



UNIVERSITE IBN ZOHR

CENTRE DES ÉTUDES DOCTORALES IBN ZOHR

Formation doctorale

Science de la Vie et Ressources Naturelles

Faculté des Sciences Agadir

THÈSE

Présentée par

Fatima EL AYADI

pour l'obtention de grade de

DOCTEUR de l'Université Ibn Zohr

Spécialité : Ressources Phylogénétiques

Diversité des Ressources Génétiques des Acacia sahariens (*Acacia tortilis* subsp *raddiana*) du Maroc : Approche Cytogénétique, Morpho-métrique et Moléculaire

Soutenu le 20 juin 2013

Devant la commission d'examen composée de :

Prof. EL MODAFAR Cherkaoui	F.S.T Marrakech	Président
Prof. HADDIOUI Abdelmajid	F.S.T Béni Mellal	Rapporteur
Prof. BELMOUDEN Ahmed	F.S. Agadir	Rapporteur
Prof. IBNSOUDA KORAICHI Saad	F.S.T Fès	Rapporteur
Prof. MSANDA Fouad	F.S. Agadir	Co-directeur
Prof. EL MOUSADIK Abdelhamid	F.S. Agadir	Directeur de Thèse

Résumé

La gestion et la préservation des formations steppiques à base d'*Acacias sahariens* (*Acacia tortilis* subsp *raddiana*) nécessitent au préalable une évaluation et une caractérisation de leur variabilité. Cette approche se base sur des études pluridisciplinaires faisant appel à l'analyse de la diversité des caractères adaptatifs (caractères agro-morphologiques) et neutres (marqueurs génétiques). Dans ce contexte, la présente étude vise à explorer à l'aide de marqueurs agro-morphométriques et moléculaires, la variabilité génétique des *Acacias sahariens* du Maroc. Cette étude a été menée en trois parties : *i)* Variabilité de la germination des graines collectées sur six provenances par l'utilisation de trois traitements (mécanique, chimique et thermique) avec un suivi de la cinétique de croissance au stade plantule. *ii)* Variabilité de neuf caractères morpho-métriques liés aux fruits (gousses) par une étude comparative au niveau des descendances (familles de demi-frères), des provenances (Agdz, N'Koub, Tazarine, Mcissi, Tata, Tissint, Foum Zguid, Guelmim, Msied et Assa) et des saisons (deux années d'étude). *iii)* la troisième partie a porté sur la cytogénétique et la diversité génétique révélée par des marqueurs moléculaires (microsatellites SSR) au sein de six provenances.

Les résultats obtenus ont montré que l'inhibition de la germination est d'origine tégumentaire, et par suite sa levée par un traitement physique ou chimique s'est avérée efficace pour augmenter le taux et la vitesse de germination. Le facteur provenance est très hautement significatif. Les plants sous-serre ont adopté la même cinétique de croissance durant le premier mois, ensuite elle a considérablement changé, ainsi on trouve que les provenances Foum Zguid & Mcissi sont les plus performantes au 6^{ème} mois avec 157 & 116 épines et 155 & 140 feuilles respectivement.

L'étude de la variabilité morpho-métrique a montré l'existence de six formes de base, avec une nette dominance de la forme arquée. Durant les deux années d'étude (2009 et 2010), Tazarine, N'koub et Tissint ont présenté les valeurs moyennes les plus élevées pour la majorité des caractères étudiés, indiquant ainsi l'importance du facteur provenance. D'après les analyses de variance et leur décomposition, et selon les caractères biométriques étudiés, on peut opter dans la stratégie de gestion des ressources des *Acacias sahariens* soit pour le facteur arbre (*i.e.*, poids de la gousse, poids de 100 graines) ou provenance (*i.e.*, Longueur de la gousse, nombre de graines par gousse et nombre de graines infestées par gousse).

L'étude cytogénétique moyennant différentes techniques de coloration avec et sans fluorescence a montré l'existence de la polypliodie : octaploïdes ($2n=8x=104$). Dans un second lieu, la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) avec double étiquetage a été utilisée pour tester à un niveau ponctuel quelques anomalies intrachromosomiques,

L'étude de la diversité génétique a été réalisée à l'aide de marqueurs microsatellites développés à partir de séquences codantes chez *Acacia mangium* et *Acacia auriculiformis*. L'analyse bio-informatique a permis de retenir 11 marqueurs dont quatre se sont révélés polymorphes avec 15 allèles au total. Ainsi, 50 haplotypes ont pu être identifiés. La diversité intraprovenance est très importante, elle est de l'ordre de 0,432 sous l'hypothèse de Hardy Weinberg. La variation intraprovenance représente 96 % de la variation totale (test AMOVA). La différenciation génétique interprovenances ($G_{ST}=0,03$) est très faible ce qui reflète le niveau élevé du brassage génique entre les peuplements. De plus, le test de Mantel a montré une divergence entre la distance génétique et la distance géographique ($r = -0,06$) ce qui traduit son indépendance de sa répartition spatiale.

L'ensemble des résultats obtenus apporte des informations et des connaissances de base sur le patrimoine marocain à base des ressources *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana*. Nous suggérons ainsi une investigation plus approfondie en matière de recherche, pour bien mettre en valeur cette espèce qui joue un rôle de barrière contre la désertification et une ressource multiusage pour les nomades sahariens.

Mots clés : *Acacia tortilis* (subsp) *raddiana* – provenance – variabilité – pouvoir germinatif - gousses-cytogénétique - marqueurs microsatellites

Abstract

Management and conservation of the Saharan Acacias (*Acacia tortilis* subsp *raddiana*) steppe formations require a prior multidisciplinary study in order to characterize this species via different approaches based on the diversity of adaptive traits (agro-morphological characters) and neutral genetic markers. The objective is to study the variability and genetic diversity of *Acacia tortilis* subsp *raddiana* using morpho-metric and molecular markers. The objective of this study was three fold: i) variability of seed germination from individuals sampled at six locations collected through the use of three treatments (mechanical, chemical and thermal) to monitor the growth kinetics in the seedling seed stage. ii) Variability of nine morpho-metric traits of the fruit (pods) in a comparative study including progenies (half-sib families), locations (Agdz N'Koub, Tazarine Mcissi, Tata Tissint, Foum Zguid, Guermim Msied and Assa) and seasons (two year study). iii) The third part focused on the cytogenetic and genetic diversity based on molecular microsatellites markers.

The results show that the inhibition of germination has cutaneous origin, and consequently, its lift by physical or chemical treatment increased the rate and speed of germination. The location factor is highly significant. Plants in greenhouses had the same growth kinetics during the first month, and then changed dramatically. We find that individuals from Foum Zguid & Mcissi are the best in the sixth month with thorns 157 & 116 and 155 & 140 sheets respectively. The morpho-metric variability showed the existence of six basic shapes, with a clear dominance of the arcuate shape. During the two years of study (2009 and 2010), Tazarine N'koub Tissint presented the highest mean values for most traits studied, indicating the importance of the location factor. According to analyses of variance and their decomposition, and based on biometric characteristics, the strategy of resource management for Acacias Saharan can either be based on the tree factor (ie, weight of the pod, weight of 100 seeds) or on the location factor (ie, length of the pod, number of seeds per pod and number of infected seeds per pod).

The cytogenetic study with and without fluorescence staining showed the existence of polyploidy: octaploid ($2n = 8x = 104$). For the latter, the fluorescent in situ hybridization (FISH) technique with dual labeling was used to test for intrachromosomal anomalies.

The study of genetic diversity was performed using microsatellite markers developed from coding sequences in *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis*. The bioinformatics analyses allowed us retaining 11 markers of which four were found to be polymorphic with 15 alleles in total. 50 haplotypes were identified. The diversity within provenance was very important, in the order of 0.432 under the assumption of Hardy Weinberg. The intraprovenance variance represents 96 % of the total variance (AMOVA test). Inter-provenance genetic differentiation ($G_{ST} = 0.03$) was very low, which reflects the high level of genetic mixing between provenances. In addition, the Mantel test showed a discrepancy between the genetic distance and geographic distance ($r = -0.06$), which reflects its independence from its spatial distribution.

