

Caractérisation des variétés polyclonales marocaines de figuiers, *Ficus carica* L.

Ahmed OUKABLI^{a*}, Bouchaib KHADARI^b

^a Inra, Unité de recherche
Amélioration des plantes et
conservation des ressources
phyto-génétiques, CRRRA,
BP 578, Meknès, Maroc
oukabli2001@yahoo.fr

^b Inra, UMR Biologie du
développement des plantes
pérennes cultivées (BEPC),
2 place Viala, 34060
Montpellier Cedex 1, France

Characterization of polyclonal Moroccan varieties of fig trees, *Ficus carica* L.

Abstract — Introduction. The phenotypical variations and the multiplicity of names for the Moroccan fig tree varieties make the varietal identification of the accessions of *Ficus carica* L. confused. **Materials and methods.** Fifteen accessions present in a collection in the area of Meknes and corresponding to five different denominations were characterized by combining two approaches: pomological and molecular (SSR and ISSR) characterizations. **Results.** The results obtained made it possible to identify distinct accessions and redundancies within each of the five *F. carica* denominations. **Conclusion.** The complementarity of the two approaches tested appears useful for the establishment of a reference collection.

Morocco / *Ficus carica* / identification / methods / pomology / biological markers (molecular) / microsatellites

Caractérisation des variétés polyclonales marocaines de figuiers, *Ficus carica* L.

Résumé — Introduction. Les variations phénotypiques et la multiplicité des dénominations des variétés marocaines de figuiers rendent confuse l'identification variétale des accessions de *Ficus carica* L. **Matériels et méthodes.** Quinze accessions présentes en collection dans la région de Meknès correspondant à cinq dénominations différentes ont été caractérisées en combinant deux approches : pomologique et moléculaire (SSR et ISSR). **Résultats.** Les résultats obtenus ont permis d'identifier des accessions distinctes et des redondances au sein de chacune des cinq dénominations. **Conclusion.** La complémentarité des deux approches se révèle utile pour l'établissement d'une collection de référence.

Maroc / *Ficus carica* / identification / méthode / pomologie / marqueur biologique (moléculaire) / microsatellite

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 12 février 2003
Accepté le 7 octobre 2004

Fruits, 2005, vol. 60, p. 47–54
© 2005 Cirad/EDP Sciences
All rights reserved
DOI: 10.1051/fruits:2005012

RESUMEN ESPAÑOL, p. 54

Tableau I.

Clones de figuiers étudiés par approches pomologique et moléculaire (collection du domaine expérimental de l'Inra d'Aïn Taoujdate, Inra, Maroc).

Dénomination	N° d'accession
Bioudi	1-2222
Bioudi	53-2878
Bioudi	61-2255
Bioudi	64-2218
Bioudi	66-2258
Chaâri	95-2881
Chaâri	96-2587
Hamra	22-2225
Hamra	35-2588
Hamra	86-2252
Ournaksi	3-2280
Ournaksi	3-2282
Ournaksi	6-2214
Rhoudane	24-2223
Rhoudane	25-2227

1. Introduction

Au Maroc, la culture du figuier est traditionnelle ; le matériel végétal exploité est hétérogène et constitué de variétés ayant des dénominations locales attribuées selon les zones de culture ou les critères du fruit (couleur, forme, etc.). Plusieurs variétés sont aisément reconnaissables par leurs caractéristiques pomologiques, alors que, pour d'autres, la distinction reste confuse.

Plusieurs clones de figuier portent la même dénomination malgré des différences pomologiques évidentes. Des cas d'homonymies ont été décrits sur la base d'une caractérisation morphologique correspondant à des clones de différentes origines [1]. Ce type de confusion pourrait être dû à l'effet du milieu sur l'expression phénotypique de certains caractères [2]. Les limites de l'approche morphologique peuvent être contournées par l'utilisation des marqueurs moléculaires [3–4]. Cette dernière approche consiste à établir un profil moléculaire correspondant à l'analyse de plusieurs loci (équivalant aux caractères selon l'approche morphologique). Les marqueurs de type RAPD (Ran-

