
- $F_{st} > 0,25$: différenciation entre sous-populations est très importante

Les valeurs F_{st} calculées entre les populations de *D. plantaginea* étudiés varie de 0.026 entre les populations d'Ait ayache (AYA) et Naour (NAO) à 0.055 entre les populations d'Asni (ASN) et Naour (NAO). Des valeurs intermédiaires sont enregistrées entre les autres populations (Tableau 23).

Tableau 23: Différenciation génétique (F_{st}) et flux de gènes (Nm) entre les populations de *D. plantaginea* étudiés. F_{st} au-dessous de la diagonale, Nm au-dessus de la diagonale.

	ASN	AYA	BOU	IMO	NAO
ASN	0	4.51	6.53	4.61	4.30
AYA	0.053	0	7.55	5.22	9.19
BOU	0.037	0.032	0	6.24	7.34
IMO	0.051	0.046	0.039	0	5.91
NAO	0.055	0.026	0.033	0.041	0

L'estimation de flux de gènes constitue aussi un indice important pour étudier la différenciation génétique entre les populations d'une espèce. Dans notre étude, un flux de gènes important entre les populations a été enregistré. Il varie de 4.30 entre les populations d'Asni (ASN) et Naour (NAO) à 9.19 entre les populations d'Ait ayache (AYA) et Naour (NAO). Le flux de gènes entre les autres populations oscille entre ces deux valeurs. D'autre part, la différenciation génétique des populations de pucerons étudiées, telle que calculée par l'analyse moléculaire de la variance (AMOVA; tableau 24), a montré que 2.71 % de la variation totale se trouve entre les populations, alors que 97.29 % de la variation totale est due à la diversité intra-population.

Tableau 24: Résultats de l'AMOVA des populations de *D. plantaginea*. *** Significatif au niveau de $P < 0.001$, dl : degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, **Est.Var**: Variance estimée.

Source de variation	DI	SCE	Est. Var	Variance expliqué (%)
Entre les populations	4	70.18	0.26***	2.71
Au sein des populations	121	1122.01	9.34***	97.29
Total	125	1192.19	9.60	100

III.3 Structure génétique et relation entre les populations

En utilisant les données de génotypage des 30 marqueurs SSR, nous avons étudié la structure génétique de cinq populations de *D. plantaginea*, collectés dans les principales zones de culture de pommier au Maroc. L'analyse en coordonnées principales (PCoA) basée sur les deux premiers axes (Coord 1 et Coord 2) a révélé qu'il n'y a pas de regroupement selon l'origine géographique (Figure 36).

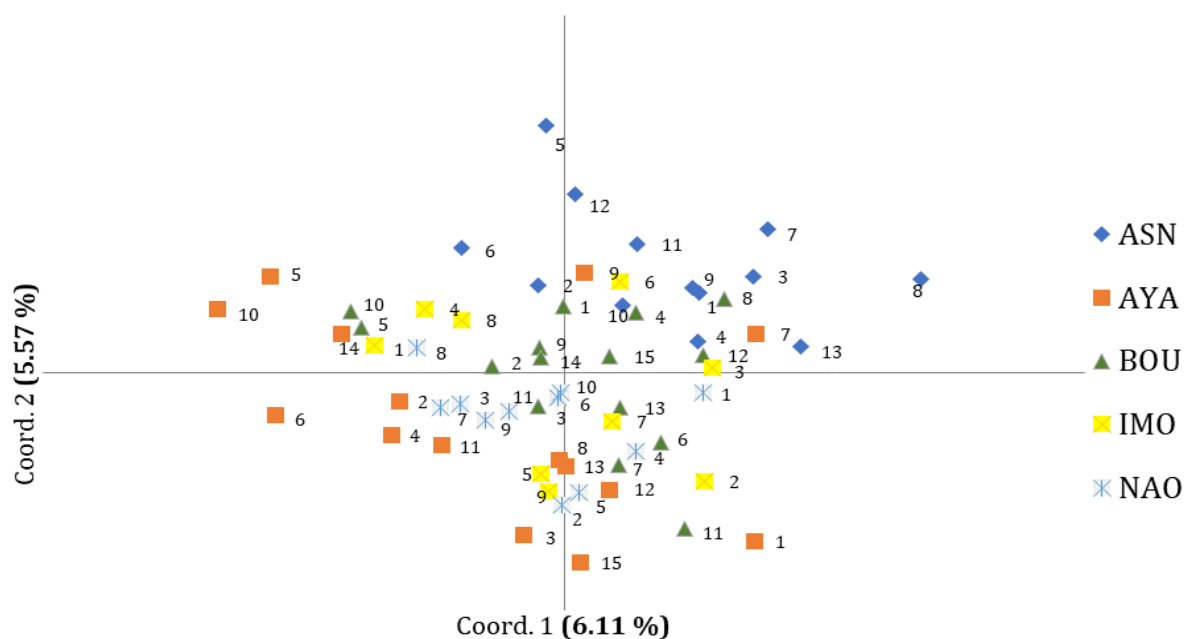


Figure 37: Analyse en coordonnées principales (PCoA) de 63 individus de *D. Plantaginea* en utilisant 30 marqueurs SSR. L'origine géographique de chaque individu est indiquée par les symboles listés à droite.

La représentation graphique du PCoA a montré que tous les individus analysés ont été alignés aux alentours du centre des deux axes, indiquant que les cinq populations étudiées ont une base génétique commune et un flux de gènes considérable. Néanmoins, ces résultats soulignent le risque de fausse interprétation de certaines données dans le graphique PCoA, qui est basé seulement sur les deux premières coordonnées expliquant un pourcentage faible de la variabilité totale (11.67 %). Donc pour s'assurer des résultats obtenus d'autres méthodes d'analyse à savoir, la classification hiérarchique et l'analyse bayésienne ont été ajoutées.

La classification hiérarchique basée sur la matrice de distance génétique (Figure 37) a révélé que les différents individus peuvent être regroupés en un seul cluster, ce qui est en accord avec les résultats du PCoA.

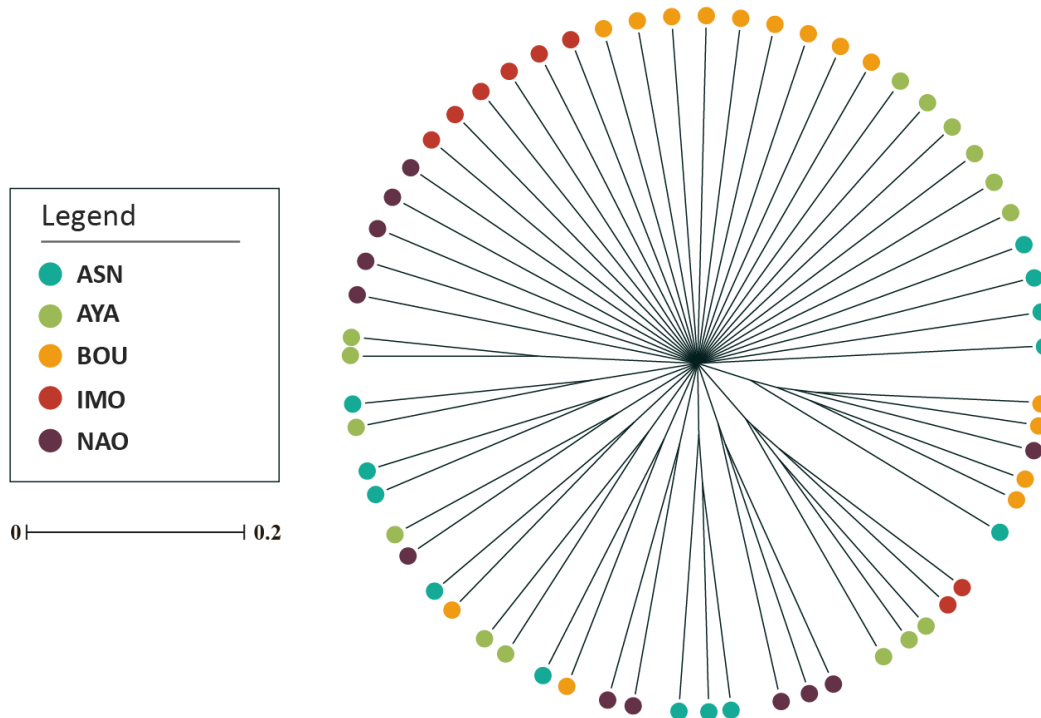


Figure 38: Dendrogramme UPGMA des populations de pucerons étudiés.

Les faibles niveaux de divergence qui apparaissent entre les différents individus indépendamment de leurs origines géographiques peuvent s'expliquer par la très grande variabilité intra-populations révélée par l'AMOVA. En revanche, le niveau de divergence génétique entre les cinq populations établies à l'aide d'une matrice de distance génétique (Nei, 1978 ; Tableau 25) est relativement faible. Les estimations de la distance génétique variaient de 0.076 pour les populations les plus étroitement apparentées (NAO et AYA), à 0.154 pour les populations les plus divergentes (IMO et ASN).

Tableau 25: Matrice des distances génétiques (Nei) entre les populations de pucerons étudiés.

	ASN	AYA	BOU	IMO	NAO
ASN	0.000				
AYA	0.141	0.000			
BOU	0.096	0.086	0.000		
IMO	0.154	0.143	0.117	0.000	
NAO	0.143	0.076	0.088	0.123	0.000

Selon la méthode décrite par Evanno et al. (2005), l'analyse bayésienne effectuée sur l'ensemble des individus a identifié $K=2$ comme étant le nombre le plus probable de groupes génétiques avec une valeur de $\Delta K=3.22$ (Figure 38).

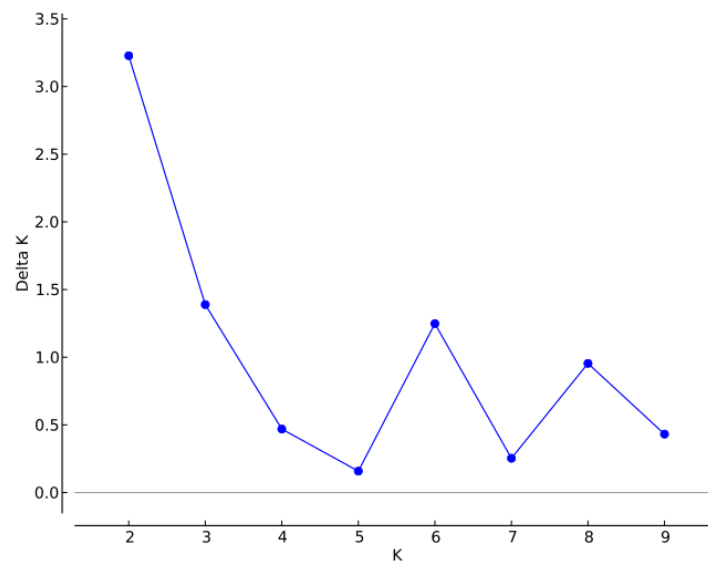


Figure 39: Détermination du K optimal selon la méthode de calcul d'Evanno et al. 2005.

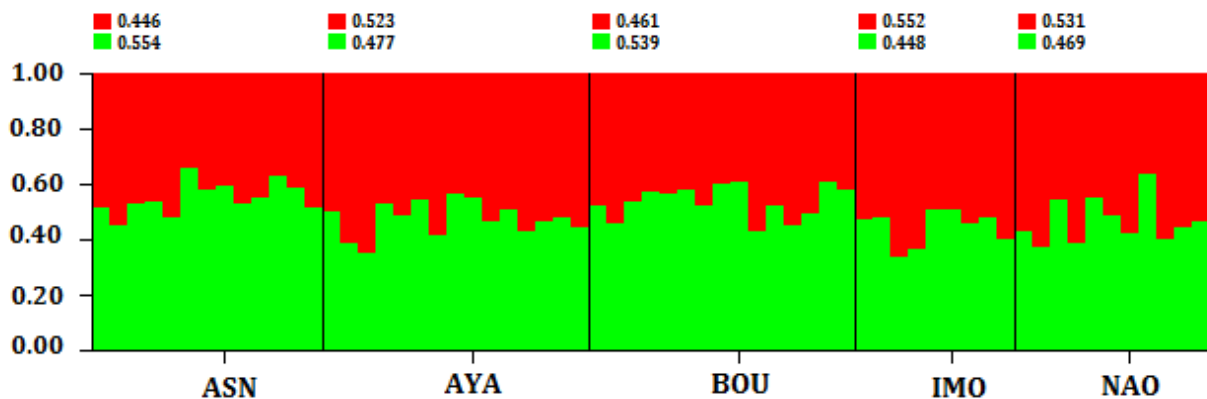


Figure 40: Représentation graphique de la structure génétique de 63 individus de *D. plantaginea* basée sur les données de 30 marqueurs SSR. Pour chaque population, le coefficient moyen d'appartenance (q_i) aux groupes génétiques est indiqué au-dessus du graphe.