The overall results provide genetic and evolutionary information on Moroccan *Acacia tortilis* subsp *raddiana*, We suggest further exhaustive investigation since many view this species as a barrier against desertification and a multipurpose resource for Saharan nomads.

Keywords: *Acacia tortilis* (subsp) *raddiana* - from - variability - Cytogenetics - microsatellite markers

Remerciements

Je tiens à formuler tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer notre travail de thèse et pour le temps qu'ils ont consacré pour sa lecture.

Je remercie Mme A. Idrissi directrice du CED Ibn Zohr et M. Y. Ait Ichou Doyen de la Faculté des Sciences Agadir, pour leurs efforts et leur contribution pour le bon déroulement des procédures administratives aboutissant à la soutenance de notre thèse.

Les travaux de cette thèse ont été déroulés au laboratoire de biotechnologie et valorisation des ressources naturelles de la Faculté des Sciences Agadir, sous la direction du Professeur Abdelhamid EL MOUSADIK, et en partie à Montréal sous la direction de Mme Anne BRUNEAU Directrice de l'Institut de Recherche en Biologie Végétale et du Centre sur la Biodiversité, à laquelle je présente mon grand remerciement pour son aide.

Je remercie mon Directeur de thèse Pr A. EL MOUSADIK de m'avoir accompagné pour le bon déroulement de mes activités de recherche. Je le remercie pour le temps et la patience qu'il m'a accordés durant tout mon parcours jusqu'à finalisation de cette thèse.

Je remercie Pr Msanda Fouad pour sa contribution à la réalisation de ce travail qu'il trouve ici mes sincères remerciements et respects.

Je remercie Pr Fouzia Bani Aameur pour ses conseils, son transfert de connaissance et d'expertise, c'était un modèle pour mon avancement dans ma thèse. Qu'elle trouve ici mon profond respect et reconnaissance.

J'exprime mon profond remerciement au Pr NURUL Islam Faridi cytogénéticien du laboratoire des Sciences Forestières de l'Université de Texas, et Pr Anja GEITMANN pour leur collaboration pour la partie cytogénétique de notre thèse.

Je tiens à remercier tous mes professeurs du Laboratoire de Recherche Biotechnologie et Valorisation des Ressources Naturelles, pour leurs suggestions et conseils pendant les discussions de l'avancement des travaux, je cite spécialement Pr Abdellah AIT BEN AOUMAR, Pr Hassan BOUBAKER, Pr Bahia SAADI, Pr BOUDYACH Hassan, Pr FALLAH Mohamed et Pr Mohammed Amine SERGHINI.

Merci à vous tous

Mon grand remerciement à toute ma famille...

Je me mets parterre pour mes chers parents que j'espère bien être à la hauteur de leurs confiances, et à l'espoir qu'ils ont fondé en moi, et qu'aujourd'hui ce travail soit une petite récompense à l'effort qu'ils ont fourni pour que je sois ce que je suis aujourd'hui....

Mes frères et sœurs.... qui m'ont encouragé à réaliser ce rêve partagé....

À mon Marie, qui m'a soutenue, encouragée, et nourri mon travail par ses idées et sa patience

À mon beau-père

Je n'oublierai mes ami(e)s du département de Biologie avec lesquel(le)s j'ai partagé mes meilleurs moments de soucis de joie et de la saveur de la réussite.

SOMMAIRE

RESUME	II
A. INTRODUCTION GENERALE.....	1
PRESENTATION GENERALE DE L'ESPECE ACACIA TORTILIS SUBSP RADDIANA	1
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	1
INTRODUCTION.....	2
I. REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET INTERET DE L'ESPECE	3
I.1. ORIGINE.....	3
I.2. REPARTITION GEOGRAPHIQUE	3
I.3. INTERET ECONOMIQUE ET ECOLOGIQUE D'ACACIA TORTILIS (SUBSP) RADDIANA.....	4
II. SPECIFICITE DU MILIEU SAHARIEN AU MAROC	5
III. POSITION SYSTEMATIQUE.....	6
IV. BOTANIQUE ET DESCRIPTION D'ACACIA TORTILIS SUBSP RADDIANA	10
V. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	12
B. CHAPITRE 1.	15
EFFET PROVENANCES ET DES PRETRAITEMENTS SUR LA VARIABILITE DE LA GERMINATION DES GRAINES D'ACACIA TORTILIS SUBSP RADDIANA	15
INTRODUCTION.....	17
I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	18
I.1. LA DORMANCE.....	18
I.2. INTERACTION D'ACACIA TORTILIS SUBSP RADDIANA AVEC SON ENVIRONNEMENT.....	19
II. MATERIELS ET METHODES.....	21
II.1. TEST DE GERMINATION	21
II.1.1. Collection des graines	21
II.1.2. Prétraitemet et prégermination des graines	21
II.1.3. Mise en germination des graines	22
II.2. TEST DE CROISSANCE DES PLANTULES D'ACACIA TORTILIS SUBSP RADDIANA SOUS SERRE.....	22
II.2.1. Repiquage des graines germées sous serres.....	22
II.2.2. Paramètres de suivi de la croissance des plantules.....	24
II.3. ANALYSE STATISTIQUE	24
II.3.1. Test Levene homogénéisation des variances, et transformation des données	24
II.3.2. Analyse de variance	25
III. RESULTATS ET DISCUSSION	26
III.1. EFFET DES PRETRAITEMENTS SUR LA GERMINATION IN SITU DES GRAINES	26
III.2. UNIFORMITE ET TAUX DE GERMINATION DES PROVENANCES	32
III.3. EFFET DE LA PROVENANCE ET DES TRAITEMENTS SUR LE POURCENTAGE ET LE TAUX DE GERMINATION.....	34
III.4. CROISSANCES DES PLANTULES	37

<i>III.4.1. Le plant de six mois</i>	37
<i>III.4.2. Cinétique de croissance des plants</i>	37
<i>I.1.2. Analyse canonique discriminante ADC</i>	42
II. CONCLUSION	44
C. CHAPITRE 2	46
QUANTIFICATION DE LA VARIATION MORPHO-METRIQUE DES GOUSSES D'ACACIA TORTILIS SUBSP RADDIANA	46
INTRODUCTION.....	48
I. MATERIEL ET METHODES.....	49
I.1. SITES D'ECHANTILLONNAGES.....	49
I.2. TECHNIQUE D'ECHANTILLONNAGE	50
I.3. VARIABILITE MORPHOLOGIQUE.....	52
<i>I.3.1. Biométrie des gousses</i>	52
<i>I.1.1. Forme des gousses</i>	52
<i>I.2. METHODE D'ANALYSE DES DONNEES</i>	53
<i>I.2.1. Structure de la variation phénotypique</i>	53
<i>I.2.1.1. Analyse de variance hiérarchique</i>	54
<i>I.2.1.2. Estimation des paramètres génétiques</i>	55
<i>I.2.1.3. Calcul du gain génétique</i>	56
<i>I.2.1.4. Analyse en composantes principales</i>	56
II. RESULTATS ET DISCUSSION.....	57
II.1. STATISTIQUE DESCRIPTIVE DES VARIABLES QUANTITATIVES	57
II.2. ANALYSE DE CORRELATION ENTRE LES TRAITS MORPHOLOGIQUES	60
II.3. STRUCTURE DE LA VARIATION PHENOTYPIQUE	60
II.4. VARIATION INTER-PROVENANCES	62
II.4.1. VARIATION INTER-GENOTYPE	65
II.5. ESTIMATION DES PARAMETRES DE VARIATION GENETIQUE.....	69
II.6. ANALYSE MULTI-VARIABLE (ACP)	71
II.7. FORME DES GOUSSES.....	75
CONCLUSION	78
D. CHAPITRE 3.....	79
DENOMBREMENT CHROMOSOMIQUE CHEZ ACACIA TORTILIS SUBSP RADDIANA DU MAROC.....	79
INTRODUCTION.....	81
I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	81
I.1. LE CYCLE CELLULAIRE	81
<i>I.1.1. Les phases du cycle cellulaire</i>	82
I.2. POLYPLOÏDIE.....	85
<i>I.2.1. Classes de polyploïdie</i>	88
II. MATERIEL ET METHODES.....	88
II.1. MATERIEL VEGETAL	88