dom Amplified Polymorphism DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) sont parmi les plus adaptés à cette caractérisation [4]. En revanche, les marqueurs comme les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeats), etc. sont codominants et la reproductibilité des résultats est aisément vérifiée car ils sont spécifiques de locus. Néanmoins, ils présentent l'inconvénient d'être moins informatifs que les marqueurs de type « empreintes génétiques » [5]. L'utilisation conjointe de marqueurs de type « empreintes génétiques » et de marqueurs spécifiques de locus permet, en remédiant aux inconvénients des uns et des autres, d'avoir une identification variétale efficace. Par ailleurs, l'utilisation conjointe de l'approche pomologique et de l'approche moléculaire permet d'avoir une caractérisation complète pour discriminer différentes accessions portant la même dénomination au sein d'une collection.

Nos travaux ont permis d'analyser, par approches pomologique et moléculaire, des accessions ayant une même dénomination. Notre objectif a été de mettre en évidence les cas de synonymie et les cas d'homonymie afin de disposer d'une base de génotypes de référence pour chacun des clones de figuier étudiés.

2. Matériel et méthodes

Quinze clones, issus de prospection et mis en collection au domaine expérimental de l'Inra d'Aïn Taoujdate (Maroc) riche d'une centaine d'accessions, ont fait l'objet d'une caractérisation morphologique et moléculaire (*tableau I*). Chaque génotype présent dans cette collection est constitué de trois arbres issus de bouturage et plantés en 1995 à 5 m × 3 m d'écartement sur un sol argilo-limoneux. Le verger est conduit selon un itinéraire technique standard comprenant une irrigation (1800 m³·ha⁻¹·an⁻¹), une fertilisation (50–30–60 unités·ha⁻¹ de N–P–K) et un ou deux traitements phytosanitaires. Pour assurer la caprification de toute la collection, deux rangées de douze caprifiguiers, sélectionnés pour leur richesse en « profichi »

(figues du caprifigier réceptives au printemps et produisant du pollen et des blastophages au début de l'été) et en « mames » (figues du caprifigier réceptives en été et produisant des blastophages au printemps suivant) ont été plantés, en ligne, à raison de trois arbres par type.

2.1. Caractérisation morphologique

Des descripteurs morphologiques, issus de la liste établie par le programme européen GEN RES 029 [6], ont été utilisés pour caractériser le matériel végétal local [7, 8] et les variétés introduites [9].

La caractérisation pomologique a été réalisée sur 30 fruits prélevés au hasard en pleine maturité sur chacun des arbres étudiés. Les observations effectuées pendant deux années (2001 et 2002) ont porté sur la période de maturité des figues d'automne, le rendement, le poids du fruit, la taille de l'ostiole, la couleur de fond de l'épiderme et la présence de fissures sur l'épiderme. À l'exception du poids du fruit et de la taille de l'ostiole, les caractères ont été évalués en utilisant une note qualitative de 1 à 6, en fonction de l'importance du caractère.

2.2. Caractérisation moléculaire

2.2.1. Extraction d'ADN

L'ADN total a été extrait à partir de 100 mg de matériel frais (feuilles) selon le protocole de Dneasy Plant Mini Kit (Quiagen) modifié par 1 % de polyvinylpyrrolidone (PVP 40000) ajouté au tampon AP1 [5, 14].

2.2.2. Analyses moléculaires

Pour effectuer les analyses ISSR, huit amorces préalablement sélectionnées (IMA 5, IMA 8, IMA 9 et IMA 12, IMA 303, IMA 834, UBC 818 et UBC 841) [5,10] ont été utilisées. La réaction d'amplification par PCR a été réalisée dans un volume de 25 μ L : 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 % Triton \times 100, 0,02 % gelatin, 0,2 mM de chaque dNTP, 10 pmol d'amorce, 2 unités de Taq DNA polymérase (Appligene-Oncor) et environ 50 ng d'ADN. L'amplification a été réalisée par un cycle de 1 min

à 94 °C, puis 35 cycles (30 s à 94 °C, 1 min à 50–56 °C, 1 min à 72 °C) et, enfin, un cycle final d'élongation de 8 min à 72 °C. Les produits d'amplification ont été séparés à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % selon une migration de 120 volts. Le gel d'électrophorèse a été révélé par bromide d'éthidium et photographié sur un support Polaroid 667, sous lumière ultra violette.