Selon Pritchard et al. (2010), on considère comme admixed tous les génotypes qui ont un coefficient d'appartenance (q_i) inférieur à 0,80 pour un des groupes génétiques défini. La représentation graphique issue du logiciel structure (Figure 39) a montré que tous les individus ont un coefficient d'appartenance (q_i) largement inférieur à 0,80 pour les deux groupes génétiques définis 1 (Vert) et 2 (Rouge) ce qui montre que STRUCTURE n'arrive

pas à assigner les individus et qu'il n'arrive pas à trouver de structuration dans le jeu de données, peut-être à cause de la grande variabilité intra-populations préalablement révélées. On a observé que le niveau d'admixture différait légèrement entre les populations. Cependant, le coefficient moyen d'appartenance (q_i) aux groupes génétiques 1 (Vert) et 2 (Rouge) varie de 0.554 et 0.446 pour la population d'Asni (ASN) à 0.448 et 0.552 pour la population d'Imouzzar Kandar, respectivement. Les résultats de cette analyse bayésienne confirment, dans une certaine mesure, les résultats de l'ACoP et la Classification hiérarchique. En effet, malgré le niveau de la variabilité intra-population élevé, les différents individus sont révélés génétiquement très proches.

IV. Discussion

Lors de la sélection des méthodes appropriées de lutte contre les ravageurs, il est nécessaire de prendre en considération la diversité génétique, la structure génétique et le flux de gènes au sein et entre les populations de ravageur en question, car ces informations peuvent nous aider à prédire la distribution future des ravageurs invasifs, les possibilités d'hybridation entre les différentes sous-populations et la capacité à surmonter la résistance de différentes plantes hôtes. En effet, l'introggression au sein d'une population due à l'hybridation avec des espèces étroitement apparentées peut rapidement augmenter la diversité génétique de la population, permettant ainsi aux organismes nuisibles d'envahir des environnements auparavant inadaptés ou de surmonter les mesures de contrôle (Garnas et al. 2016; Dittrich-Schröder et al. 2020). Dans cette étude, nous avons analysé la structure génétique de 63 individus de puceron cendré du pommier collectés sur leurs hôtes primaires dans cinq régions du Maroc dont l'objectif de caractériser la variabilité génétique de ce puceron et d'évaluer l'impact des forces évolutives (dérive génétique et migration) qui peuvent affecter cette variation.

La variation génétique d'une espèce envahissante peut être utilisée pour déterminer son origine géographique et confirmer si elle provient de populations uniques ou multiples (Meekins et al. 2001).

Les indices génétiques, tels que les taux d'hétérozygotie observés (H_o) et attendu (H_e) et la richesse allélique (A_r) reflètent la diversité génétique au sein des populations (Emanuelli et al. 2013). En comparaison avec différentes populations de pucerons cendrés en Europe et aux États-Unis (Olvera-Vazquez et al. 2021), les valeurs observées de ces trois indices dans la présente étude sont parmi les plus faibles (tableau 26). Ces résultats laissent suggérer que les populations de ce puceron au Maroc présentent une faible variabilité génétique par rapport au pays européen, mais relativement comparable avec les États-Unis.

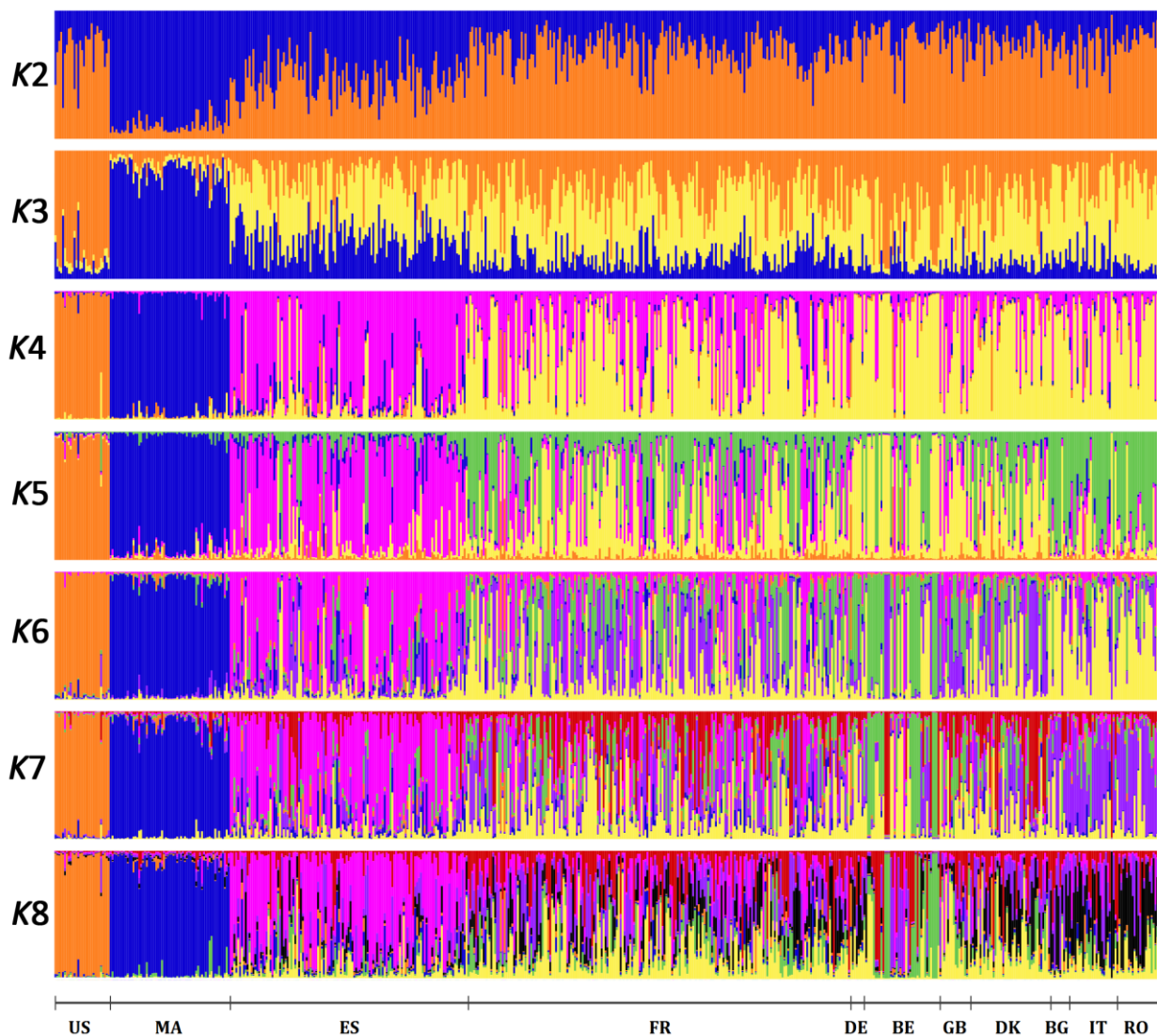
Tableau 26: Estimation de la diversité génétique des échantillons de *D. plantaginea* collecté au Maroc, Europe et États-Unis.

Pays	N	H_o	H_e	Ar
États-Unis	29	0.58	0.64	3.72
Maroc	63	0.54	0.60	3.71
Espagne	125	0.61	0.70	4.41
France	201	0.65	0.73	4.69
Allemagne	7	0.63	0.68	4.41
Belgique	40	0.64	0.53	3.84
Royaume-Uni	16	0.69	0.77	4.81
Denmark	42	0.66	0.77	4.98
Bulgarie	10	0.63	0.70	4.62
Italie	25	0.67	0.75	4.84
Roumanie	24	0.66	0.75	4.87

N : Nombre d'échantillons, H_o : Taux d'hétérozygotie observée, H_e : Taux d'hétérozygotie attendue, Ar : Richesse allélique.

Les effets fondateurs sont courants dans les populations de pucerons en raison de leur taux d'accroissement naturel élevé, résultant d'une fécondité accrue et du chevauchement des générations (Fuller et al. 1999).

La diversité génétique significativement plus faible observée dans les populations marocaines et américaines peut-être due au fait que ces deux populations ont été formées récemment par des effets fondateurs. En effet, une étude récente sur l'histoire de colonisation du puceron cendré sur son hôte primaire (le pommier), Olvera-Vazquez et al. (2021) suggère qu'il pourrait être originaire d'Europe de l'Est, du Caucase ou d'Asie Mineure, avant d'envahir le reste de l'Europe et l'Amérique du Nord. Cela concorde avec la plus ancienne observation de *D. plantaginea* dans l'est des États-Unis datant de 1890 (Footitt et coll 2006). En ce qui concerne le Maroc, il a été démontré dans la même étude que parmi les diverses populations de *D. plantaginea* en Europe, l'Espagne est la plus proche génétiquement (Figure 40). En plus, il a été mentionné par oukabli et al. 2011 que les premières plantations commerciales du pommier au Maroc ont probablement été installées en 1928 sur la base de la variété espagnole Llorca. Ces résultats supportent notre hypothèse de l'effet fondateur et suggèrent que les populations de pucerons cendrés au Maroc sont établies par un petit nombre d'individus provenant du sud de l'Europe (probablement l'Espagne) où la culture du pommier domestique est connue dès l'an 1398 (Auguste, 1921).



*Figure 41: Structure génétique spatiale des populations de *D. plantaginea* au Maroc, en Europe et aux Etats-Unis, déduite avec STRUCTURE de $K = 2$ à $K = 8$. US : États-Unis ; MA : Maroc ; ES : Espagne ; BG : Bulgarie ; IT : Italie ; FR : France ; RO : Roumanie ; DE : Allemagne ; BE : Belgique ; GB : Royaume-Uni ; DK : Danemark (Olvera-Vazquez et al. 2021).*

D'autre part, le puceron cendré du pommier comme la majorité des pucerons a montré fréquemment des capacités de dispersion équivalentes ou même supérieures à celles des arbres dispersés par le vent (Loxdale et al. 1993, Guillemaud et al. 2011), ce qui lui permet donc de se propager sur de longues distances. Toujours à partir des travaux d'Olvera-Vazquez et al. (2021), et selon une analyse bayésienne, la différenciation génétique entre les populations de pucerons marocains, européens et américains s'est avérée faible, mais significative. Cette différenciation génétique significative pourrait être expliquée par la présence des barrières physiques (la mer Méditerranée et l'océan Atlantique) ce qui limite le flux de gènes et par conséquent aggravera la pression anthropique (utilisations des

insecticides) et la dérive génétique. En effet, le flux de gènes est considéré comme un facteur responsable de la structure génétique des populations, parce que l'introduction de nouveaux allèles dans la population par le flux génique représente une source très importante de variation génétique, qui affecte la diversité génétique de la population en produisant de nouvelles combinaisons.

En outre, les résultats de l'AMOVA ont montré que la majeure partie de la variation génétique du puceron cendré au Maroc se produisant principalement au sein des populations (97.29 %). Cela concorde avec ce qui a été observé dans une étude similaire sur les pucerons cendrés en France (Guillemaud et al. 2011). En effet, ce résultat peut être dû à l'effet combiné du flux génétique important entre les populations ($N_m > 4$) et le mode de reproduction (Hartl et al. 1997). Certes, le puceron cendré du pommier est une espèce parthénogénétique cyclique, avec une seule génération sexuelle et de nombreuses générations asexuées où les mutations étant la seule source de variations.

Jusqu'à maintenant, on ne sait pas comment cette espèce maintient le polymorphisme dans son mode de reproduction. En revanche il était montré qu'un seul événement annuel de reproduction sexuelle est suffisant pour générer un niveau élevé de variabilité génétique et pour effacer les signes génétiques de clonalité résultant de la reproduction asexuée (Guillemaud et al. 2011). D'autre part, on note une très faible différenciation génétique entre les populations étudiées. En plus, nous n'avons détecté aucune différenciation génétique des populations qui peuvent être attribuées à leurs origines géographiques, ce qui est cohérent avec les très faibles distances génétiques de Nei détectées entre les populations.

Les résultats des analyses statistiques (PCoA, analyses hiérarchique) ont révélé que la structure génétique des différentes populations étudiées est relativement homogène. Timm et al. (2005) ont observé des résultats semblables chez les populations de pucerons lanigères (*Eriosoma lanigerum*) en Afrique du sud, qui s'avèrent génétiquement très proches. Il convient de noter que ces pucerons ont le même mode de reproduction que *D. plantaginea*. Par contre, Guillemaud et al. (2011) ont observé des niveaux significatifs de différenciation génétique entre quelques populations de *D. plantaginea* en France. En effet, Le flux de gènes et la sélection naturelle sont deux forces évolutives qui jouent un rôle important dans la sculpture de la structure génétique des populations d'insectes (Laffin et al. 2004 ; Voudouris et al. 2012 ; Fan et al. 2014).