II.2. PREPARATION DES CHROMOSOMES.....	88
II.2.1. Prétraitement.....	88
II.2.2. Fixation	89
II.2.3. Hydrolyse	89
II.2.4. Étalement des chromosomes	90
II.2.5. Technique de coloration des chromosomes	91
III. RESULTATS ET DISCUSSION	94
CONCLUSION	103
E. CHAPITRE 4	105
DEVELOPPEMENT DE MARQUEURS MOLECULAIRES EST-SSR ET APPLICATION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE GENETIQUE D'ACACIA TORTILIS SUBSP RADDIANA.	105
INTRODUCTION	107
I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	108
I.1. LES MARQUEURS MOLECULAIRES	108
I.2. TECHNIQUES DE DETECTION DU POLYMORPHISME DES SEQUENCES	108
I.2.1. Marqueurs biochimiques	108
I.2.2. Marqueurs moléculaires à base d'ADN	109
II. MATERIEL ET METHODES.....	123
II.1. EXTRACTION D'ADN	123
II.2. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE LA PCR	123
II.3. DECOMPOSITION DE LA DIVERSITE GENETIQUE CHEZ ACACIA TORTILIS SUBSP RADDIANA ...	125
II.4. ANALYSE DE VARIANCE MOLECULAIRE	126
II.5. DEVELOPPEMENT DES EST-SSR	126
II.5.1. Le programme SPUTNIK.....	127
II.5.2. Programme Primer 3	127
II.6. CARACTERISTIQUES DE CONCEPTION DES AMORCES PAR PRIMER3 DANS SSRPRIMER	128
II.7. IDENTITE DES GENES DES EST-SSR SELECTIONNES.....	128
I. RESULTATS ET DISCUSSION.....	128
I.1. CONCEPTION DES AMORCES	128
I.2. ANALYSE DES DONNEES MICROSATELLITES	130
I.3. DIVERSITE ET DIFFERENCIATION GENETIQUE DES POPULATIONS D'ACACIA TORTILIS SUBSP RADDIANA	130
I.4. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DE LA STRUCTURE GENETIQUE	132
I.5. DISTRIBUTION HIERARCHIQUE DE LA VARIATION GENETIQUE	132
I.6. VARIATION INTRA-PROVENANCE	132
CONCLUSION	140
CONCLUSION GENERALE	141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	143
ANNEXE 1.....	167
ANNEXE 2.....	193

FIGURES

Fig.1. Classification de la tribu Acacieae (Bouchenak-Khelladi et al. 2010)	9
Fig.2. Aspect général d'un exemplaire d' <i>Acacia tortilis</i> subsp <i>raddiana</i> au sud du Maroc (photos F. Msanda & A. El Mousadik)	10
Fig.3. a : d'une jeune feuille, b : feuilles âgées stipulées, c : l'inflorescence (glomérule), d : fruit (gousse), e : de la gomme d' <i>Acacia tortilis</i> subsp <i>raddiana</i> (photos F. Msanda & A. El Mousadik)	11
Fig.4. Transplantation des graines germées dans les plaques	23
Fig.5. Mesure du diamètre au collet à l'aide d'un pied à coulisse.....	23
Fig.6a. Pourcentage de germination des provenances sous les trois traitements	27
Fig.7b. Comparaison de l'uniformité de germination des six provenances étudiées.....	33
Fig.8. Vitesse de germination pour les trois traitements acide sulfurique, papier verre et eau bouillante pour les six provenances.	35
Fig.9.. Comparaison de la vitesse de croissances chez les six provenances durant six mois pour le nombre d'épines, de feuilles et des nœuds.	38
Fig.10. Comparaison du taux de croissance des plants pendant six mois.....	39
Fig.11. Cumul en nombre de feuilles, épines et des nœuds chez les six provenances. Nb Ep: Nombre des épines, Nb Fl: Nombre des feuilles, Nb: Nombre des nœuds.....	40
Fig.12. Analyse canonique des paramètres de croissance : cumul du nombre de feuilles, des nœuds, des épines et la taille moyenne des épines des six provenances étudiés Foum Zguid, Tata, Tazarine, Guelmim, Mcissi et Msied.	43
Fig.13.Carte des sites d'étude d' <i>Acacia tortilis</i> subsp <i>raddiana</i>	51
Fig.14. Mesure de la longueur et largeur de la gousse.	52
Fig.15. Graine infectée collée sur l'épiderme	52
Fig.16 Graines infectées.....	52
Fig.17. Intensité des effets saison, provenance, génotype et leur interaction sur l'inertie totale.....	59
Fig.18. Taux d'infestation des graines entre les provenances des deux saisons Ag :Agdz, N'kb : N'Koub, Taz : Tazarine, Tata : Tata, Mec : Mcissi, Tsnt : Tisint, Guel : Guelmim, Msd : Msied, Ass : Assa, F.Zg : Foum Zguid.	59
Fig.19. Distribution de la variance phénotypique au sein des dix provenances d' <i>Acacia tortilis</i> subsp <i>raddiana</i> en saison 1 (2008-2009) et b) saison 2 (2009-2010)	63
Fig.20. Répartition de la variance phénotypique inter-génotype (rayure rouge) et intra-génotype (rayure bleu) pour les huit traits morpho-métriques observés au sein des dix provenances étudiées (à gauche saison 1, à droite saison 2).....	66
(Suite Fig.21) Répartition de la variance phénotypique inter-génotype (rayure rouge) et intra-génotype (rayure bleu) pour 8 traits morpho-métriques observés au sein de dix provenances d' <i>Acacia tortilis</i> subsp <i>raddiana</i> à gauche en saison 1, à droite en saison 2.....	67
(Suite Fig.22) Répartition de la variance phénotypique inter-génotype (rayure rouge) et intra-génotype (rayure bleu) pour 8 traits morpho-métriques observés au sein de dix provenances d' <i>Acacia tortilis</i> subsp <i>raddiana</i> à gauche en saison 1, à droite en saison 2.....	68
(Suite Fig.23) Répartition de la variance phénotypique inter-génotype (rayure rouge) et intra-génotype (rayure bleu) pour 8 traits morpho-métriques observés au sein de dix provenances d' <i>Acacia tortilis</i> subsp <i>raddiana</i> à gauche en saison 1, à droite en saison 2.....	69
Figure 24. Cercle de corrélation entre les variables et les facteurs 1 et 2.....	71
Figure 25. Projection sur le plan factoriel 1-2 des provenances sur la base des variables ayant une différence significative.....	72
Figure 26. Cercle de corrélation entre les variables quantitatives mesurées et la forme de la gousse.....	75
Figure 27. Formes des gousses détectées au sein des six provenances.....	76