Pour l'analyse des microsattellites, six loci SSR parmi ceux développés par Khadari *et al.* [5] ont été utilisés. Les analyses ont été réalisées selon le protocole décrit par Khadari *et al.* [5].

2.3. Analyse des données

Les bandes polymorphes ont été codées par 1 pour la présence de la bande et 0 pour son absence. Elles ont été identifiées par le nom de l'amorce et la taille de la bande correspondante. L'analyse d'un individu par l'ensemble des marqueurs SSR et ISSR a donné un profil multiloci et une matrice binaire rassemblant tous les génotypes a été construite.

Les relations entre les génotypes ont été examinées en calculant, deux à deux, la similarité de Jaccard entre les génotypes et en représentant un dendrogramme selon l'algorithme UPGMA. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du programme (Clustering Calculator Program) développé par John Brzustowski. Le dendrogramme a été construit en utilisant le programme Treeview software, version 6.1 [15].

3. Résultats et discussion

La caractérisation morphologique de chaque clone, basée sur l'analyse de 14 caractères relatifs au fruit, a permis de mettre en évidence des similitudes et des différences entre clones d'une même variété (*tableau II*). La comparaison, deux à deux, des profils moléculaires (*figure 1*) des accessions de même nom a permis aussi de relever des différences entre clones (*figure 2, tableau III*) et de les comparer aux résultats de l'analyse pomologiques.

La variété Bioudi est représentée par cinq accessions dont deux (Bioudi 1-2222 et Bioudi

Tableau II.

Caractères pomologiques des clones de mêmes dénominations présents dans la collection du domaine expérimental Taoujdate (Maroc).

Clones	Type	Couleur de l'épiderme	Forme du fruit	Couleur des bractées	Poids (g)	Taille de l'ostiole (mm)	Pédoncule	Fissures	Couleur interne	Cavité	Quantité de graines	Goût
Bioudi 1-2222	Bifère	Noire	Ronde	Marron	40,8	9,3	Court	Absentes	Ambre	Absente	Abondante	Aromatisé
Bioudi 53-2878	Unifère	Vert jaune	Aplatie	Blanche	37,7	8,8	Court	Légères	Rose	Absente	Abondante	Moyen
Bioudi 61-2255	Unifère	Verte	Ovoïde	Marron	31,7	6,8	Court	Légères	Rose	Absente	Abondante	Moyen
Bioudi 64-2218	Bifère	Noire	Ronde	Marron	40,5	9,0	Court	Absentes	Ambre	Absente	Abondante	Aromatisé
Bioudi 66-2258	Unifère	Verte	Ovoïde	Marron	34,0	3,2	Variable	Absentes	Rose	Absente	Moyenne	Moyen
Chaâri 95-2881	Unifère	Violette	Aplatie	Marron	66,0	13,8	Très court	Légères	Rose	Absente	Abondante	Moyen
Chaâri 96-2587	Unifère	Verte	Aplatie	Blanche	18,0	5,9	Très court	Absentes	Rose foncé	Absente	Moyenne	Sucré
Hamra 22-2225	Bifère	Violette	Ovoïde	Marron	21,3	3,0	Court	Absentes	Rose	Petite	Abondante	Moyen
Hamra 35-2588	Bifère	Violette	Sphérique	Marron	39,0	6,2	Très court	Absentes	Rouge	Absente	Abondante	Moyen
Hamra 86-2252	Unifère	Violette	Sphérique	Marron	68,5	5,4	Très court	Absentes	Rose	Absente	Abondante	Moyen
Ournaksi 3-2280	Bifère	Verte	Pyriforme	Rose	28,5	9,0	Très court	Absentes	Rose	Absente	Abondante	Moyen
Ournaksi 5-2282	Bifère	Noire	Ronde	Marron	40,6	8,5	Court	Absentes	Ambre	Absente	Abondante	Aromatisé
Ournaksi 6-2214	Bifère	Verte	Pyriforme	Rose	29,8	8,1	Très court	Absentes	Rose	Absente	Abondante	Moyen
Rhoudane 24-2223	Bifère	Violette	Ovoïde	Marron	28,0	6,8	Très court	Légères	Rose	Absente	Moyenne	Moyen
Rhoudane 25-2227	Bifère	Violette	Ovoïde	Marron	29,0	6,5	Très court	Légères	Rose	Absente	Moyenne	Moyen