Une explication possible de la différenciation génétique très faible observée chez les populations de *D. plantaginea* au Maroc était que les perturbations causées par les activités

anthropiques (telles que le transport des scions et des porte-greffes du pommier infecté par ce puceron d'une région à l'autre) compensent l'éloignement géographique entre les populations et affectaient positivement le flux génique ce qui conduit à un affaiblissement de la différenciation génétique. Bien entendu, l'échange de matériel végétal à travers les régions n'est pas la seule explication de la structure génétique spatiale observée. Cependant, les conditions climatiques similaires entre les populations étudiées (climat montagnard froid et relativement humide) pourraient entraîner des pressions de sélection environnementale similaire chez ces populations et par conséquent, des variations génétiques similaires dans plusieurs régions.

Le faible niveau de diversité génétique trouvé, ainsi que la distribution de cette diversité ont des implications importantes pour la gestion de ce ravageur. En effet, les espèces ayant un faible niveau de variation génétique ont généralement une capacité réduite d'adaptation aux changements environnementaux (Armstrong & Wratten 1996 ; Nicol et al. 1997). Par conséquent, les possibilités de succès des futurs programmes de lutte contre *D. plantaginea* au Maroc sont encourageantes.

V. Conclusion

Nos résultats concernant la structure génétique des populations de puceron cendré du pommier (*D. plantaginea*) au Maroc montrent que les populations collectées dans des régions géographiquement éloignées sont révélées génétiquement très proches les unes des autres. En effet, dans les prochaines études, une collecte exhaustive d'individus provenant de plusieurs régions ne sera pas nécessaire pour augmenter la diversité génétique des échantillons recueillis. En outre, ces résultats peuvent avoir des implications pratiques dans les futurs programmes de gestion de ce puceron (par exemple établir des mesures efficaces pour limiter l'échange du matériel végétal infecté par ces pucerons entre les régions productrices du pommier). De plus, le niveau de variation génétique relativement faible trouvé indique que la possibilité de contrôler ce puceron au Maroc en utilisant des méthodes biologiques comme le choix des cultivars résistants et la favorisation des organismes auxiliaires (qui jouent un rôle dans le contrôle naturel de ces ravageurs) par l'augmentation de la biodiversité des plantes fleuries (sources de nectar et de pollen dont certains auxiliaires ont besoin au stade adulte) en bord de champ et dans les parcelles, pourrait être favorable et doit être envisageable. Surtout, avec la réalité de l'utilisation non raisonnée d'insecticides sur les parcelles de pommier, souvent situées à proximité de secteurs habités et de zones sensibles (à côté des cours d'eau potable), qui engendrerait des menaces sérieuses pour l'environnement et la santé humaine.

Conclusion générale et perspectives

Dans le contexte du développement croissant que connaît la culture du pommier au Maroc ces dernières années, nous nous sommes proposé d'étudier la diversité morphologique, chimique et génétiques de cette espèce au Maroc, ainsi qu'un parmi ces principale ravageurs, *D. plantaginea*, à l'aide des descripteurs pomologiques et des marqueurs moléculaires. En effet, l'analyse morphologique qui constitue une première approche d'évaluation de la diversité génétique ainsi que les marqueurs moléculaires assurent à la fois un diagnostic fiable de la variabilité, une connaissance des génomes végétaux, une mise en place de stratégies très rapides de création et de sélection variétale et une amélioration des plantes.

La première partie de cette étude a porté sur la caractérisation pomologique des cultivars de pommier au Maroc qui représente un point d'entrée important pour la poursuite des recherches sur les ressources génétiques de cette espèce. La variabilité observée pourrait être un atout pour les programmes de gestion et d'amélioration de cette espèce. La caractérisation morphologique faite sur 30 cultivars provenant de différentes origines géographiques à l'aide des 34 descripteurs (quantitatifs et qualitatifs) a montré une diversité phénotypique considérable pour la plupart des caractères pomologiques étudiés. En effet, trois groupes de cultivars ont été séparés les uns des autres sur la base de plusieurs descripteurs dont les plus discriminants sont la taille, le poids, la forme et la couleur du fruit, la longueur du pédoncule, la surface de liège autour du pédoncule et l'acidité titrable. En plus, cinq cultivars à savoir Gala-1, Ahmri-1, Ahmri-2, Delicious-3 et Starking-1, présentent des valeurs élevées de TSS (teneur en solides solubles ou Brix°), ce qui suggère qu'ils peuvent être destinés à la transformation industrielle en jus, sirop, yaourt, confitures ou en vinaigre. D'autre part, les résultats de l'analyse hiérarchique, ont révélé des éventuels cas de synonymies et d'homonymies impliquant 12 cultivars. Ce résultat est intéressant pour éviter toute confusion pouvant résulter de l'existence des erreurs d'appellation dans les accessions étudiées.

L'exploitation des marqueurs moléculaires de type ISSR est entreprise chez 29 cultivars (dont 4 variétés introduites et 25 cultivars locaux issus de différentes régions au Maroc). Les résultats obtenus ont montré l'efficacité et la puissance des marqueurs générés (177 ISSR) dans l'évaluation du niveau du polymorphisme et de sa structuration et estimé les flux géniques entre les cultivars étudiées. Les analyses des paramètres génétiques ont montré un important polymorphisme au sein des génotypes étudiés comme en témoigne la valeur de la diversité génétique totale ($H_t=0,27$), la topologie du dendrogramme et la projection des cultivars dans les plans de l'ACP. D'autre part, les résultats obtenus indiquent qu'il n'y a pas de différenciation entre les génotypes locaux et les variétés introduites, ce qui est indique leur base génétique commune. Nous avons décelé aussi la présence d'une corrélation positive

entre la différenciation génétique à travers les régions étudiées et la distance géographique qui les sépare. En effet, les régions les plus distantes les uns des autres (Marrakech et Fès) sont les plus différenciées génétiquement ($G_{st}=0.36$) et vice-versa. D'autre part, la présente étude à l'aide des marqueurs ISSR a montré également l'existence des cas probables de synonymies et d'homonymies dans les noms des cultivars donnés par les agriculteurs, ce qui pourrait créer une situation très confuse dans la nomenclature du pommier au Maroc. En général, on peut conclure que l'ensemble des amorces ISSR utilisées présente de bonnes performances pour l'analyse génétique et l'identification des cultivars de pommier marocain.

Dans la deuxième partie de l'étude de la diversité génétique du pommier au Maroc, nous avons évalué 26 marqueurs SSR chez 27 géotypes de pommier local cultivés dans 4 régions du Maroc. Les résultats obtenus montrent bien l'utilité du contenu informationnel du polymorphisme (PIC) comme critère d'évaluation. En effet les 10 marqueurs qui présentent les valeurs de PIC les plus élevées se sont avérés capables de mettre en évidence l'ensemble des informations génétiques obtenus par les 26 marqueurs testés. Donc l'utilisation de ces 10 marqueurs (Ch01f03, Ch02c06, Ch02d08, Ch02c11, Ch02c09, Ch04c07, GD12, CH02b12, MS06g03, CH03d12) est très efficace pour l'étude de la diversité génétique du pommier au Maroc. Concernent les géotypes étudiés, les analyses montrent que la majorité entre eux possèdent une bonne intégrité génétique, ce qui indique un flux de gènes restreint entre les quatre régions échantillonnées. D'autre part, la présente étude nous a permis également de découvrir deux cas de duplications et des cas possibles d'homonymie. De même, 13 relations parents/ descendants ont été détectées avec un intervalle de confiance de 95 %. Le nombre relativement élevé d'allèles uniques (présent dans un seul géotype) et rares (leur fréquence inférieure à 0,05) détectés dans cette étude confirme l'efficacité des marqueurs SSR utilisés pour l'évaluation de la diversité génétique du pommier, et montre que les géotypes étudiés ont une diversité génétique inestimable qui mérite d'être préservée et valorisée.

En fin, la diversité génétique de cinq populations de puceron cendré de pommier (*D. plantaginea*) a été étudiée et leur structure génétique appréhendée via l'utilisation de 30 marqueurs SSR. Les analyses effectuées ont montré une très faible différenciation génétique entre les populations étudiées ($F_{st}=0.027$) concordant avec des flux de gènes importants ($N_m= 4.30 - 9.19$) et donc de nombreux échanges de migrants entre les différentes populations. Ces résultats laissent suggérer une structure génétique homogène avec une diversité relativement faible des populations de ce ravageur au Maroc. D'autre part, les résultats obtenus montrent que les populations étudiées présentent une diversité génétique faible par rapport aux populations européennes, ce qui semble être dû à l'existence d'un effet

fondateur (nous avons suggéré que les populations de pucerons cendrés au Maroc sont originaires de l'Europe du sud).

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, il paraît clair que la diversité pomologique et génétique importante des géotypes de pommier cultivés au Maroc constitue une base de données très utile dans les travaux de gestion et d'amélioration de cette espèce. En plus, ces résultats apportent des informations de base sur la diversité et la structure génétique du puceron cendré de pommier au Maroc, qui peuvent être exploités dans la gestion durable de ce ravageur qui devient de plus en plus résistant aux traitements massifs et répétés des pesticides, surtout en Europe, mais le Maroc n'est pas à l'abri de reproduire cette situation dans le futur si on n'agit pas correctement.

Quoiqu'il en soit, nos résultats démontrent qu'il est nécessaire d'entreprendre des études supplémentaires afin d'avoir un meilleur portrait de la variabilité génétique du pommier au Maroc. Il est important d'envisager pour la poursuite de ce travail :

- Elargir l'échantillonnage des cultivars de cette espèce à large spectre géographique afin d'étudier des géotypes originaires d'autres régions du Maroc, surtout sauvages (généralement moins sensibles aux maladies et ravageurs)
- Affiner l'analyse de la diversité génétique par l'utilisation d'autres marqueurs moléculaires comme les SNP des génomes nucléaire et cytoplasmiques (chloroplastique et mitochondrial)
- Entamer une caractérisation génétique d'autres ravageurs qui causent le plus de dégâts dans les vergers de pommier au Maroc comme la carpocapse (*Cydia pomonella*) et L'acarien rouge (*Panonychus ulmi*).

Références bibliographiques

- **Abrol DP (2012)** *Pollination biology: biodiversity conservation and agricultural production*. Pp: 111-184. New York: Springer.
- **ACIA (2014)** [Agence canadienne d'inspection des aliments](https://inspection.canada.ca/) (2014). *La biologie du Malus domestica Borkh. (pommier commun)*. <https://inspection.canada.ca/>
- **ACTA (1977)** *Pommier II: cycle évolutif des principaux ennemis*. In: *Contrôles périodiques en verger: pommier*.
- **Agarwal M, Shrivastava N, Padh H (2008)** *Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences*. *Plant cell reports*, 27(4), 617-631.
- **AHDB (2017)** *Nutrient management guide (RB209)*. Agriculture & Horticulture Development Board.
- **Ahmadi-Afzadi M (2012)** *Genetic and biochemical properties of apples that affect storability and nutritional value*.
- **Al Halabi O & Muzher B (2015)** *Genetic diversity of some apple cultivars in the south of Syria based on morphological characters*. *International Journal of Environment*, 4: 86-99
- **Alcaraz ML & Hormaza JI (2007)** *Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs: Molecular characterization and genetic diversity in avocado*. *Hereditas*. 144(6):244–253.
- **Alford DV (2007)** *Pests of Fruit Crops, a colour handbook*. London: Manson publishing Ltd.
- **Alins G, Alegre S, Avilla J (2007)** *Effect of management spontaneous cover crop on rosy apple aphid, green apple aphid and their natural enemies in an apple organic orchard*. In: *Niggli U et al. Improving Sustainability in Organic and Low Input Food Production Systems*, University of Hohenheim, Germany, pp. 256–259.
- **Al-Samarai FR & Al-Kazaz AA (2015)** *Molecular markers: An introduction and applications*. *European journal of molecular biotechnology*, 9(3), 118-130.
- **Angeli G & Simoni S (2006)** *Apple cultivars acceptance by *Dysaphis plantaginea* Passerini (Homoptera: Aphididae)*. *Journal of Pest Science* 79: 175–179.
- **Armstrong KF & Wratten SD (1996)** *The use of DNA analysis and the polymerase chain reaction in the study of introduced pests in New Zealand*. pp. 231–264 in *Symondson, W.O.C. & Liddell, J.E. (Eds) The ecology of agricultural pests: biochemical approaches*. London, Chapman & Hall.
- **Arnal A, Gogorcena Y, Tardío J, Roldán-Ruiz I, Lázaro A (2020)** *Simple Sequence Repeat Characterisation of Traditional Apple Cultivars (*Malus domestica* Borkh.) Grown in the Region of Madrid (Central Spain)*. *Plant Mol Biol Rep*. 38(4):676–690.
- **Auguste C (1921)** *Histoire et amélioration des pommiers et spécialement des pommiers à cidre*. In: *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, 1^e année, bulletin n°3, 1^{er} décembre 1921. pp. 149-215; doi : <https://doi.org/10.3406/jatba.1921.4002>
- **Bailey LG & Bailey EZ (1976)** *Hortus Third: A Concise Dictionary of Plants Cultivated in the United States and Canada*. McMillan Publishing Co., New York (New York).
- **Ban SH, Yun WH, Kim GH, Kwon SI and Choi C (2014)** *Genetic identification of apple cultivars bred in Korea using simple sequence repeat markers*. *Horticulture Environment and Biotechnology* 55(6), 531–539. doi: <https://doi.org/10.1007/s13580-014-0017-6>
- **Barbieri M, Belfanti E, Tartarini S, Vinatzer BA, Sansavini S et al (2003)** *Progress of map-based cloning of the Vf-resistance gene and functional verification: Preliminary results from expression studies in transformed apple*. *HortScience*, 38(3), 329-331.