<i>Fig.28. Coloration Acéto-Orcéine A. cellules en métaphase</i> 2n=52 ±2, <i>B. cellules en prométaphase</i> 2n=64± 2, <i>C. cellules en métaphase</i> 2n=78±2. Gx400	95
<i>Fig.29. Coloration avec Iodide de propidium (A. télophase, B. métaphase).....</i>	96
<i>Fig.30. Coloration au DAPI (échelle représente 5 µm).</i>	99
<i>Fig.31. Distribution des rDNA 5S, 18S et 28 S au niveau des chromosomes d'Acacia tortilis subsp raddiana</i>	100
<i>Fig.32. Les signaux faibles des rDNA sur Acacia tortilis subsp raddiana (les sites rouges 5S, les sites verts 18S-28S) A. 3 sites 5S et 3 sites 18S-28S, B. 5 sites 5S et 4 sites 18S-28S</i>	102
<i>Fig.33. Schéma simplifié du protocole de construction de banque génomique enrichie en SSR.....</i>	121
<i>Fig.34. Séquençage et conception des amores des régions flanquantes des SSR</i>	122
<i>Fig.35. Répartition des motifs répétés détectés par L'application de SSRprimerII</i>	129
<i>Fig.36. Répartition de l'ensemble des motifs détectés par L'application SSRprimer II</i>	129
<i>Figure 37. projection des arbres étudiés sur le plan factoriel (IX2) identifié par les 15 allèles.</i>	137
<i>Figure 39. Classification des échantillons arbres d'Acacia tortilis subsp raddiana selon les facteurs 1 et 2 identifié par AFC.....</i>	138

TableauX

<i>Tableau 1. Analyse de variance à une voie des taux de germinations des graines d'A. raddiana (prov : provenance, Trait : traitement)</i>	36
<i>Tableau 2. Analyse de variance à une voie du pourcentage de la germination d'A. raddiana.....</i>	36
<i>Tableau 3. Les groupes homogènes formés à partir test Newman-Keuls au seuil $\alpha = 0.001$</i>	36
<i>Tableau 4. Analyse de variance de l'apparition de la première et la deuxième feuille et la première épine entre les six provenances.....</i>	36
<i>Tableau 5. Analyse de la variance pour le facteur provenance en relation avec les caractères de croissance au stade plantule.....</i>	41
<i>Tableau 6. Comparaison des moyennes par le test de Newman et pour les caractères ayant une différence significative (nombre de feuilles, de nœuds et des épines)</i>	41
<i>Tableau 7. Pourcentage de variation avec définition des axes de l'analyse canonique discriminante pour les six provenances d'Acacia tortilis subsp raddiana</i>	41
<i>Tableau 8. Présentation des caractères quantitatifs étudiés</i>	50
<i>Tableau 9. Caractéristiques géographiques des sites de collection des gousses.....</i>	50
<i>Tableau 10. Analyse de variance hiérarchique à trois niveaux.....</i>	55
<i>Tableau 11. Statistique descriptive des caractères biométriques de la gousse pour deux saisons</i>	58
<i>Tableau 12. Coefficient de corrélation Spearman entre les traits morphologiques observés dans les deux saisons.....</i>	61
<i>Tableau 13. Variation inter et intra provenance Analyse statistique de la saison 1 et 2 (dl : degré de liberté, SD : écart type, CV % : coefficient de variation, R² : intensité des effets et F : borne du domaine de rejet pour le seuil choisi.</i>	64
<i>Tableau 14. Estimation des paramètres génétiques des traits de la gousse par saison.....</i>	70
<i>Tableau 15. Contributions des variables en pourcentage dans la définition des facteurs 1 et 2.....</i>	71
<i>Tableau 16. Cosinus carrés des observations</i>	73
<i>Tableau 17. Performances annuelles moyennes des provenances en fonction des caractères biométriques de la gousse</i>	74
<i>Tableau 18. Répartition des pourcentages des formes des gousses au sein des six provenances.....</i>	77
<i>Tableau 19. Composition de la solution enzymatique</i>	90

<i>Tableau 20. Revue sur les microsatellites développés sur Acacia MDv : méthode de développement ; SSR : microsatellites ; EHW : équilibre de Hardy-Weinberg ; DEHW : déviation de l'équilibre de Hardy-Weinberg ; BGE : banques génomiques enrichies en microsatellites</i>	<i>114</i>
<i>Tableau 21. Les valeurs de log-vraisemblance G-statistique pour toutes les paires de provenances</i>	<i>131</i>
<i>Tableau 22. Analyse de variance moléculaire</i>	<i>132</i>
<i>Tableau 23. Fréquences alléliques par locus et par provenance</i>	<i>134</i>
<i>Tableau 24. Description de la diversité génétique au sein des provenances étudiées (Ne= nombre efficace d'allèle, A= richesse allélique, Hs=hétérozygotie intra-provenance)</i>	<i>135</i>
<i>Tableau 25. Tableau récapitulatif des paramètres génétiques calculés chez Acacia tortilis subsp raddiana</i>	<i>135</i>
<i>Tableau 26. Code barre des 50 haplotypes identifiés dans l'ordre des allèles GR2038.332-GR2038.344-GR2038.350-GR2038.356-AH.138-AH.148-AH.152-GR3097.344-GR3097.350-GR3097.356-GR3097.362-GR3097.366-GR3097.370-GR3081.222-GR3081.227</i>	<i>136</i>
<i>Tableau 27. Composition en individus des deux classes identifiées par classification hiérarchique.</i>	<i>139</i>

Liste des ABRÉVIATIONS

HCEFLCD :	<i>Le Haut Commissaire aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification</i>
StL :	<i>Longueur de la tige</i>
DC :	<i>Diamètre au collet</i>
NbLv :	<i>Nombre de feuilles</i>
NbNd :	<i>Nombre de nœuds</i>
NbP :	<i>Nombre d'épines</i>
ASP :	<i>Taille moyenne des épines</i>
LNGS :	<i>Longueur de la gousse</i>
LRGS :	<i>Largeur de la gousse</i>
PGS :	<i>Poids de la gousse ;</i>
PGR :	<i>Poids des graines de la gousse</i>
PGS-PGR :	<i>Poids de la gousse vide;</i>
NGR/GS :	<i>Nombre de graines par gousse</i>
NGRIf/GS :	<i>Nombre de graines infestées par gousse ;</i>
P100 GR :	<i>Poids de 100 graines</i>
MATAB :	<i>Mixed AlkylTrimethyl Ammonium Bromide</i>
EDTA :	<i>Acide éthylène diamine tétraacétique</i>
PVPP :	<i>Poly vinyl poly pyrrolidone dNTP</i>
PCR :	<i>Réactions en chaîne par polymérase</i>
ADN :	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
EST :	<i>Marqueur de séquence exprimée, ou Expressed sequence tag</i>
SSR :	<i>Séquence simple répétée ou simple sequence repeats</i>
RAPD :	<i>Random Amplified Polymorphism DNA</i>
AFLP :	<i>Polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés</i>
AFC :	<i>Analyse factorielle des correspondances</i>

A. Introduction générale
Présentation générale de l'espèce
Acacia tortilis subsp *raddiana*
Problématique et objectifs de l'étude