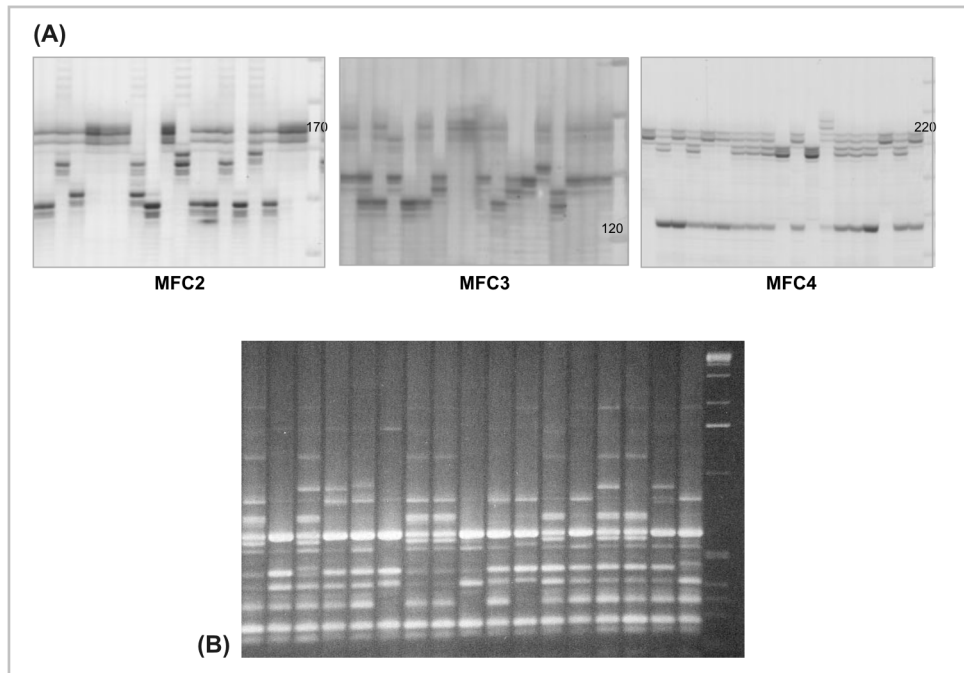


Figure 1. Exemples d'analyses moléculaires d'accessions de figuiers. (A) Profils des microsatellites relatifs aux loci MFC2, MFC3 et MFC4, développés par Khadari *et al.* [14] (B) Gel d'électrophorèse obtenu à la suite d'une analyse à l'aide du marqueur ISSR IMA 12.

64-2218) sont similaires sur le plan pomologique (*tableau II*), notamment par la couleur de l'épiderme et des bractées, le calibre de leurs fruits et le type de fructification (bifère). Les trois autres accessions se différencient par le type de production, la forme et le poids des fruits, ainsi que la couleur des bractées. Elles se caractérisent toutes par des fruits de forme ronde à ovoïde, avec un épiderme vert et un poids moyen de (31 à 38) g. Par ailleurs, ces trois accessions ont une couleur interne rose qui les différencie des deux accessions précédentes. Cette discrimination pomologique entre les accessions Bioudi 1-2222 et Bioudi 64-2218 d'une part et les autres génotypes de la variété Bioudi d'autre part est validée par le nombre élevé de marqueurs moléculaires différents (*tableau III*, *figure 2*).

Les clones Chaâri sont distincts par la couleur de l'épiderme qui est violette chez Chaâri 95-2881 et verte chez Chaâri 96-2587, avec des bractées respectivement marrons et blanches. Le poids des fruits est élevé pour le premier clone qui a un ostiole bien ouvert, mais faible pour le second. Sur le plan moléculaire, ces clones ont été différenciés par 14 marqueurs (*tableau III*).