- **Bassino JP (1982)** *Les pucerons des arbres fruitiers. Travaux recents et perspectives.*
- **Belfanti E, Barbieri M, Tartarini S, Vinatzer B, Gennari, F et al (2004)** *Gala apple transformed with the putative scab resistance gene HcrVf2. Acta Hortic, 663(1), 453-456.*
- **Benelli C, De Carlo A & Engelmann F (2013)** *Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of Actinidia, Diospyros, Malus, Olea, Prunus, Pyrus and Vitis. Biotechnology Advances, 31(2), 175-185.*
- **Ben-Issa R (2014).** *Étude de l'effet de plantes de service (PdS) sur l'installation d'une population du puceron Myzus persicae (Hemiptera Aphididae) : mise en évidence du rôle des composés organiques volatils (COVs). Agronomie. Université d'Avignon, Français. NNT : 2014AVIG0658. tel-01079443.*
- **Benson EE (2008)** *Cryopreservation theory. In Plant cryopreservation: a practical guide (pp. 15-32). Springer, New York, NY.*
- **Bernard A (2020)** *Étude des ressources génétiques du noyer en vue de la mise en œuvre d'une sélection assistée par marqueurs. Biologie végétale. Rapport de thèse. Université de Bordeaux, Français. NNT :2020BORD0128ff. tel-03118714.*
- **Bernardo RJ & Itoiz R (2004)** *Evaluation of the discriminance capacity of RAPD, isoenzymes and morphologic markers in apple (Malus x domestica Borkh.) and the congruence among classifications. Genetic Resources and Crop Evolution, 51(2), 153-160.*
- **Bianco L, Cestaro A, Linsmith G, Muranty H, Denancé C et al (2016)** *Development and validation of the Axiom® Apple 480K SNP genotyping array. The Plant Journal, 86(1), 62-74.*
- **Bianco L, Cestaro A, Sargent DJ, Banchi E, Derdak S et al (2014)** *Development and validation of a 20K single nucleotide polymorphism (SNP) whole genome genotyping array for apple (Malus× domestica Borkh). PloS one, 9(10), e110377.*
- **Bignami C, Scossa A & Vagnoni G (2003)** *Evaluation of old Italian apple cultivars by means of sensory analysis. Acta Horticulturae, 598: 85-90.*
- **Blackman RL, Eastop VF (1984)** *Aphids on the world's crops: an identification guide.*
- **Black-Samuelsson S, Eriksson G, Gustafsson L, Gustafsson P (1997)** *RAPD and morphological analysis of the rare plant species Vicia pisiformis (Fabaceae), Biological Journal of the Linnean Society, Volume 61, Issue 3, July, pp: 325–343,*
- **Blommers LH(1994)** *Integrated pest management in European apple orchards. Annual Review of Entomology, 39(1), 213-241.*
- **Blommers LH (1999)** *Probing natural control of rosy apple aphid Dysaphis plantaginea (Hemiptera: Aphididae). IOBC WPRS BULLETIN, 22(7), 53-56.*
- **Blommers LHM, Helsen HHM & Vaal FWNM (2004)** *Life history data of the rosy apple aphid Dysaphis plantaginea (Pass.)(Homopt., Aphididae) on plantain and as migrant to apple. Journal of Pest Science, 77(3), 155-163.*
- **Bonnemaison L (1959)** *Le puceron cendré du pommier (Dysaphis plantaginea Pass.) Morphologie et biologie–Méthodes de lutte. Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Série C, Epiphyties, 3, 257–322.*
- **Botstein D, White RL, Skolnick M & Davis RW (1980)** *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American journal of human genetics, 32(3), 314.*
- **Boyer J & Liu RH (2004)** *Apple phytochemicals and their health benefits. Nutrition journal, 3(1), 1-15.*
- **Božović D, Lazović B, Ercisli S et al (2016)** *Morphological Characterization of Autochthonous Apple Genetic Resources in Montenegro. Erwerbs-Obstbau 58, 93–102*
- **Bretauudeau .J (1979)** *Atlas d'arboriculture fruitière. vol. 3; 184 p. Paris: Baillière et fils.*
- **Broggini GA, Schlathölter I, Russo G et al (2020)** *Chromosome-scale de novo diploid assembly of the apple cultivar 'Gala Galaxy'. bioRxiv.*

- **Brown AE (2008)** *Variability in abundance of the rosy apple aphid (Dysaphis plantaginea), the role of its alternate host (Plantago major), and potential control strategies in organic apple orchards in British Columbia. A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science. University of British Columbia, Vancouver, Canada, p. 8-38.*
- **Brown AG (1975)** *Apples, p. 3–37. In: J. Janick and J.N. Moore (eds.). Advances in fruit breeding. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Ind.*
- **Brown MW & Mathews CR (2007)** *Conservation biological control of rosy apple aphid, Dysaphis plantaginea (Passerini), in Eastern North America. Environmental Entomology 36: 1131–1139.*
- **Brown SK, Maloney KE (2003)** *Genetic improvement of apple: breeding, markers, mapping and biotechnology. In Apples: Botany, production and uses (pp. 31-59). Wallingford UK: CABI Publishing.*
- **Burgel K, Daniel C, Wyss E (2005)** *Effects of autumn kaolin treatments on the rosy apple aphid, Dysaphis plantaginea (Pass.) and possible modes of action. Journal of Applied Entomology 129: 311–314.*
- **Bussel JD (1999)** *The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of Isotoma petraea (Lobeliaceae). Mol Ecol 8:775–789*
- **Camargo LK, Mogor AF, Resende JT, Da-Silva PR (2013)** *Establishment and molecular characterization of a sweet potato germplasm bank of the highlands of Parana State, Brazil. Genetics and Molecular Research 12:55745588 DOI 10.4238/2013.November.18.7.*
- **Carrasco B, Díaz C, Moya M, Gebauer M, García-González R (2012)** *Genetic characterization of Japanese plum cultivars (Prunus salicina) using SSR and ISSR molecular markers. International Journal of Agriculture and Natural Resources 39, 533–543. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202012000300012>*
- **Chagné D, Crowhurst RN, Troglio M et al (2012).** *Genome-wide SNP detection, validation, and development of an 8K SNP array for apple. PLoS one, 7(2), e31745.*
- **Chee PW, Rong J, Williams-Coplin D, Schulze SR & Paterson AH (2004)** *EST derived PCR-based markers for functional gene homologues in cotton. Genome, 47(3), 449-462.*
- **Chenafi A (2017)** *Gestion de la contrainte de l'irrigation en goutte à goutte avec la double gaine enterrée sur un verger de pommier de type Gala (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider-Biskra).*
- **Chevreau E & Laurens F (1987)** *The pattern of inheritance in apple (Malus x domestica Borkh.): further results from leaf isozyme analysis. Theoretical and applied genetics, 75(1), 90-95.*
- **Comeau A (1992)** *La résistance aux pucerons: aspects théoriques et pratiques in La lutte biologique. Morin, G., (ed.). Boucherville, Canada, Chap.23, 433–449.*
- **Cornille A, Giraud T, Smulders MJ, Roldán-Ruiz I & Gladieux P (2014)** *The domestication and evolutionary ecology of apples. Trends in Genetics, 30(2), 57-65.*
- **Cornille A, Gladieux P, Smulders MJ et al (2012).** *New insight into the history of domesticated apple: secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. PLoS genetics, 8(5), e1002703.*
- **Cross JV, Cubison S, Harris A, Harrington R (2007)** *Autumn control of rosy apple aphid, Dysaphis plantaginea (Passerini), with aphicides. Crop Protection 26: 1140–1149*
- **Crossa J, Hernandez CM, Bretting P, Eberhart SA & Taba S (1993)** *Statistical genetic considerations for maintaining germ plasm collections. Theoretical and Applied Genetics, 86(6), 673-678.*
- **Cruz DeBoelpaep MO, Filipe MN, Afonso VC (1987)** *Dynamique des populations aphidiennes en verger de pommiers. La Défense des Végétaux 246, 5–16*
- **Cummins JN & Aldwinckle HS (1994)** *New resistant rootstocks from Geneva. Fruit varieties journal (USA).*

- **Currie AJ (2000)** *Quantitative genetics in apple (Malus x domestica (Borkh.)) breeding: fruit shape traits, genetic parameter estimation and breeding strategy development: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Animal Science (Breeding and Genetics) at Massey University, Palmerston North, New Zealand (Doctoral dissertation, Massey University).*
- **Daccord N, Celton JM, Linsmith G et al (2017)** *High-quality de novo assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. Nature genetics, 49(7), 1099-1106.*
- **Damyar S, Hassani D, Dastjerdi R, Hajnajari H, Zeinanloo AA & Fallahi E (2007)** *Evaluation of Iranian native apple cultivars and genotypes. Journal of Food, Agriculture & Environment, 5: 211-215.*
- **Dardouri T (2018)** *Implication des composés organiques volatils dans la capacité des plantes de service à perturber le comportement et les performances de Myzus persicae (sulzer) le puceron vert du verger. Autre [q-bio.OT]. Université d'Avignon, Français. NNT : 2018AVIG0702. tel-02178970.*
- **De Carvalho Santos TT, de Oliveira Amorim VB, Dos Santos-Serejo JA et al (2019)** *Genetic variability among autotetraploid populations of banana plants derived from wild diploids through chromosome doubling using SSR and molecular markers based on retrotransposons. Mol Breeding. 39(7):95.*
- **De Riek J, Calsyn E, Everaert I, Van Bockstaele E & De Loose M (2001)** *AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. Theoretical and Applied Genetics, 103(8), 1254-1265.*
- **De-Berardinis E, Baronio P, Baumgärtner J (1994)** *The effect of aphid (Dysaphis plantaginea Pass., Hom., Aphididae) feeding on apple fruit growth. Ecological Modelling 72, 115–127.*
- **Deguette M & Wateau K (2009)** *Le puceron cendré du pommier : mieux connaître sa dynamique pour optimiser le raisonnement de la lutte. Fiche technique FREDON Nord Pasde-Calais, 4 p.*
- **Delorme R, Ayala V, Touton P, Augé D, Vergnet C (1999)** *Le puceron cendré du pommier (Dysaphis plantaginea): Etude des mécanismes de résistance à divers insecticides. In: ANPP PF (ed) Cinquième conférence internationale sur les ravageurs, Montpellier (France), pp 89–97*
- **Dewasish C & Amal M (2010)** *Fruit crops. Oxford book company publisher. Jaipur, India. Pp: 278-290.*
- **Dib H (2010)** *Rôle des ennemis naturels dans la lutte biologique contre le puceron cendré, Dysaphis plantaginea Passerini (Hemiptera: Aphididae) en vergers de pommiers. Thèse de doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Institut National de la Recherche Agronomique, 252 p.*
- **Dice LR (1945)** *Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26, 297-302*
- **Dieudonné E, Gautier H, Dardouri T, Staudt M, Costagliola G & Gomez L (2022).** *Establishing repellent effects of aromatic companion plants on Dysaphis plantaginea, using a new dynamic tubular olfactometer. Entomologia Experimentalis et Applicata 00: 1– 17.*
- **Dittrich-Schroder G, Hurley BP, Wingfield MJ, Nahrung HF, Slippers B (2020)** *Invasive gall-forming wasp that threaten non-native plantation-grown Eucalyptus: diversity and invasion patterns. Agric For Entomol, 22(4):285–297. <https://doi.org/10.1111/afe.12402>.*
- **Dou el macanew L & skiredj A (2003)** *L'abricotier, le prunier, le poirier, et le pommier. Transfert de Technologie en Agriculture. Fiches techniques. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat ; Bulletin Mensuel D'information et de liaison du pntta transfert de Technologie en Agriculture royaume du Maroc, ministère de l'agriculture et du développement rural mader/derd, août 2003, N°107, 1-4.*