Introduction

Grâce à sa position géographique privilégiée, entre la Méditerranée au Nord, l’Océan Atlantique à l’Ouest et le Sahara au Sud, et grâce à la diversité de son relief et de ses conditions bioclimatiques, le Maroc présente une grande diversité bioécologique et une gamme très importante de milieux naturels. Le domaine forestier marocain s’étend sur une superficie d’environ 9 millions d’hectares, dont 4,5 millions d’hectares de forêts et de matorrals, 3 millions d’hectares de nappes alfatières, 1 million d’hectares d’*Acacia* sahariens et 0,5 million d’hectares de reboisement (HCEFLCD 2012). Chaque année, le Maroc produit 30 à 40 millions de plants destinés aux plantations forestières (HCEFLCD 2012), en termes de lutte contre la désertification. Malgré les faibles taux de boisement 9 %, soit un taux inférieur à l’optimum qui se situe entre 15 et 20 % (Bijaber *et al.*, 2005) et 5,8 % de boisement artificiel (Birouk *et al.*, 1996), tant par rapport à l’étendue du territoire national qu’en terme de leur densité, ils constituent un rempart important et efficace contre la désertification, les formations d’Arganiers et d’*Acacia* constituent les premières barrières de lutte contre l’érosion éolienne et l’ensablement qui menacent le pays par le sud. La diversité naturelle du paysage marocain a rapidement suscité l’intérêt des chercheurs nationaux et étrangers. Les espèces fourragères et pastorales en représentent un bon exemple. Plusieurs variétés fourragères ont été sélectionnées à partir de matériel végétal collecté au Maroc telles que la luzerne (*Medicago sativa L.*) et le trèfle souterrain *Trifolium subterraneum* (Birouk *et al.*, 1989 ; Al Faiz 1999) et sont commercialement exploitées à l’étranger (Saidi *et al.*, 2007). Parmi les caractères recherchés figurent la dormance estivale, la croissance hivernale, la résistance aux maladies et la dureté des graines chez les légumineuses. Malheureusement, cette diversité a connu ces dernières années un important déclin. La succession des périodes de sécheresse, combinées à une forte activité anthropique, a entraîné une perte remarquable de cette diversité en particulier dans les zones arides et sahariennes. La strate arborée a été particulièrement touchée à cause d'une demande croissante en bois de feu, fourrage et produits dérivés. Parmi les taxons affectés, on trouve *Acacia tortilis* subsp *raddiana* arbre multiusage « ethno-agro-sylvo-pastoral » et d’un grand intérêt écologique en raison de sa participation à la stabilisation et la fertilisation des sols.

I. Répartition géographique et intérêt de l'espèce

I.1. Origine

Le genre *Acacia* compte un nombre d'espèces relativement élevé estimé à 1200 dont 700 sont endémiques à l'Australie (Guinet *et al.*, 1978). Appartenant à la famille des Mimosacées, son pollen a été retrouvé dans des sédiments paléocènes. Les analyses polliniques, réalisées dans l'oasis de Kourkoiir (Égypte), datées du Pliocène supérieur, ont montré des traces de pollens indiquant la présence de taxons tropicaux avec un pourcentage de 20 %. Les taxons dominants mis en évidence sont : 63 % *Acacia tortilis* spp. *raddiana* et spp. *spirocarpa*, 3,1 % *Acacia etbaica*, 5,1 % *Hyphaene*, 1,6 % *Celastrales*, 1,6 % *Olea* et *Oleaceae* et 0,9 *Capparidaceae* (J.Maley 1980 ; Maley 1980)

Au Maroc, des études de pollens et de bois fossiles trouvés à la base du Moghrébien ont été réalisées par Ballouche et Thinon. Ces auteurs concluent après une analyse du bassin de Tarfaya que la végétation locale « sur la bande côtière devait être très proche de l'actuelle » tandis qu'à l'intérieur se développait une steppe à *Acacia tortilis* *subsp raddiana* (Barathon 1999), les ancêtres directs des *Acacias tortilis* *subsp raddiana* actuels proviendraient du Moghrébien.

I.2. Répartition géographique

Les espèces du genre *Acacia* couvrent des aires géographiques très diversifiées comprenant l'Afrique, l'Australie, l'Asie et l'Amérique (Guinet *et al.* 1978). Cependant, *Acacia tortilis* reste une espèce spécifique des régions arides et sahariennes (Grouzis *et al.*, 2003a). Ainsi, on la trouve dans :

- Nord du Sahara : Maroc, Algérie, Tunisie, Libye et Égypte.
- Sud du Sahara : Toute la zone Sahélo-Soudanaise, notamment dans la Mauritanie, le Sénégal, le Mali, le Niger, le Burkina, le Tchad, et le Soudan.
- Zone tropicale humide (Nigeria, Cameroun), l'arbre s'étend jusqu'à la République Centrafricaine (Grouzis *et al.* 2003a)
- Moyen-Orient : Arabie Saoudite, Yémen (Vesey-Fitzgerald 1955).

Au Maroc, trois espèces d'*Acacia* se développent spontanément : *Acacia gummifera*, *Acacia tortilis* subsp *raddiana* et *Acacia ehrenbergiana*. *Acacia gummifera* « gommier du Maroc » est un arbre endémique du Maroc, on le trouve sur les marges septentrionales du Sahara, mais surtout plus au nord dans l'aire de l'arganier et dans le Haouz. *Acacia tortilis* subsp *raddiana* et *Acacia ehrenbergiana* sont typiquement sahariens. Ce sont les arbres les plus communs et les plus utiles. On estime leur superficie à 1.011.000 ha (Mhirit *et al.*, 1999), mais la densité moyenne des peuplements est très faible. Leur aire s'étend sur toutes les régions sahariennes au sud des Atlas depuis Lagouira jusqu'à Rissani. Les populations riveraines distinguent facilement les deux arbres et chacune porte son propre nom vernaculaire, « talh el horr » ou « Amrad » pour la première et « tahlat » ou « tamat » pour la seconde. *Acacia tortilis* subsp *raddiana* est l'arbre le plus répandu et le plus commun dans le Sahara Marocain. Il est le symbole du désert en Afrique du Nord (Mhirit *et al.* 1999)

I.3. Intérêt économique et écologique *d'Acacia tortilis* (subsp) *raddiana*

Étant donné qu'*Acacia tortilis* se développe dans des régions sahariennes caractérisées par un couvert végétal limité, il est devenu la source de plusieurs usages, d'autant plus que toutes les parties du végétal sont utilisables. Les feuilles, les gousses, les jeunes rameaux et même les épines sont très appréciés particulièrement par les chèvres et les dromadaires. L'arbre sert de fourrage ligneux là où les herbacés ne se développent que périodiquement ou sont carrément absents (Grouzis *et al.* 2003a). Il assure également l'ombre aux nomades et un excellent bois de feu et de charbon, grâce à son important pouvoir calorifique. *Acacia tortilis* subsp *raddiana* participe à l'amélioration de la qualité des sols par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique (Dommergues 1995 ; Labidi *et al.*, 2007 ; Abdallah *et al.*, 2008 ; Abdallah *et al.*, 2012 b). L'arbre nodule et fixe l'azote atmosphérique grâce à une association symbiotique avec une bactérie du genre *Rhizobium* (Zerhari *et al.*, 2000 ; Shetta *et al.*, 2011 ; Fterich *et al.*, 2012a).

Il a été démontré que le taxon contient 19 % de protéines, 2,5 % de graisses, 46,5 % de carbohydrates, 5,1 % de minéraux, et 20,1 % de fibres brutes (Roodt 1998). Les feuilles contiennent des glucosides. Le taxon possède de nombreuses propriétés médicinales. La population locale l'utilise pour de nombreux traitements. Il est utilisé pour traiter la diarrhée, l'asthme, les maladies pulmonaires et comme anthelminthiques (Centre for Mediterranean Cooperation 2005).

II. Spécificité du milieu saharien au Maroc

Les écosystèmes à *Acacia tortilis* subsp *raddiana* au Maroc, appartiennent à l'étage bioclimatique saharien, caractérisé par la faiblesse de ses précipitations, de l'ordre de 100 mm par an, avec dix à douze mois secs par an et des températures annuelles maximales qui peuvent atteindre 50 °C (Birouk *et al.* 1996). Des formations sont rencontrées dans le bassin de moyen et bas Dra.

Le moyen Dra couvre une grande partie des provinces d'Ouarzazate et Zagora. Son climat est très aride. Il est caractérisé par des hivers très froids (-7 °C et -1 °C) et des étés très chauds (40 °C). Il compte un nombre de jours de pluie variant entre 30 et 40 jours par an. L'évaporation est importante, de l'ordre de 2000 à 3000 mm/an (Ministère de l'Energie 2012). La population de ce sous bassin s'élève à 643.420 habitants dont 80 % en milieu rural, concentrée dans les périphéries irriguées.