La variété Hamra est constituée de trois accessions qui produisent toutes des fruits de couleur violette. L'accession Hamra 86-2252 est de type unifère et donne un fruit de gros calibre (68,5 g) qui la distingue des deux autres accessions Hamra. Hamra 22-2225 et Hamra 35-2588 sont de type bifère, mais leurs fruits présentent une forme et un calibre différents (*tableau II*). Les autres caractères étant relativement proches, cette variété peut être considérée comme polyclonale.

La variété Ournaksi comprend trois accessions. Ournaksi 3-2280 et Ournaksi 6-2214 ont les mêmes caractéristiques pomologiques et constitueraient donc un seul génotype (*tableau II*). À l'inverse, l'accession Ournaksi 5-2282 est différente des deux autres par la couleur noire de l'épiderme, la forme ronde du fruit, des bractées marron, un poids important (40,6 g) et une couleur ambre de la chaire. Compte tenu des différences pomologiques observées, la variété Ournaksi serait donc constituée en fait par deux génotypes : l'un correspondant à Ournaksi 5-2282 d'une part et l'autre à Ournaksi 3-2280 et Ournaksi 6-2214 d'autre part. Cette distinction est confirmée par les résultats

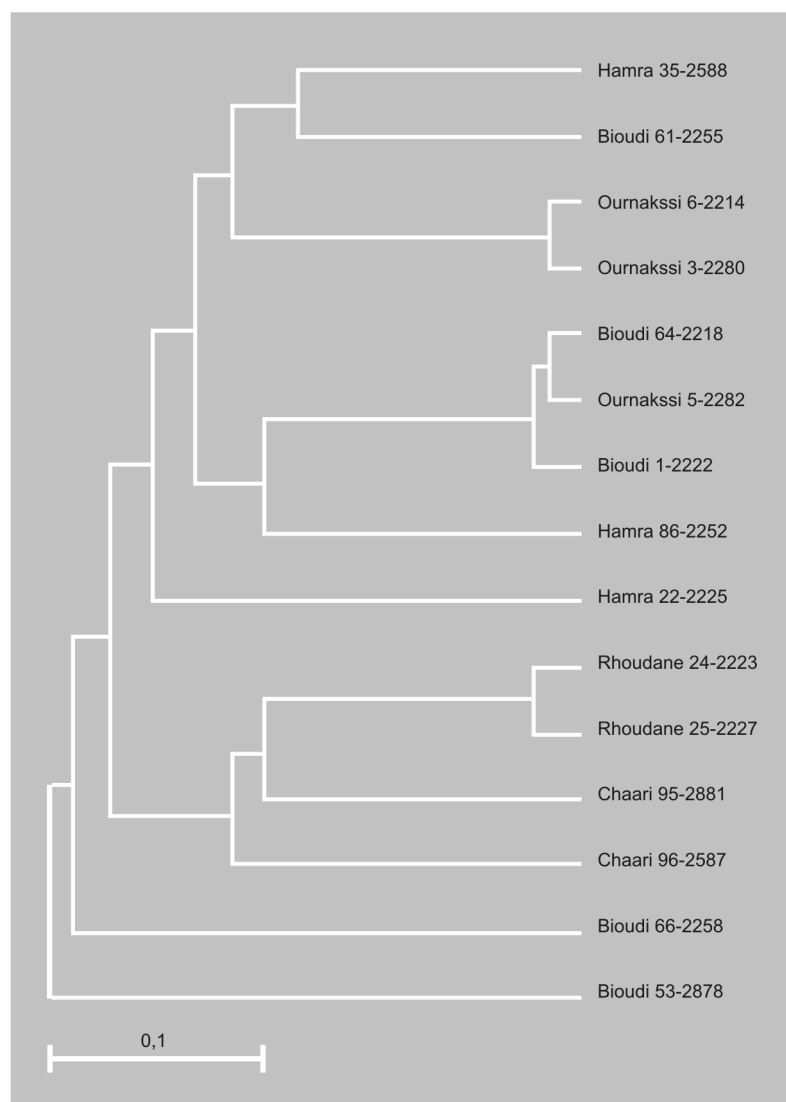


Figure 2. Classification de quinze accessions de figiers basée sur une matrice de similarité de Jaccard et l'algorithme UPGMA (collection du domaine expérimental de l'Inra d'Aïn Taoujdate au Maroc).

moléculaires mettant en évidence la similitude entre les accessions Ournakssi 3-2280 et Ournakssi 6-2214. L'accession 5-2282 pourrait donc correspondre à une erreur d'étiquetage.