- **Doyle JJ & Doyle JL (1987)** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p.11-15.
- **Doyle JJ & Doyle JL (1990)** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15,
- **Duan N, Bai Y, Sun H et al (2017)** Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. *Nature Communications*, 8(1), 1-11.
- **Earl DA & Von Holdt BM (2012)** STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361.
- **Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991)** A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research*, vol. 19, no 6, p. 1349.
- **Emanuelli F, Lorenzi S, Grzeskowiak L, Catalano V, Stefanini M, Troglio M et al (2013)** Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. *BMC Plant Biol.* 13:39. doi: 10.1186/1471-2229-13-39
- **Engelmann F (2012)** Germplasm collection, storage and preservation. In: Altman A, Hazegawa PM (eds) *Plant biotechnology 2010: basic aspects and agricultural implications*, Elsevier, pp 255–268.
- **Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005)** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology* 14, 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- **Evans KM, Patocchi A, Rezzonico F, Mathis F, Durel CE et al (2011)** Genotyping of pedigreed apple breeding material with a genome-covering set of SSRs: trueness-to-type of cultivars and their parentages. *Molecular Breeding*, 28(4), 535-547.
- **Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992)** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data, *Genetics*, Volume 131 pp: 479-491
- **Fan Z, Jiang GF, Liu YX, He QX (2014)** Blanchard, B. Population explosion in the yellow-spined bamboo Locust *Ceracris kiangsu* and inferences for the impact of human activity. *PLoS ONE*, 9, e89873.
- **FAO (2003)** Rapport du Groupe d'Experts Eminents en Matière d'Éthique Alimentaire et Agricole Deuxième Session, 18-20 Mars 2002. Food & Agriculture Org.
- **FAO (2010)** Le Deuxième Rapport sur L'ÉTAT DES RESSOURCES PHYTOGÉNÉTIQUES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE DANS LE MONDE Food & Agriculture Org, Rome, 2010
- **FAO (2010)** The Second Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome. <http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/i1500e00.pdf>
- **FAOSTAT (2020)** Food and Agriculture Association of the United States [Internet]. cited 28 Jan 2022. Available: <http://www.fao.org/faostat/en/>.
- **Fazeli S, Sheidai M, Farahani F & Noormohammadi Z (2016)** Looking for genetic diversity in Iranian apple cultivars (*Malus × domestica* Borkh.). *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 27(3), 205-215.
- **Fedrigo K, Giacomini RM, Faria CMDR, Da-Silva PR (2016)** ISSR primers for analysis of genetic variability of *Stenocarpella maydis*. *Tropical Plant Pathology* 41:16 DOI 10.1007/s40858-016-0089-1
- **Feldsine P, Abeyta C & Andrews WH (2002)** AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. *Journal of AOAC International*, 85(5), 1187-1200.
- **Ferrara G, Giancaspro A, Mazzeo A et al (2014)**. Characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes collected in Puglia region, Southeastern Italy. *Scientia Horticulturae*. 178:70–78. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.08.007>.

- **Ferreira ME, Grattapaglia D (1998)** *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 3a ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEN, pp: 220.*
- **Ferreira V, Ramos-Cabrer AM, Carnide V et al (2016)** Genetic pool structure of local apple cultivars from Portugal assessed by microsatellites. *Tree Genetics & Genomes. 12(3):36.* <https://doi.org/10.1007/s11295-016-0997-8>.
- **Flachowsky H & Hanke MV (2011)** 5 Transgenic Fruit. *Transgenic Horticultural Crops: Challenges and Opportunities, 125.*
- **Flachowsky H, Hanke MV, Peil A, Strauss SH, Fladung M (2009)** A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. *Plant Breed 128:217–226*
- **Flachowsky H, Peil A, Sopanen T, Elo A & Hanke V (2007)** Overexpression of BpMADS4 from silver birch (*Betula pendula* Roth.) induces early-flowering in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant Breeding, 126(2), 137-145.*
- **Flachowsky H, Szankowski I, Waidmann S, Peil A, Tränkner C & Hanke MV (2012)** The MdTFL1 gene of apple (*Malus × domestica* Borkh.) reduces vegetative growth and generation time. *Tree Physiology, 32(10), 1288-1301.*
- **Footitt RG, Halbert SE, Miller GL, Maw E, Russell LM (2006)** Adventive aphids (Hemiptera: Aphididae) of America north of Mexico. *Proceedings of the Entomological Society of Washington, 108, 583-610* <https://handle.nal.usda.gov/10113/8716>
- **Froni I, Baptista C, Monteiro L et al (2012)** The use of microsatellites to analyze relationships and to decipher homonyms and synonyms in Azorean apples (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant Syst Evol 298, 1297–1313 (2012).* <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0637-1>.
- **Forrest JMS & Dixon AFG (1975)** The induction of leaf-roll galls by the apple aphids *Dysaphis devector* and *D. plantaginea*. *Annals of Applied Biology 81, p. 281–288*
- **Forrest JMS (1987)** Gallling aphids. In: Minks, A.K., Harrewijn, P., (eds.). *World crop pests – Aphids, their biology, natural enemies and control, vol. 2A.* Elsevier, Amsterdam/New York, pp. 341–353.
- **Fuller SJ, Chavigny P, Lapchin L & Vanlerberghe-Masutti F (1999)** Variation in clonal diversity in glasshouse infestations of the aphid *Aphis gossypii* Glover in southern France. *Molecular Ecology 8, 1867–1877.*
- **Galli Z, Halász G, Kiss E, Heszky L & Dobránszki J (2005)** Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers. *HortScience, 40(7), 1974-1977.*
- **Ganopoulos I, Tourvas N, Xanthopoulou A et al (2018)** Phenotypic and molecular characterization of apple (*Malus × domestica* Borkh) genetic resources in Greece. *Sci agric (Piracicaba, Braz). 75(6):509–518.* <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0499>.
- **Gao QH, Wu PT, Liu JR, Wu CS, Parry JW & Wang M (2011)** Physico-chemical properties and antioxidant capacity of different jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) cultivars grown in loess plateau of China. *Scientia Horticulturae, 130: 67-72.*
- **Gardiner SE, Bassett HCM, Noiton DAM et al (1996)** A detailed linkage map around an apple scab resistance gene demonstrates that two disease resistance classes both carry the Vf gene. *Theoretical and Applied Genetics, 93(4), 485-493.*
- **Garkava-Gustavsson L, Mujaju C, Sehic J et al (2013).** Genetic diversity in Swedish and Finnish heirloom apple cultivars revealed with SSR markers. *Scientia Horticulturae. 162:43–48.* <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.07.040>.
- **Garkava-Gustavsson L, Kolodinska Brantestam A, Sehic J & Nybom H (2008)** Molecular characterisation of indigenous Swedish apple cultivars based on SSR and S-allele analysis. *Hereditas, 145(3), 99-112.*
- **Garnas JR, Auger-Rozenberg M, Roques A et al (2016)** Complex patterns of global spread in invasive insects: eco-evolutionary and management consequences. *BiolInvasions.; 18 (4):935–952.* <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1082-9>.

- **Gasi F, Simon S & Pojski N (2011)** Analysis of morphological variability in Bosnia and Herzegovina's autochthonous apple germplasm. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9: 444-448.
- **Gasi F, Simon S, Pojskic N, Kurtovic M, Pejic I (2010)** Genetic assessment of apple germplasm in Bosnia and Herzegovina using microsatellite and morphologic markers. *Scientia Horticulturae*. 126(2):164–171. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.002>.
- **Gautier M (1987)** *La culture fruitière, V 1, L'arbre fruitier. Tech. et Docum., Paris.*
- **Gessler C & Pertot I (2012)** Vf scab resistance of *Malus*. *Trees*, 26(1), 95-108.
- **Gharghani A, Zamani Z, Talaie A et al (2009)** Genetic identity and relationships of Iranian apple (*Malus × domestica* Borkh.) cultivars and landraces, wild *Malus* species and representative old apple cultivars based on simple sequence repeat (SSR) marker analysis. *Genet Resour Crop Evol* 56:829–842. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9404-0>
- **Gilbert JE, Lewis RV, Wilkinson MJ, Caligari PDS (1999)** Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theoretical and Applied genetics* 98, 1125–1131. <https://doi.org/10.1007/s001220051176>
- **Giraud H, Cornille A, Giraud T (2014)** *Les pérégrinations du pommier domestique. Pour la Science - n° 439 - Mai 2014*
- **Goffaux R, Goldringer I, Bonneuil C, montalent P & Bonnin I (2011)** Quels indicateurs pour suivre la diversité génétique des plantes cultivées ? Le cas du blé tendre cultivé en France depuis un siècle. *Rapport FRB, Série Expertise et synthèse, 2011, 44 pages.*
- **Gore PG, Gowthmi R, Tripathi K, Malav PK, Tyagi V, Singh N & Gupta V (2022)** Genetic Resources. In *Environment and Climate-smart Food Production* (pp. 109-149). Springer, Cham.
- **Gottschalk C & van Nocker S (2013)** Diversity in seasonal bloom time and floral development among apple species and hybrids. *J Am Soc Hortic Sci*. 138:367–374.
- **Goulão L, & Oliveira CM (2001)** Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica*, 122(1), 81-89.
- **Graf B, Höpli HU, Höhn H & Samietz J (2006)** Temperature effects on egg development of the rosy apple aphid and forecasting of egg hatch. *Entomologia experimentalis et applicata*, 119(3), 207-211.
- **Grativol C, Lira-Medeiros CF, Hemerl Y, Ferreira PC (2011)** High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. *Molecular Biology Reports* 38:42454256 DOI 10.1007/s11033-010-0547-7.
- **Gross BL, Henk AD, Richards CM, Fazio G & Volk GM (2014)** Genetic diversity in *Malus × domestica* (Rosaceae) through time in response to domestication. *American journal of botany*, 101(10), 1770-1779.
- **Guarino C, Santoro S, De Simone L, Lain O, Cipriani G & Testolin R (2006)** Genetic diversity in a collection of ancient cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) as revealed by SSR-based fingerprinting. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81(1), 39-44.
- **Guillemaud T, Blin A, Simon S, Morel K, Franck P (2011)** Weak Spatial and Temporal Population Genetic Structure in the Rosy Apple Aphid, *Dysaphis plantaginea*, in French Apple Orchards. *PLOS ONE*, 6, e21263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021263>
- **Guinea E (1957)** Apples in Spain-Asturias. Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, Madrid. Record Number : 19570304002.
- **Hammer K & Teklu Y (2008)** Plant genetic resources: selected issues from genetic erosion to genetic engineering. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics (JARTS)*, 109(1), 15-50.
- **Hancock JF, Luby JJ, Brown SK & Lobos GA (2008)** Apples. In *Temperate fruit crop breeding* (pp. 1-38). Springer, Dordrecht.

- **Handan BA, De Moura CFG, Cardoso CM, Santamarina AB, Pisani LP & Ribeiro DA (2020)** Protective effect of grape and apple juices against cadmium intoxication in the kidney of rats. *Drug Research*, 70(11), 503-511.
- **Harris SA, Robinson JP & Juniper BE (2002)** Genetic clues to the origin of the apple. *TRENDS in Genetics*, 18(8), 426-430.
- **Hartl DL & Clark AG (1997)** *Principles of Population Genetics*. SunderlandMA, ,U.S.A.: Sinauer Associates, Inc.
- **Harvey NG, Fitzgerald JD, James CM, Solomon MG (2003)** Isolation of microsatellite markers from the rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea*. *Molecular Ecology Notes* 3, 111–112.
- **Heinonen M & Bitz L (2019)** How to discover traditional varieties and shape in a National Germplasm Collection: the case of Finnish seed born apples (*Malus × domestica* Borkh.). *Sustainability*. 11(24):7000. <https://doi.org/10.3390/su11247000>.
- **Hemmat M, Weeden NF & Brown SK (2003)** Mapping and evaluation of *Malus × domestica* microsatellites in apple and pear. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(4), 515-520.
- **Hemmat, M., Weedon, N. F., Manganiaris, A. G., & Lawson, D. M. (1994)**. Molecular marker linkage map for apple. *Journal of heredity*, 85(1), 4-11.
- **Hemptinne JL, Dixon AFG, Guillaume P, Bouchery Y, Gaspar C (1995)** Programme de production intégrée contre le puceron des pommiers *Dysaphis plantaginea* Passerini (Homoptère: Aphididae): prévision des variations saisonnières et annuelles de la densité des populations. *Le Fruit Belge* 456, 111–116
- **Höfer M & Meister A (2010)** Genome Size Variation in *Malus* Species. *Journal of Botany*.
- **Hokanson SC, Lamboy WF, Szewc-McFadden AK & Mc-Ferson JR (2001)** Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. *Euphytica*, 118(3), 281-294.
- **Hull LA & Van-Starner R (1983)** Effectiveness of insecticide applications timed to correspond with the development of rosy apple aphid (Homoptera: Aphididae) on apple. *Journal of Economic Entomology*, 76(3), 594-598.
- **Hullé M, Turpeau E, Leclant F, Rahn MJ (1998)** Les pucerons des arbres fruitiers : cycles biologiques et activités de vol. Paris : Association de Coordination Technique Agricole : Institut National de la Recherche Agronomique.
- **Hyson DA (2011)** A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. *Advances in nutrition*, 2(5), 408.
- **IBPGR (1982)** *Descriptor List for Apple (Malus)*. International Board for Plant Genetic Resources, Rome (Italy); Commission of the European Communities (CEC) 46 p.
- **IPGRI. (1996)** European *Malus* germplasm. In: H.J. Case (ed.), *Proceedings of a Workshop*, 21–24 June 1995. Wye College, University of London.
- **Isshiki S, Iwata N, Khan MMR (2008)** ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. *Scientia Horticulturae* 117:186 -190
- **Jackson JE (2003)** *Biology of apples and pears*. Cambridge University Press, Cambridge.
- **Jakobsson M & Rosenberg NA (2007)** CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801-1806.
- **Janick J & Moore JN (1996)** *Fruit breeding, tree and tropical fruits (Vol. 1)*. John Wiley & Sons.
- **Jänsch M, Brogginini GA, Weger J, Bus VG, Gardiner SE, Bassett H & Patocchi A (2015)** Identification of SNPs linked to eight apple disease resistance loci. *Molecular breeding*, 35(1), 1-21.
- **Jarne P & Lagoda PJ (1996)** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*, 11(10), 424-429.