Le bas Dra renferme les provinces de Tata, Assa-Zag et Tantan. Il est très peu peuplé : 277.110 habitants dont 50 % en milieu rural concentré dans les « foums » (gorges étroites) et dans les hautes vallées étroites du versant Sud de l'Anti Atlas. Les principaux affluents de l'oued Dra dans cette zone sont issus de l'Anti-Atlas à travers les Foums qui sont séparés par les Feijas, une sorte de plaines du quaternaire à substratum schisteux. Ces « Feijas » renferment des aquifères qui sont exploités au débouché des Foums, pour l'irrigation des palmeraies. Il est caractérisé par un climat très aride, de type saharien avec des étés chauds (44 °C à Tata). La pluviométrie moyenne est de 80 mm à la sortie des foums et 90 mm à Tata. Le nombre de jours de pluie est très réduit (10 jours par an). L'agriculture de type traditionnel et l'élevage constituent les principales

activités dans le secteur. Cependant, l'apparition, ces dernières années, d'une agriculture moderne basée sur le pompage (aspiration) dans la nappe de certains fous notamment à Foum Zguid, a conduit à l'assèchement des khettaras traditionnelles et à la surexploitation de la nappe. Dans la basse vallée de l'oued Dra, l'occupation capitale est le nomadisme pastoral. Le long des lits d'oueds et sur leurs terrasses (Ministère de l'Energie 2012), les cultures pratiquées visent principalement les céréales

Au moyen Dra, les phénomènes de salure des sols sont assez abondants et amplifiés par les systèmes d'irrigation, particulièrement dans la région d'Errachidia et Taffilalt. Les sols halomorphes (sols salés = sols sodiques) que l'on rencontre aussi dans les basses vallées et les estuaires des oueds littoraux sont liés à une forte évapotranspiration combinée aux faibles précipitations et à la présence de dépôt géologique salifère (Aubert 1976). Les sols halomorphes sont caractérisés par leur teneur élevée en sels solubles, qui limitent la croissance de la végétation dans le temps et dans l'espace, au point de la faire disparaître en laissant des sols nus ou parfois recouverts d'un simple voile organique (Aubert 1976).

L'aire d'*Acacia* au Maroc est caractérisée par des sols minéraux bruts qui se développent sur les différentes structures géomorphologiques sahariennes (regs des piémonts et des hamadas, ergs et dunes isolées des plaines et vallées) (Roose *et al.*, 2011).

III. Position systématique

Le genre *Acacia* regroupe environ 1200 espèces (Guinet *et al.* 1978). Dans ce taxon, la délimitation et la subdivision des groupes sont très difficiles vu la variation continue de ces caractères. La première classification de ce groupe fut proposée en 1864 par Bentham qui fait état d'un genre *Acacia* divisé en 11 séries. Onze ans plus tard, Bentham (1875) a proposé une nouvelle classification qui divise le genre *Acacia* en 6 séries (Ducousoo *et al.*, 1991). Par la suite, Vassal a présenté une nouvelle classification qui subdivise le genre *Acacia* en trois sous genres, *Heterophyllum*, *Aculeiferum* et *Acacia* (Guinet *et al.* 1978). La dernière classification, proposée par Pedley (1986) (Pedley

1986), divise la tribu des Acacieae en trois genres schématiquement représentant les trois sous genres précédemment décrits par Vassal ; *Acacia* Miller (= sous genre *Acacia*), *Senegalia* Raf (sous genre *Aculeiferum*), et *Racosperma* (= sous genre *Heterophyllum*). Cette dernière classification est très peu adoptée (B. R. Maslin *et al.*, 2003). Les premiers résultats de la phylogénétique moléculaire ont suggéré la nécessité de réviser et de compléter la systématique actuelle de ce taxon Fig.1 (Bouchenak-Khelladi *et al.*, 2010). Ceci a conduit à la subdivision du taxon en 5 genres avec l'utilisation de nouveaux noms génériques pour *Acacia* sensu lato : *Acacia Sensu stricto*, *Vachellia*, *Senegalia*, *Acaciella* et *Mariosousa* (Bouchenak-Khelladi *et al.* 2010).

En 2011, une session de nomenclature du genre *Acacia* a été organisée en Australie (session de nomenclature Melbourne) (Pennington 2012). Lors de cette session, il a été décidé de réservé le nom d'*Acacia* s.l au sous-genre *Phyllodineae* qui est typiquement Australien, et *Vachellia* au sous-genre *Acacia* qui comprend des espèces appartenant à l'Afrique, l'Amérique et l'Asie.

Dans cette étude, nous avons adopté la nomenclature proposée par Vassal (1972) :
Acacia tortilis ssp. *raddiana* (Savi) Brenan

➤ *Subsp. Raddiana* avec deux variétés :

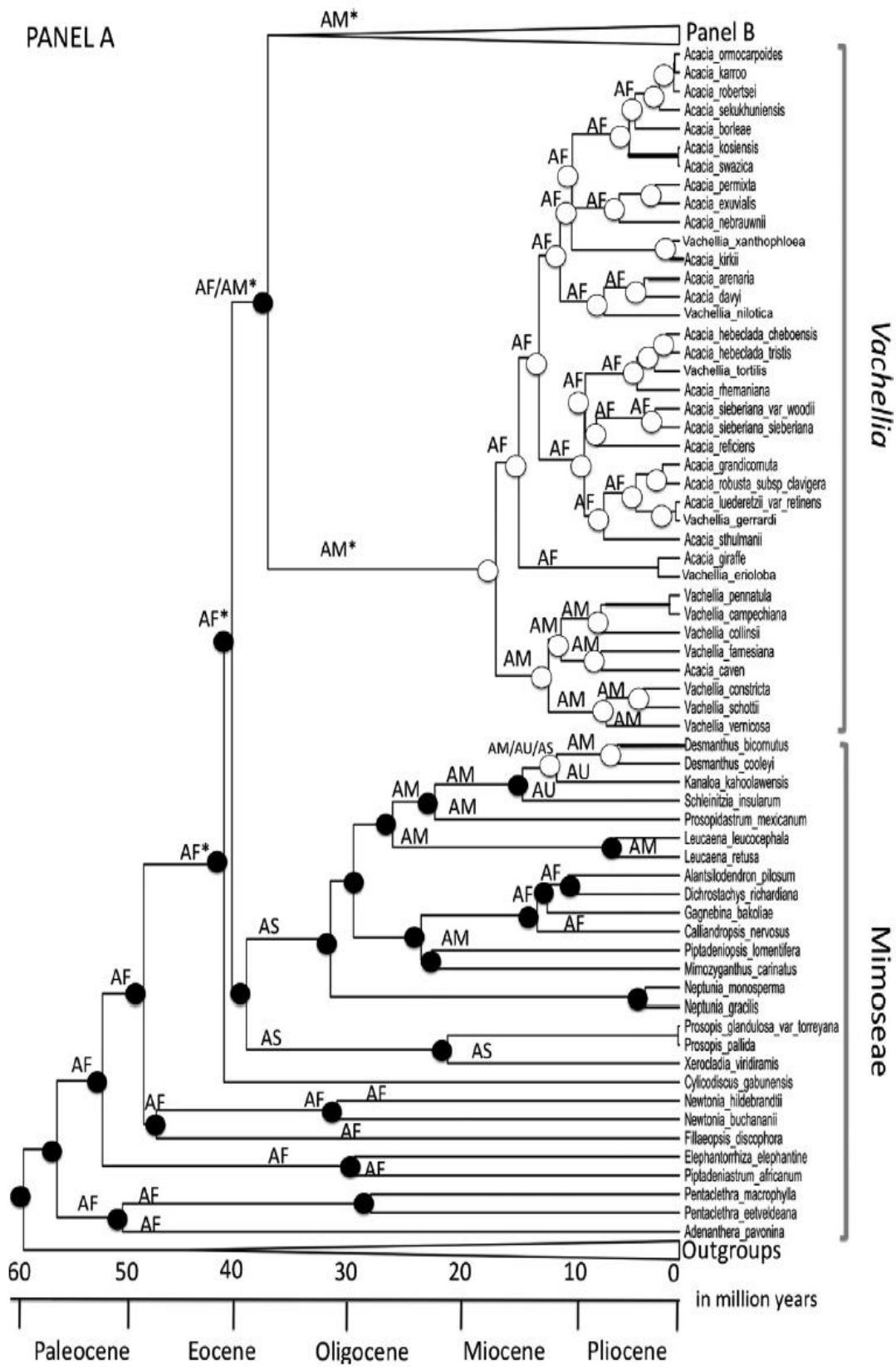
- var. *Raddiana*
- var. *Pubescens*

➤ *Subsp. Spirocarpa* avec deux variétés :