Les clones Rhoudane sont représentés par deux accessions différentes qui ont les mêmes caractéristiques morphologiques (*tableau II*). Cette similarité est confirmée au niveau des profils moléculaires qui ne diffèrent que par deux marqueurs ISSR (*tableau III*). Ces accessions sont donc considérées proches génétiquement (*figure 2*).

La caractérisation pomologique effectuée sur quinze accessions de figiers à partir de l'observation d'un ensemble de caractères distinctifs (*tableau II*) a permis de faire une discrimination entre des génotypes portant la même dénomination et des accessions proches génétiquement (Bioudi 1-222 et Bioudi 64-2218, Ournakssi 3-2280 et Ournakssi 6-2214, Hamra 22-2225 Hamra 35-2588). Cette similarité a été confirmée par les résultats des analyses moléculaires (*figure 2*). Les accessions qui se sont révélées différentes peuvent être considérées comme des génotypes à part. Les deux approches pomologique et moléculaire sont donc complémentaires et l'établissement futur d'une collection de référence devrait prendre en considération les cas de redondances révélés par cette étude.

Le choix d'un génotype de référence au sein des variétés polyclonales mises en évidence n'est pas aisé du fait de la diversité génétique du matériel végétal. Mais, pour une exploitation agronomique, il pourrait être suggéré de désigner comme génotype de référence l'accession ayant les caractéristiques pomologiques les plus appréciées (calibre, couleur, qualité gustative, etc.). Sur cette base, nous suggérons de considérer les génotypes Bioudi 61-2255, Chaari 96-2587, et Hamra 22-2225 comme référence [7, 8].

Les confusions mises en évidence dans les dénominations variétales considérées peuvent être expliquées par l'action de plusieurs facteurs. Tout d'abord, l'effet du milieu sur les caractéristiques pomologiques des fruits est particulièrement important en conditions de températures élevées et de forte insolation [11] comme c'est le cas au Maroc. Par ailleurs, le facteur humain, notamment son niveau modeste de technicité pendant l'échange et la reproduction du matériel végétal, a pu être aussi à l'origine des confusions constatées déjà rapportées par d'autres auteurs en Afrique du Nord [1, 13]. Enfin, les ressemblances morphologiques et les interconnexions génétiques connues chez *Ficus carica* [12] ont pu influencer la sélection exercée sur les individus issus de semis, distingués par le terme local de « Nabout ».

Ces problèmes d'hétérogénéité variétale pourraient être contournés par l'établissement de collections de références où les

génotypes seraient décrits par les deux approches morphologique et moléculaire testées dans les travaux présentés. Le suivi de telles collections permettra de quantifier la variation phénotypique de cette espèce particulièrement sensible aux variations climatiques.