- **Jarvis DI, Brown AHD, Cuong PH et al (2008)** A global perspective of the richness and evenness of traditional crop-variety diversity maintained by farming communities. *PNAS*, Vol. 105 14:5326-5331.
- **Jefferies C.J & Brain P (1984)** A mathematical model of pollen-tube penetration in apple styles. *Planta*, 160(1), 52-58.
- **Jönsson Å (2007)** Organic apple production in Sweden: cultivation and cultivars (Doctoral dissertation, Department of Crop Science, Swedish University of Agricultural Sciences).
- **Joshi SG, Schaart JG, Groenwold R, Jacobsen E, Schouten HJ & Krens FA (2011)** Functional analysis and expression profiling of HcrVf1 and HcrVf2 for development of scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant molecular biology*, 75(6), 579-591.
- **Jung M, Roth M, Aranzana MJ et al (2020)** The apple REFPOP-a reference population for genomics-assisted breeding in apple. *Hortic Res.*; 7:189. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00408-8> PMID:33328447
- **Juniper BE & Mabberley DJ (2006)** *The story of the apple*. Timber Press (OR).
- **Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007)** Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol*. 16:1099–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>.
- **Kaneko S (2003)** Impacts of two ants, *Lasius niger* and *Pristomyrmex pungens* (Hymenoptera: Formicidae), attending the brown citrus aphid, *Toxoptera citricidus* (Homoptera: Aphididae), on the parasitism of the aphid by primary parasitoid, *Lysiphlebus japonicus* (Hymenoptera). *Appl. Entomol. Zool.* 38: 347–357.
- **Karatas N (2022)** Morphological, sensory and biochemical characteristics of summer apple genotypes. *Brazilian Journal of Biology* 82, 1–10. doi: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.234780>
- **Kebe M (2014)** Incidence de traitements thermiques sur le parenchyme de Pomme (*Malus Domestica*) et diffusion des composés phénoliques (Doctoral dissertation, Université d'Avignon).
- **Kemp H (1996)** Pollination results of apple, *Malus*, pear, plum and cherry of the international working group on pollination. Pages 243-298 *Acta Hort.* (ISHS).
- **Khachtib Y, Bouda S, Ait Bella Y, Haddioui A (2020)**. Pomological Evaluation of Apple (*Malus x domestica* Borkh) Germplasm in Morocco. *Phytomorphology*. 70(1 & 2):1–9.
- **Khan MA, Olsen KM, Sovero V, Kushad MM, Korban SS (2014)** Fruit quality traits have played critical roles in domestication of the apple. *Plant Genome*; 7:1.
- **King GJ, Alston FH, Battle I et al (1991)** The 'European Apple Genome Mapping Project'-developing a strategy for mapping genes coding for agronomic characters in tree species. *Euphytica*, 56(1), 89-94.
- **Király I, Ladanyi M, Nagyistvan O & Toth M (2015)** Assessment of diversity in a Hungarian apple gene bank using morphological markers. *Organic Agriculture*, 5: 143-151.
- **Király I, Redeczki R, Erdélyi É, Tóth M (2012)** Morphological and molecular (SSR) analysis of old apple cultivars. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca* 40:269–275
- **Kitahara K, Matsumoto S, Yamamoto T, Soejima J, Kimura T, Komatsu H & Abe K (2005)** Parent identification of eight apple cultivars by S-RNase analysis and simple sequence repeat markers. *HortScience*, 40(2), 314-317.
- **Koc A, Akbulut M, Orhan E, Celik Z, Bilgener S & Ercisli S (2009)** Identification of Turkish and standard apple rootstocks by morphological and molecular markers. *Genetics and Molecular Research*, 8(2), 420-425.
- **Koebner RM & Summers RW (2003)** 21st century wheat breeding: plot selection or plate detection?. *TRENDS in Biotechnology*, 21(2), 59-63.
- **Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg MA, Mayrose I (2015)** Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences

across *K. Molecular ecology resources*. 15(5):1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>.

- **Kost TD, Gessler C, Jänsch M, Flachowsky H, Patocchi A & Brogгинi GA (2015)** Development of the first cisgenic apple with increased resistance to fire blight. *PLoS One*, 10(12), e0143980.
- **Krens FA, Schaart JG, Van der Burgh AM et al (2015)** Cisgenic apple trees; development, characterization, and performance. *Frontiers in plant science*, 6, 286.
- **Kumar C, Singh SK, Singh R, Pramanick KK et al (2019)** Genetic diversity and population structure analysis of wild *Malus* genotypes including the crabapples (*M. baccata* (L.) Borkh. & *M. sikkimensis* (Wenzig) Koehne ex C. Schneider) collected from the Indian Himalayan region using microsatellite markers. *Genet Resour Crop Evol*. 66(6):1311–1326.
- **Kumar C, Singh SK, Pramanick KK, Verma MK and Srivastav M (2018)** Morphological and biochemical diversity among the *Malus* species including indigenous Himalayan wild apples. *Scientia Horticulturae* 233, 204–219. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.037>
- **Kumar LS (1999)** DNA markers in plant improvement: an overview. *Biotechnology advances*, 17(2-3), 143-182.
- **Kumari A, Kumar J, Kumar A, Chaudhury A & Singh SP (2015)** Grafting triggers differential responses between scion and rootstock. *PLoS One*, 10(4), e0124438.
- **Laffin R, Langor D, Sperling F (2004)** Population structure and gene flow in the white pine weevil, *Pissodes strobe* (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 97, 949–956.
- **Larsen B, Gardner K, Pedersen C et al (2018)** Population structure, relatedness and ploidy levels in an apple gene bank revealed through genotyping-bysequencing. *PLoS One* 13:e0201889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201889>
- **Larsen B, Toldam-Andersen TB, Pedersen C, Ørgaard M (2017)** Unravelling genetic diversity and cultivar parentage in the Danish apple gene bank collection. *Tree Genet Genomes* 13:14.<https://doi.org/10.1007/s11295-016-1087-7>
- **Lassois L, Denancé C, Ravon E et al (2016)** Genetic Diversity, Population Structure, Parentage Analysis, and Construction of Core Collections in the French Apple Germplasm Based on SSR Markers. *Plant Mol Biol Rep*. 34(4):827–844. <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0966-7>.
- **Lathrop FH (1928)**The biology of apple aphids. *Ohio J. Sci.* 28: 177–204.
- **Lešnik M, Pintar C, Lobnik A, Kolar M (2005)** Comparison of the effectiveness of standard and driftreducing nozzles for control of some pests of apple. *Crop Protection* 24, 93–100.
- **Li BQ, Feng CH, Wang MR, Hu LY, Volk G & Wang QC (2015)** Recovery patterns, histological observations and genetic integrity in *Malus* shoot tips cryopreserved using droplet-vitrification and encapsulation-dehydration procedures. *Journal of Biotechnology*, 214, 182-191.
- **Li FP, Lee YS, Kwon SW, Li G, Park YJ (2014)** Analysis of genetic diversity and trait correlations among Korean landrace rice (*Oryza sativa* L.). *Genet Mol Res*. 13(3):6316–31. <https://dx.doi.org/10.4238/2014.April.14.12>.
- **Liang W, Dondini L, De Franceschi P, Paris R, Sansavini S, Tartarini S (2015)** Genetic Diversity, Population Structure and Construction of a Core Collection of Apple Cultivars from Italian Germplasm. *Plant Mol Biol Rep*. 33(3):458–473. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0754-9>.
- **Liebhart R, Koller B, Gianfranceschi L & Gessler C (2003)** Creating a saturated reference map for the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(8), 1497-1508.
- **Litt M & Luty JA (1989)** A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 44(3), 397.

- **Lobo AR, Satish S & Shabaraya AR (2018)** Review on pharmacological activities of *Malus Domestica*. *Int. J. Pharm. Chem. Res*, 4, 243-246.
- **Loxdale HD, Hardie JIM, Halbert S, Footitt R, Kidd NA, Carter CI (1993)** The relative importance of short-and long-range movement of flying aphids. *Biological Reviews*, 68, 291–311. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1993.tb00998.x>
- **Luby JJ (2003)** Taxonomic classification and brief history. In *Apples: botany, production and uses* (pp. 1-14). Wallingford UK: Cabi Publishing.
- **Lund B, Ortiz R, Skovgaard I, Waugh R & Andersen S (2003)** Analysis of potential duplicates in barley gene bank collections using re-sampling of microsatellite data. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(6), 1129-1138.
- **Ma B, Chen J, Zheng H, Fang T, Ogutu C, Li S, Han Y & Wu B (2015)** Comparative assessment of sugar and malic acid composition in cultivated and wild apples. *Food Chemistry*, 172,86 – 9 1.
- **Maggioni L, Janes R, Hayes A et al (1997)** Report of a working group on *Malus/Pyrus*. First meeting, 15–17 May. Dublin, Ireland. IPGRI, Roma
- **Maggs D, Martin G & Needs R (1971)** The spread of cross-pollination in a solid block of Granny Smith apples. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 11(48):113-117.
- **Malnoy M, Xu M, Borejsza-Wysocka E, Korban SS & Aldwinckle HS (2008)** Two receptor-like genes, *Vfa1* and *Vfa2*, confer resistance to the fungal pathogen *Venturia inaequalis* inciting apple scab disease. *Molecular plant-microbe interactions*, 21(4), 448-458.
- **Manganaris AG & Alston FH (1988)** Inheritance and linkage relationships of glutamate oxaloacetate transaminase isoenzymes in apple. *Theoretical and Applied Genetics*, 76(3), 449-454.
- **Mantel N (1967)** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research*. 27, 209–220.
- **MAPM (2014)** Ministère de l'Agriculture, de la Pêche Maritime, du Développement Rural et des Eaux et Forêts. Note de veille stratégique de la filière pommier.
- **MAPM (2019)** Ministère de l'Agriculture, de la Pêche Maritime, du Développement Rural et des Eaux et Forêts. Rapport du FDA, Les Aides Financières de l'État pour la promotion des investissements agricoles. Édition AVRIL 2019.
- **Marconi G, Ferradini N, Russi L, Concezzi L, Veronesi F, Albertini E (2018)** Genetic Characterization of the Apple Germplasm Collection in Central Italy: The Value of Local Varieties. *Front Plant Sci*. 9:1460. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01460>.
- **Mariano LC, Zchonski FL, Da Silva CM, Da-Silva PR (2019)** Genetic variability in a Brazilian apple germplasm collection with low chilling requirements. *PeerJ* 6:e6265.
- **Marko V, Blommers LHM, Bogyá S, Helsen H (2008)** Kaolin particle films suppress many apple pests, disrupt natural enemies and promote woolly apple aphid. *Journal of Applied Entomology* 132: 26–35.
- **Massonnet C (2004)** Variabilité architecturale et fonctionnelle du système aérien chez le pommier (*Malus domestica* Borkh.): comparaison de quatre cultivars par une approche de modélisation structure-fonction (Doctoral dissertation, Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier-AGRO M).
- **Mažeikienė I, Bronė-Šikšnianienė J, Baniulis D et al (2019)** SSR analysis based on molecular characterisation of apple germplasm in Lithuania. *Zemdirbyste-Agriculture* 106:159–166. doi: <https://doi.org/10.13080/z-a.2019.106.021>
- **Meekins JF, Ballard HE, McCarthy BC (2001)** Genetic variation and molecular biogeography of a North American invasive plant species (*Alliaria Petiolata*, Brassicaceae), *Int. J. Plant Sci.*, Volume 162, pp: 161-169
- **Michaud L (2018)** La tomate: de la terre à la table. Éditions MultiMondes.
- **Migicovsky Z, Gardner KM, Richards C et al (2021)** Genomic consequences of apple improvement. *Horticulture Research*, 8, 9.