- var spirocarpa
- var. crinita

➤ *Subsp. Heteracantha*

➤ *Subsp. tortilis*



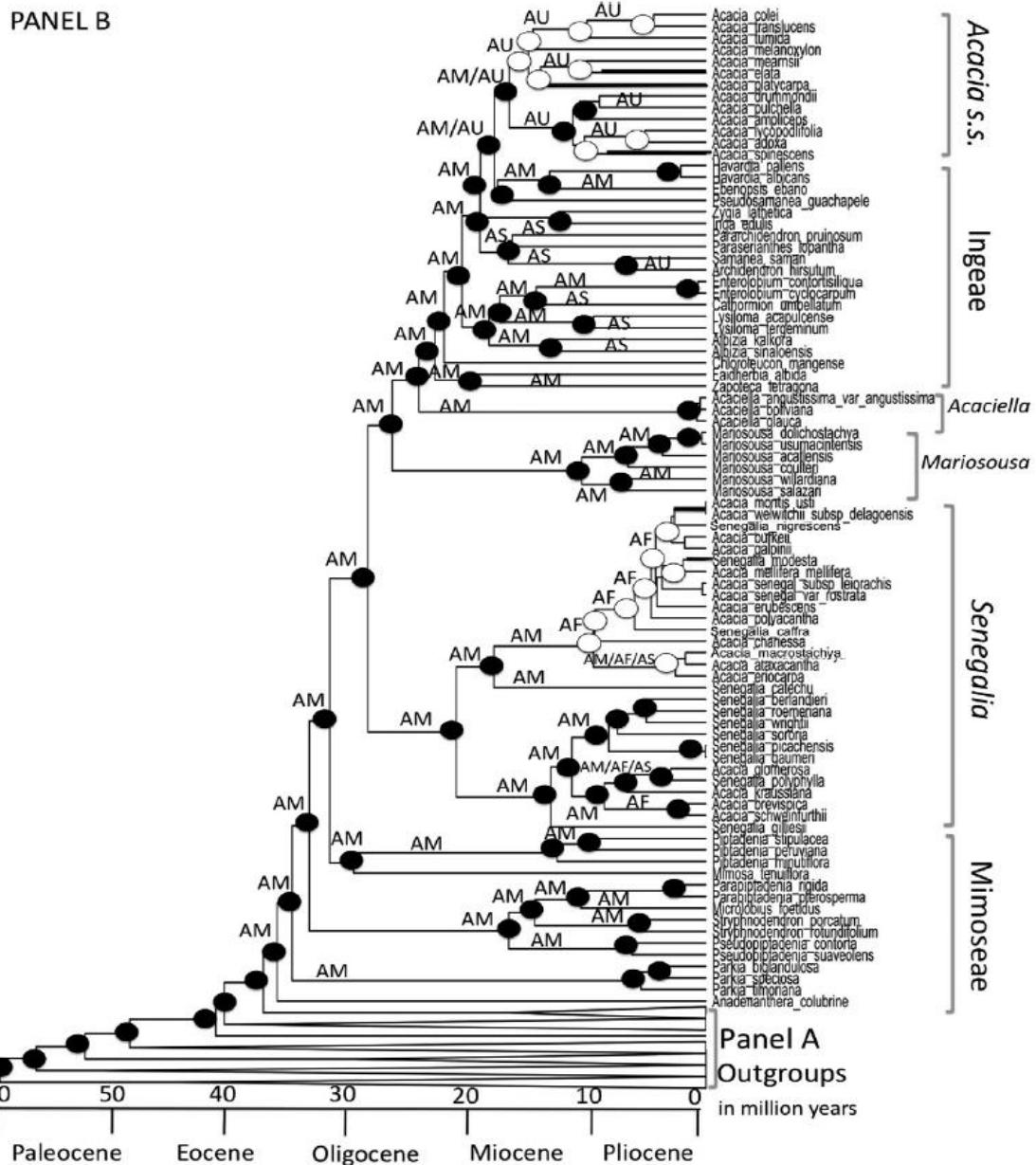


Fig.1. Classification de la tribu Acacieae (Bouchenak-Khelladi *et al.* 2010)

(Chronogramme des analyses de BEAST montrant la reconstruction de l'état ancestral en utilisant le maximum de vraisemblance et le modèle dispersion-extinction-cladogénèse en utilisant LAGRANGE v2.0. Les cercles noirs représentent des habitats fermés ou boisés, et les cercles blancs des environnements ouverts. AF : Afrique, AM : Amériques, AS : Asie et de l'UA : l'Australie)

IV. Botanique et description d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana*

Acacia tortilis subsp *Raddiana* est un arbre qui peut atteindre une hauteur de 18 m (Fig 2), à cime large et plate et à tronc pouvant atteindre un mètre de diamètre (FAO 1983). Les feuilles alternes sont de type composé bipenné. Elles sont formées d'un rachis, qui porte 5 à 15 paires de folioles. À la base du pétiole de longueur de 10 à 15 mm, deux stipule épineuses blanchâtres connées se présentent, glabres et divariquées longues de 2 à 4 cm (Maire 1987). L'inflorescence est un glomérule coloré d'un blanc crème, de 4 à 10 mm de diamètre (Fig.3). Elles sont disposées au sommet d'un pédoncule long de 15 à 30 mm. Ces pédoncules peuvent être groupés par 2 ou 3, à l'aisselle des feuilles. Les fleurs sont pentamères, sessiles et peu odorantes. Le fruit est une gousse comprimée d'un polymorphisme spectaculaire avec au moins six classes (El Ayadi *et al.*, 2012) de 10 à 15 cm de long et 5 mm de large, verte au stade juvénile et brun à brun clair à maturité. Elle contient jusqu'à 12 graines ovales, brunes, lisses et plus ou moins luisantes. Le système racinaire est de type pivotant et bien développé, ce qui permet à l'arbre d'atteindre des couches de sol profondes (Maire 1987 ; Fennane *et al.*, 2007)



Fig.2. Aspect général d'un exemplaire d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* au sud du Maroc (photos F. Msanda & A. El Mousadik)



Fig.3. a : d'une jeune feuille, b : feuilles âgées stipulées, c : l'inflorescence (glomérule), d : fruit (gousse), e : de la gomme d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* (photos F. Msanda & A. El Mousadik)

V. Problématique et objectifs de l'étude

L'aire d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* au Maroc se caractérise par un climat contrasté, caractérisé par une grande variabilité des précipitations et par une hyperaridité marquée par de faibles pluies, de l'ordre de 100 mm, avec un caractère orageux, favorisant le ruissellement et l'érosion sur des zones préalablement très dégradées. La sécheresse de l'été est encore plus aggravée par les hautes températures dues à la continentalité (Msanda 2004). Dans ce secteur, où ne se développe qu'une végétation clairsemée, l'élevage occupe une part importante dans l'activité des paysans et exerce une charge relativement élevée sur le milieu. Les besoins accrus en combustibles et en énergie pour le chauffage et la cuisson ont contraint les populations à s'attaquer aux espèces ligneuses et graminéennes. Des peuplements entiers ont été décimés par le bétail et par les coupes anarchiques. La régression de certaines espèces comme *Acacia tortilis* subsp *raddiana* et *Panicum turgidum* affecte directement la qualité des pâturages, elles sont remplacées sur les rocailles dénudées par des espèces peu appétables comme *Hammada scoparia* (Msanda 2004).