Références

- [1] Condit I.J., Fig varieties: a monograph, Hilgardia (Calif. Agric. Exp. Stn.) 11 (1955) 323–538.
- [2] Vidaud J., Le figuier, monographie, CTIFL, Paris, France, 1997, 264 p.
- [3] Khadari B., Lashermes P., Kjellberg F., RAPD finger-printing for identification and genetic characterization of fig (*Ficus carica* L.) genotypes, J. Genet. Breed. 49 (1995) 77–86.
- [4] Khadari B., Approche moléculaire de l'identification chez le figuier : bases pour la conservation et la certification 2002, Inra, Journée figuier, Meknès, Maroc, 2002.
- [5] Khadari B., Hochu I., Santoni S., Oukabli A., Ater M., Roger J.P., Kjellberg F., Which molecular markers are best suited to identify fig cultivars: a comparison of RAPD, ISSR and microsatellite markers, Acta Hortic. 605 (2003) 69–75.
- [6] Roger J.P., Identification variétale d'une espèce méconnue : le figuier, Rapp. interne, Conserv. Bot. Ntl., Pocquerolles, France, 2000.
- [7] Oukabli A., Mamouni A., Laghezali M., Ater M., Khadari B., Roger J.P., Kjellberg F., Genetical variability in Moroccan fig (*Ficus carica* L.) based on morphological and pomological data, Acta Hortic. 605 (2003) 311–318.
- [8] Oukabli A., Diversité génétique et choix de génotypes performants pour la production de figues sèches et fraîches, Inra, Journée figuier, Meknès, Maroc, 2002.
- [9] Oukabli A., Laghezali M., Mamouni A., Caractérisation morphologique et pomologique de 30 variétés de figuier introduites, Al-Awamia (sous presse).
- [10] Khadari B., Oukabli A., Ater M., Mamouni A., Roger J.P., Kjellberg F., Molecular characterization of Moroccan fig germplasm using Intersimple Sequence Repeat and Simple Sequence Repeat markers to establish a reference collection, HortScience (2004) (40) 29–32.
- [11] Botti C., Franck N., Prat L., Ionnidis D., Morales B., The effect of climatic conditions on fresh fig fruit yield, quality and type of crop, Acta Hortic. 605 (2003) 37–42.
- [12] Zohary D., Hops M., Domestication of plant in the Old World, 3rd ed., Clarendon Press, Oxford, UK, 2000.
- [13] Valdeyron G., Crossa-Raunaud P., Les fruits de Tunisie, Ann. Serv. Bot. Agron. (Tunisie) 23 (1950) 1–124.
- [14] Khadari B., Hochu I., Santoni S., Kjellberg F., Identification and characterisation of microsatellite loci in the common fig (*Ficus carica* L.) and representative species of the genus *Ficus*, Mol. Ecol. Notes 1 (2001) 191–193.
- [15] Page R.D.M., Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers, Comput. Appl. Biosci. 12 (1996) 357–358.

Tableau III.

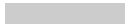
Nombres de marqueurs moléculaires SSR (Simple Sequence Repeats) et ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) différents trouvés entre les accessions de différentes dénominations présentes dans la collection de figuiers du domaine expérimental de l'Inra d'Ain Taoujdate (Maroc).

Comparaison		Nombre de marqueurs	
Accession 1	Accession 2	SSR	ISSR
Bioudi (53-2878)	Bioudi (66-2258)	12	13
Bioudi (53-2878)	Bioudi (1-2222)	6	16
Bioudi (61-2255)	Bioudi (53-2878)	10	14
Bioudi (61-2255)	Bioudi (66-2258)	9	14
Bioudi (61-2255)	Bioudi (1-2222)	7	10
Bioudi (64-2218)	Bioudi (61-2255)	7	12
Bioudi (64-2218)	Bioudi (53-2878)	6	16
Bioudi (64-2218)	Bioudi (66-2258)	10	13
Bioudi (64-2218)	Bioudi (1-2222)	0	2
Bioudi (66-2258)	Bioudi (1-2222)	10	13
Chaâri (95-2881)	Chaâri (96-2587)	5	9
Hamra (35-2588)	Hamra (22-2225)	5	7
Hamra (35-2588)	Hamra (86-2252)	6	8
Hamra (22-2225)	Hamra (86-2252)	10	11
Ournakssi (5-2282)	Ournakssi (6-2214)	8	11
Ournakssi (5-2282)	Ournakssi (3-2280)	8	10
Ournakssi (6-2214)	Ournakssi (3-2280)	0	1
Rhoudane (24-2223)	Rhoudane (25-2227)	0	2

Caracterización de variedades policlonales marroquíes de higueras, *Ficus carica* L.

Resumen — Introducción. Las variaciones fenotípicas y la abundancia de denominaciones de las variedades marroquíes de higueras complican la definición varietal de las accesiones de *Ficus carica* L. **Material y métodos.** Quince accesiones, presentes en colección en la región de Mequinez y que correspondían a cinco denominaciones diferentes, se caracterizaron combinando dos técnicas: pomológica y molecular (SSR y ISSR). **Resultados.** Los resultados obtenidos permitieron identificar accesiones distintas y redundancias en cada una de las cinco denominaciones. **Conclusión.** La complementariedad de ambas técnicas se revela útil para el establecimiento de una colección de referencia.

Marruecos / *Ficus carica* / identificación / métodos / pomología / marcadores biológicos (molecular) / microsátélites



To access this journal online:
www.edpsciences.org