- **Miles PW (1989)** *The responses of plants to the feeding of Aphidoidea: principles*. In: Minks, A.K., Harrewijn, P., (eds.). *World crop pests – Aphids vol. 2C*. Elsevier, Amsterdam/New York, pp. 1–22.
- **Minarro M & Dapena E (2007)** *Resistance of apple cultivars to *Dysaphis plantaginea* (Hemiptera: Aphididae): role of tree phenology in infestation avoidance*. *Environmental Entomology* n°36, p. 1206-1211.
- **Minarro M & Dapena E (2008)** *Tolerance of some scab-resistant apple cultivars to the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea**. *Crop Protection* 27: 391–395.
- **Minarro M, Fernandez-Mata G, Medina P (2010)** *Role of ants in structuring the aphid community on apple*. *Ecological Entomology* 35, 206–215.
- **Minarro M, Hemptinne JL, Dapena E (2005)** *Colonization of apple orchards by predators of *Dysaphis plantaginea*: sequential arrival, response to prey abundance and consequences for biological control*. *BioControl* n°50, p. 403-414
- **Mir JI, Ahmed N, Singh DB, Padder BA, Shafi W, Zaffer S, Hamid A & Bhat HA (2017)** *Diversity evaluation of fruit quality of apple (*Malus x domestica* Borkh.) germplasm through cluster and principal component analysis*. *Indian Journal of Plant Physiology*, 22: 221-226.
- **Moss DW (1982)** *Alkaline phosphatase isoenzymes*. *Clinical chemistry*, 28(10), 2007-2016.
- **Mratinić E & Akšić M (2012)** *Phenotypic diversity of apple (*Malus* sp.) germplasm in the South Serbia*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43: 331-340.
- **Mudge K, Janick J, Scofield S & Goldschmidt EE (2009)** *A history of grafting*. *Horticultural Reviews*, Volume 35. <https://doi.org/10.1002/9780470593776.ch9>.
- **Nagy C & Markó V, Cross J (2007)** *Effects of exclusion or supplementary honey feeding of the common black ant, *Lasius niger* (L.), on aphid populations and natural enemies on apple*. *IOBC/wprs Bulletin* 30, 43–50
- **Nagy C, Cross JV & Marko V (2013)** *Sugar feeding of the common black ant, *Lasius niger* (L.), as a possible indirect method for reducing aphid populations on apple by disturbing ant-aphid mutualism*. *Biological Control* 65(1), 24-36.
- **Nagy C, Cross JV & Marko V (2015)** *Can artificial nectaries outcompete aphids in antaphid mutualism? Applying artificial sugar sources for ants to support better biological control of rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* Passerini in apple orchards*. *Crop Protection* 77, 127-138.
- **Nandakumar N, Singh AK, Sharma RK, Mohapatra T, Prabhu KV & Zaman FU (2004)** *Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers*. *Euphytica*, 136(3), 257-264.
- **Nei M & LI WH (1979)** *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76:5269-5273
- **Nei M (1972)** *Genetic distance between populations*. *The American Naturalist* 106, 283–292. <http://dx.doi.org/10.1086/282771>
- **Nei M (1978)**. *Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals*. *Genetics*. 89(3):583–590. <https://doi.org/10.1093/genetics/89.3.583>.
- **Nicol D, Armstrong KF, Wratten SD, Walsh P, Cameron CM, Lahmann C & Frampton C (1997)** *Genetic variation of two introduced aphid species in New Zealand*. *Proceedings of the fiftieth New Zealand Plant Protection Conference 1997*, 322–326
- **OECD (2019)** *Organisation for Economic Co-operation and Development. CONSENSUS DOCUMENT ON THE BIOLOGY OF APPLE (*Malus domestica* Borkh.)*. ENV/JM/MONO(2019)30
- **Olvera-Vazquez SG, Remoué C, Venon A et al (2021)** *Large-scale geography survey provides insights into the colonization history of a major aphid pest on its cultivated apple host in Europe, North America and North Africa*. *Peer Community Journal*, 1.

- **Omasheva. ME, Pozharsky AS, Smailov BB, Ryabushkina NA, Galiakparov NN (2018)** Genetic Diversity of Apple Cultivars Growing in Kazakhstan. *Russ J Genet.* 54(2):176–187.
- **O'Rourke D (2003)** World apple cultivar dynamics.
- **Ostrowski MF, David J, Santoni S, Mckhann H et al (2006)** Evidence for a large-scale population structure among accessions of *Arabidopsis thaliana*: possible causes and consequences for the distribution of linkage disequilibrium. *Molecular Ecology.* 15(6):1507–1517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02865.x>.
- **Oukabli A (2012)** Le pommier : Facteurs de choix variétal pour investir de nouveaux bassins de production. INRA-Meknès,
- **Oukabli A, Mahhou A, Benbella M, Sekkat A, Serghini N, Achbani H (2011)** Le pommier au Maroc. Institut National de la Recherche Agronomique, division de l'information et de la communication.
- **Pathak H & Dhawan V (2012)** ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793. *In Vitro CellDevBiol-Plant* 48, 137–143. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9385-0>
- **Patocchi A, Fernández-Fernández F, Evans K et al (2009)** Development and test of 21 multiplex PCRs composed of SSRs spanning most of the apple genome. *Tree Genetics & Genomes.* 5(1):211–223. <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0176-7>.
- **Patocka J, Bhardwaj K, Klimova B et al (2020)** *Malus domestica*: A review on nutritional features, chemical composition, traditional and medicinal value. *Plants,* 9(11), 1408.
- **Patzak J, Henychová A & Paprštein F (2009)** Evaluation of old and local apple (*Malus × domestica* borkh.) Varieties from genetic resources by molecular genetic ssr analysis. *Agriculture/Pol'nohospodárstvo,* 55(1).
- **Peakall ROD & Smouse PE (2006)** GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes.* 6(1):288–295.
- **Peil A, Kellerhals M, Höfer M & Flachowsky H (2011)** Apple breeding—from the origin to genetic engineering. *Fruit Veg Cereal Sci Biotechnol,* 5, 118-38.
- **Pereira-Lorenzo S, Fischer M, Ramos-Cabrer AM and Castro I (2018a)** Apple (*Malus* spp.) Breeding: Present and Future. In *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits*, ed. J, E. A.-K., SM, J., and V., J. D. (Springer International Publishing), 3-29.
- **Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM & Díaz-Hernández MB (2007)** Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (*Malus × domestica* Borkh.) from Spain using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution,* 54(2), 405-420.
- **Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM, Ascasibar-Errasti J, Piñeiro-Andión J (2003)** Analysis of apple germplasm in Northwestern Spain. *J Am Soc Hort Sci* 128(1):67–84.
- **Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM, Ferreira V et al (2018b)** Genetic diversity and core collection of *Malus × domestica* in northwestern Spain, Portugal and the Canary Islands by SSRs. *Scientia Horticulturae.* 240:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.053>.
- **Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM, Gonzalez-Diaz AJ & Diaz-Hernandez MB (2008)** Genetic assessment of local apple cultivars from La Palma, Spain, using simple sequence repeats (SSRs). *Scientia Horticulturae,* 117(2), 160-166.
- **Pérez Romero LF, Suárez-García MP, Dapena de la Fuente E, & Rallo Morillo P (2015)** Molecular and morphological characterization of local apple cultivars in Southern Spain. *Genetics and Molecular Research,* 2015 (14 (1)), 1487-1501.
- **Perrier X & Jacquemoud-Collet. JP (2006)** DARwin Software. Available online: <http://darwin.cirad.fr/> (accessed on 24 December 2020).
- **Ping He, Li L., Li H, Wang H, Yang J, Wang Y (2011)** Genetic analysis of wild apple resources in Shandong province based on inter-simple sequence repeats (ISSR) and sequence specific amplification polymorphism (S-SAP) markers. *African Journal of Biotechnology* 10, 9501_9508. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1111>

- **Piñol J, Espadaler X, Pérez N, Cañellas N (2009)** Effects of the concurrent exclusion of ants and earwigs on aphid abundance in an organic citrus grove. *BioControl* 54, 515–527.
- **Potter D, Eriksson T, Evans RC et al (2007)** Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution* 266:5-43.
- **Potts SM, Han Y, Khan MA, Kushad MM, Rayburn AL, Korban SS (2012)** Genetic diversity and characterization of a core collection of *Malus* germplasm using simple sequence repeats (SSRs). *Plant Molecular Biology Reporter*. 30(4):827–837.
- **Pradeep Reddy M, Sarla N & Siddiq EA (2002)** Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *euphytica*, 128(1), 9-17.
- **Pratt C (1988)** Apple flower and fruit: Morphology and anatomy. *Horticultural Reviews* 10:273-308.
- **Primmer CR (2009)** From conservation genetics to conservation genomics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1162(1), 357-368.
- **Pritchard JK, Wen W, Falush D (2010)** Documentation for STRUCTURE software: Version 2. University of Chicago, Chicago, IL.
- **Qubbaj T, Reineke A, Zebitz CPW (2005)** Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 115: 145–152.
- **Queller DC, Strassmann JE & Hughes CR (1993)** Microsatellites and kinship. *Trends in ecology & evolution*, 8(8), 285-288.
- **Radoslav A, Hristina K & Donka R (2012)** Non-chemical control of *Aphis spiraecola* patch and *Dysaphis plantaginea* pass on apple. *JBiopest* n°5, p. 239-242.
- **Randhawa HS, Asif M, Pozniak C et al (2013)**. Application of molecular markers to wheat breeding in Canada. *Plant Breeding*, 132(5), 458-471.
- **Reddy MP, Sarla N & Siddiq EA (2002)**. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128(1), 9–17.
- **Reed BM & Uchendu E (2008)** Controlled rate cooling. In: Reed BM (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, Berlin, pp 77–92.
- **Reig G, Blanco A, Cstillo AM, Gogorcena Y & Moreno MA (2015)** Phenotypic diversity of Spanish apple (*Malus x domestica* Borkh) accessions grown at vulnerable climatic conditions of the Ebro Valley, Spain. *Scientia Horticulturae*, 185: 22-37.
- **Ricard JM, Garcin A, Jay M & Mandrin JF (2012)** Biodiversité et régulation des ravageurs en arboriculture fruitière. Paris : CTIFL. ISBN 978-2-87911-325-8.
- **Rieger M (2006)** Introduction to fruit crops. Food Products Press, Binghamton.
- **Rohlf FJ (2000)** NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1." New York: Exeter Software.
- **Roldàn-Ruiz I, Dendauw J, Van Bockstaele E, Depicker A, De Loose M (2000)** AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular breeding* 6, 125–134. <https://doi.org/10.1023/A:1009680614564>
- **Romet L (2004)** Lutte automnale contre le puceron cendré du pommier. *ITAB, Alter Agri* n°67, p. 14-21.
- **Rosa JD, Weber GG, Cardoso R, Górski F, Da-Silva PR (2017)** Variability and population genetic structure in *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC, a species with high value in folk medicine in South America. *PLOS ONE* 12:e0183533 DOI 10.1371/journal.pone.0183533.
- **Rousset F (2008)** genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8(1), 103-106.
- **Ruck JA (1963)** Chemical methods for analysis of fruit and vegetable products. *Chemical methods for analysis of fruit and vegetable products*.
- **Rychlik WJSW, Spencer WJ & Rhoads RE (1990)** Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research*, 18(21), 6409-6412.

- **Sagnard F, Barnaud A, Deu M, Barro C, Luce C et al (2008)** Analyse multiéchelle de la diversité génétique des sorghos : compréhension des processus évolutifs pour la conservation in situ. *Cahiers Agricultures* vol. 17, n°2: 114-121.
- **Salvi S, Micheletti D, Magnago P, Fontanari M, Viola R, Pindo M, Velasco R (2014)** One-step reconstruction of multi-generation pedigree networks in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and the parentage of Golden Delicious. *Mol Breed.* 34:511–24. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0054-y>.
- **Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989)** *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- **Sassa H, Mase N, Hirano H et Ikehashi H (1994)** Identification of self-incompatibility-related glycoproteins in styles of apple (*Malus x domestica*). *Theoretical and Applied Genetics* 89:201-205.
- **Sauvion N (1995)** Effets et modes d'action de deux lectines à mannose sur le puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). Potentiel d'utilisation des lectines végétales dans une stratégie de création de plantes transgéniques résistantes aux pucerons. Rapport de Thèse, L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- **Sebek G (2013)** Autochthonous cultivars of apple from the area of the upper Polimlje. *Agriculture & Forestry*, 59: 67-74.
- **Sellika, IE & Faysse N (2015)** Outlook for production and marketing of apples in Morocco by 2025. *Alternatives Rurales*, 3, 102-116.
- **Serrote CML., Reiniger L.RS, Silva KB, Dos Santos RSM & Stefanel CM (2020)** Determining the Polymorphism Information Content of a molecular marker. *Gene*, 726, 144175.
- **Shannon CE (1948)** A mathematical theory of communication. *The Bell system technical journal*, 27(3), 379-423.
- **Shulaev V, Korban SS, Sosinski B, Abbott AG, Aldwinckle HS et al (2008)** Multiple models for Rosaceae genomics. *Plant physiology*, 147(3), 985-1003.
- **Siekierzynska A, Piasecka-Kwiatkowska D, Myszka A et al (2021)** Apple allergy: Causes and factors influencing fruits allergenic properties—Review. *Clinical and Translational Allergy*, 11(4), e12032.
- **Silfverberg-Dilworth E, Besse S, Paris R et al (2005)** Identification of functional apple scab resistance gene promoters. *Theoretical and applied genetics*, 110(6), 1119-1126.
- **Silfverberg-Dilworth E, Matasci CL., Van de Weg WE et al (2006)** Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics & Genomes*, 2(4), 202-224.
- **Simon S, Bouvier JC, Debras JF, Sauphanor B (2010)** Biodiversity and pest management on orchard systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30, p. 139-152.
- **Slatkin M (1985)** Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39(1), 53-65.
- **Smolik M & Krzysztozek O (2010)** Evaluation of genetic variability in chosen apple (*Malus × domestica* Borkh.) cultivars by ISSR-PCR analysis. *Russ J Genet* 46, 819–827.
- **Smolik M, Rzepka-Plevneš D, Stankiewicz I, Chelpiński P, Kowalczyk K (2004)** Analysis of genetic similarity of apple tree cultivars. *Folia Horticulturae* 16, 87–94.
- **Snowdon RJ & Friedt W (2004)** Molecular markers in Brassica oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding*, 123(1), 1-8.
- **Song B, Tang G, Sang X, Zhang J, Yao Y, Wiggins N (2013)** Intercropping with Aromatic Plants Hindered the Occurrence of *Aphis citricola* in an Apple Orchard System by Shifting Predator-Prey Abundances. *Biocontrol Science and Technology*.23:381-395.
- **Station De Recherche Agroscope Changins-Wädenswil Acw (2006)** la confédération suisse.
- **Stewart-Jones A, Dewhurst SY, Durrant L. et al (2007)** Structure, ratios and patterns of release in the sex pheromone of an aphid, *Dysaphis plantaginea*. *The Journal of Experimental Biology*. 210, 4335–4344.

- **Stewart-Jones A, Pope TW, Fitzgerald JD, Poppy GM (2008)** *The effect of ant attendance on the success of rosy apple aphid populations, natural enemy abundance and apple damage in orchards.* *Agricultural and Forest Entomology* 10, 37–43.
- **Szczecińska M, Sramko G, Wolosz K, Sawicki J (2016)** *Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species Pulsatilla patens (L.) Mill in East Central Europe.* *PLoS One.* 11(3):e0151730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151730>.
- **Szewc-McFadden AK, Kresovich S, Bliet SM, Mitchell SE & McFerson JR (1996)** *Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated Brassica species.* *Theoretical and Applied Genetics*, 93(4), 534-538.
- **Tang J, Gao L., Cao Y & Jia J (2006)** *Homologous analysis of SSR-ESTs and transferability of wheat SSR-EST markers across barley, rice and maize.* *Euphytica*, 151(1), 87-93.
- **Tatikonda L, Wani SP, Kannan S, Beerelli N et al (2009)** *AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of Jatropha curcas L., a biofuel plant.* *Plant Science* 176:505513 DOI 10.1016/j.plantsci.2009.01.006.
- **Timm AE, Pringle KL & Warnich L (2005)** *Genetic diversity of woolly apple aphid Eriosoma lanigerum (Hemiptera: Aphididae) populations in the Western Cape, South Africa.* *Bulletin of Entomological Research*, 95(3), 187-191.
- **Towill L.E, Forsline P.L., Walters C, Waddell JW & Laufmann J (2004)** *Cryopreservation of Malus germplasm using a winter vegetative bud method: results from 1915 accessions.* *CryoLetters*, 25(5), 323-334.
- **Trillot M, Masseron A, Mathieu V, Bergougnaux F, Hutin C, Yves L (2002)** *Le pommier.* Centre technique interprofessionnelle des fruits et légumes. (Ctifl).Edition Lavoisier. Paris. 287p
- **Tukey HB (1978)** *Dwarfed fruit trees.* Comstock Publishing Associates.
- **Uilltobe (2020)** Available online: <https://uilltobe.ru/en/apple-vinegar-beneficial-features/> (accessed on 1 July 2020).
- **UPOV (1974)** ICE I. International union for the protection of new varieties of plants.
- **UPOV (2005)** International Union for Protection of New Varieties of Plants. Draft Guidelines for the Conduct of Test for Distinctness, Homogeneity and Stability (APPLE).
- **Urrestarazu J, Muranty H, Denancé C, Leforestier D et al (2017)** *Genome-Wide Association Mapping of Flowering and Ripening Periods in Apple.* *Front Plant Sci*; 8:1923. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01923> PMID:29176988
- **USDA-ARS (2018)** *Germplasm Resources Information Network - (GRIN) [base de données en ligne].* Disponible en ligne : http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax_search.pl [2018].
- **Uzun A, Ozongun S, Gulsen O, Yilmaz KU, Kaymak S, Ercisli S (2016)** *Determination of genetic relatedness among Turkish apple germplasm based on ISSR markers.* *Journal of Applied Botany and Food Quality* 89, 82–88. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2016.089.010>
- **Vaidya E, Kaur R & Bhardwaj SV (2012)** *Data mining of ESTs to develop dbEST-SSRs for use in a polymorphism study of cauliflower (Brassica oleracea var. botrytis).* *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 87(1), 57-63.
- **Valarcher J (2009)** *Quatrième rapport national de la France à la Convention sur la Diversité Biologique.* Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement durable et de la Mer, Secrétariat général – Direction des Affaires Européennes et Internationales
- **Van de Wouw M, Kik C, Van Hintum T, Van treuren R, Visser B (2009)** *Genetic erosion in crops: concept, research, results and challenges.* *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 8: 1-15.
- **Van Treuren R, Kemp H, Ernsting G, Jongejans B, Houtman H & Visser L. (2010)** *Microsatellite genotyping of apple (Malus× domestica Borkh.) genetic resources in the Netherlands: application in collection management and variety identification.* *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57(6), 853-865.

- **Vanblaere T, Flachowsky H, Gessler C & Brogini GA (2014)** Molecular characterization of cisgenic lines of apple 'Gala' carrying the *Rvi6* scab resistance gene. *Plant biotechnology journal*, 12(1), 2-9.
- **Vanblaere T, Szankowski I, Schaart J, Schouten H et al (2011)** The development of a cisgenic apple plant. *Journal of biotechnology*, 154(4), 304-311.
- **Varn MW (1987)** The effects of aphids on the growth of young apple trees. PhD Dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- **Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A et al (2010)** The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature genetics*, 42(10), 833-839.
- **Verdu C (2013)** Cartographie génétique des composés phénoliques de la pomme (Doctoral dissertation, Université d'Angers).
- **Voudouris CC, Franck P, Olivares J, Sauphanor B et al (2012)** Comparing the genetic structure of codling moth *Cydia pomonella* (L.) from Greece and France: Long distance gene-flow in a sedentary pest species. *Bull. Entomol. Res.*, 102, 185–198.
- **Walling LL. (2008)** Avoiding effective defenses: strategies employed by phloem-feeding insects. *Plant physiology*, 146(3), 859-866.
- **Wambugu PW, Ndjiondjop MN & Henry RJ (2018)** Role of genomics in promoting the utilization of plant genetic resources in genebanks. *Briefings in functional genomics*, 17(3), 198-206.
- **Warneys R, Gaucher M, Robert P, Aligon S, Anton S et al (2018)** Acibenzolar-S-Methyl Reprograms Apple Transcriptome Toward Resistance to Rosy Apple Aphid. *Frontiers in plant science*, 9, 1795. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01795>
- **Watterson GA (1978)** The homozygosity test of neutrality. *Genetics*, 88(2), 405-417.
- **Watts S, Migicovsky Z, and McClure KA (2021)** Quantifying apple diversity: A phenomic characterization of Canada's Apple Biodiversity Collection. *Plants, People, Planet* ppp3. doi: <https://doi.org/10.1002/ppp3.10211>
- **Way RD, Aldwinckle HS, Lamb RC, Rejman A, Sansavini S et al (1990)** Apples (*Malus*). In: *Genetic resources of temperate fruits and nut crops I*. Netherlands, ISHS. 488 p.
- **Webster AD & Wertheim SJ (2003)** Apple rootstocks. Pages 91-124 in D. C. Ferree, I. J. Warrington, dir. *Apples: Botany, production and uses*. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Royaume-Uni.
- **Webster AD (2005)** The origin, distribution and genetic diversity of temperate tree fruits. Pages 1-11 in Webster, A. D., Wertheim, S. J., & Tromp, J. (Eds.). (2005). *Fundamentals of temperate zone tree fruit production*. Backhuys.
- **Webster AD, Wertheim SJ & Tromp J (2005)** *Fundamentals of temperate zone tree fruit production*. Backhuys.
- **Weigl K, Wenzel S, Flachowsky H, Peil A & Hanke MV (2015)** Integration of bp MADS 4 on various linkage groups improves the utilization of the rapid cycle breeding system in apple. *Plant Biotechnology Journal*, 13(2), 246-258.
- **Wellings PW, Ward SA, Dixon AFG & Rabbinge R (1989)** Crop loss assessment. In: Minks, A.K., Harrewijn, P., (eds.). *World crop pests – Aphids vol. 2C*. Elsevier, Amsterdam/New York, pp. 49–64
- **Westwood MN (1993)** *Temperate-zone pomology: Physiology and culture*. 3e édition. Timber Press, Portland.
- **Wilkaniec B & Trzcinski P (1997)** Effect of rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* (Pass.) (Homoptera; Aphididae), feeding on fruits of the *Primula* variety. *Progress in Plant Protection* 37, 36–39
- **Wilkaniec B (1993)** The influence of feeding of the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* (Pass.) (Homoptera: Aphididae) on the growth of apple fruits. *Roczniki Nauk Rolniczych. Seria E, Ochrona Roślin*, 23, 75–78.

- **Willsmore KL., Eckermann P, Varshney RK et (2006)** New eSSR and gSSR markers added to Australian barley maps. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57(9), 953-959.
- **Wright S (1978)** *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4, Variability within and among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago.
- **Wu W, Chen F, Yeh K, Chen J (2019)** ISSR analysis of genetic diversity and structure of plum varieties cultivated in southern China. *Biology* 8, 2. <https://doi.org/10.3390/biology8010002>
- **Wyss E & Daniel C (2004)** Effects of autumn kaolin and pyrethrin treatments on the spring population of *Dysaphis plantaginea* in apple orchards. *Journal of Applied Entomology* 128: 147–149.
- **Wyss E (1995)** The effects of weed strips on aphids and aphidophagous predators in an apple orchard. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 75, 43–49.
- **Wyss E, Villiger M, Hemptinne JL, Muller-Scharer H (1999b)** Effects of augmentative releases of eggs and larvae of the ladybird beetle, *Adalia bipunctata*, on the abundance of the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea*, in organic apple orchards. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 90: 167–173.
- **Wyss E, Villiger M, Müller-Schärer H (1999a)** The potential of three native insect predators to control the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea*. *BioControl* 44, 171–182.
- **Xu K (2013)** An overview of Arctic apples: Basic facts and characteristics. *NY Fruit Q*, 21, 8-10.
- **Yao I, Shibao H & Akimoto S (2000)** Costs and benefits of ant attendance to the drepanosiphid aphid *Tuberculatus quercicola*. *Oikos* 89: 3–10.
- **Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX (1997)** POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada
- **Yoder K, Yuan R, Combs L., Byers R, McFerson J & Schmidt T (2009)** Effects of temperature and the combination of liquid lime sulfur and fish oil on pollen germination, pollen tube growth, and fruit set in apples. *HortScience*, 44(5), 1277-1283.
- **Zguigal Y & Chahbar A (1993)** Carte des heures de froid au Maroc. *Al Awamia*, 80, 161-171.
- **Zhang L., Hu J, Han X, Li J, Gao Y et al (2019)** A high-quality apple genome assembly reveals the association of a retrotransposon and red fruit colour. *Nature communications*, 10(1), 1-13.
- **Zhang Q, Li J, Zhao Y, Korban SS, Han Y (2012)** Evaluation of Genetic Diversity in Chinese Wild Apple Species Along with Apple Cultivars Using SSR Markers. *Plant Mol Biol Rep*. 30(3): 539–546. <https://doi.org/10.1007/s11105-011-0366-6>.
- **Zietkiewicz E, Rafalski A & Labuda D (1994)** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.