Les jours des souks hebdomadaires, notamment à Zagora, Tagounite, Rissani et Erfoud, on peut assister à la vente de charbon de bois (généralement d'*Acacia*), utilisé par les potiers ou pour les besoins domestiques (Benmohammadi *et al.*, 2000). Ce milieu est naturellement fragile, mais c'est surtout la forte pression humaine alliée à des conditions climatiques très sévères qui ont conduit par de lents processus à la dégradation du couvert végétal.

Compte tenu de l'importance et du rôle *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* dans les écosystèmes sahariens. En effet c'est un des rares taxons qui peut organiser des structures de végétation arborées en milieu saharien. C'est un arbre aux propriétés multiples, en plus de sa capacité à supporter des conditions de températures et de sécheresse extrêmes, il a un intérêt fourrager certain. En effet, les feuilles, gousses et jeunes rameaux sont appréciés par le bétail. Son effet bénéfique sur le sol ainsi que pour la flore et la faune naturelle environnante sont indéniables. La conservation et la gestion durable des peuplements d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* prennent une importance particulière qui nécessite une bonne connaissance de l'espèce.

L'objectif de cette étude est de contribuer à l'étude de la variabilité et la diversité génétique *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* à l'aide de marqueurs morpho-métriques et moléculaires. Ce qui permettra de dresser un schéma de gestion et de préservation des ressources génétiques à base d'Acacias sahariens.

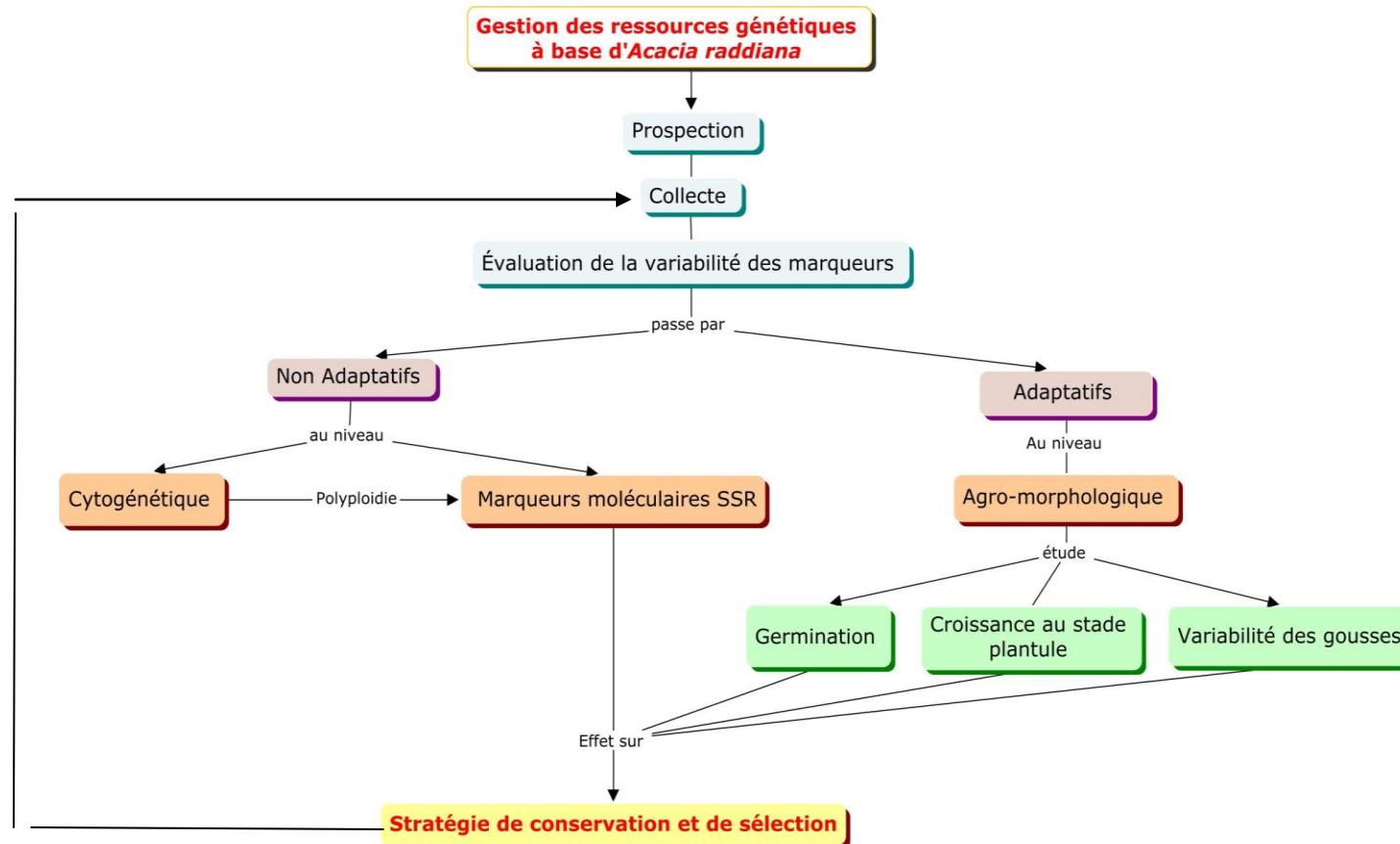
La première partie de ce travail est consacrée à l'étude de la variabilité de la capacité germinative et de la croissance de jeunes plants *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* dans six provenances. À cet effet, trois traitements ont été utilisés pour lever la dormance des graines et un suivi de la croissance des plantules sous-serre a été réalisé.

La deuxième partie est consacrée à l'évaluation de la variabilité génétique des gousses *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* et la possibilité d'intégrer ce caractère dans la sélection des arbres à intérêt écologique et socio-économique.

La troisième partie est une contribution à l'étude cytogénétique d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* qui présente des jeux de chromosomes très variables allant de $2n=2x=26$ à $2n=8x=104$. Cette étude nous permettra donc de compléter la base de données sur le nombre de chromosomes *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* du Maroc. La connaissance du matériel génétique de cette espèce aidera ainsi à l'analyse des données génomiques issues des marqueurs moléculaires.

La quatrième partie de ce travail est réservée à l'examen de la diversité génétique de ce taxon à travers le développement de marqueurs moléculaires neutres et polymorphes, d'autant plus qu'aucun marqueur n'a été développé sur cette espèce. Cette partie portera sur le développement de marqueurs microsatellites à partir d'une banque génomique d'EST. Cette étude va nous permettre d'évaluer le niveau actuel de la diversité de cette espèce qui résulte de l'effet des principaux facteurs évolutifs.

Notre étude rentre dans le cadre d'une stratégie de conservation et de gestion des ressources génétiques à base *d'Acacia raddiana* au Maroc.



Stratégie de conservation et de gestion des ressources génétiques à base d'Acacia raddiana

B. Chapitre 1.

Effet provenances et des prétraitements sur la variabilité de la germination des graines d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana*

Résumé

L'optimisation des conditions de la germination et le suivi de croissance au stade pépinière chez *Acacia tortilis* subsp *raddiana* a été suivi selon un dispositif totalement randomisé chez les graines échantillonnées sur six provenances : Msied, Guelmim, Tata, Foum Zguid, Tazarine et Mcissi. Cette étude a porté sur les mesures de pouvoir germinatif (pourcentage de germination), taux de germination, et la cinétique de croissance des plantules. Le test de la levée de la dormance des graines a été réalisé à l'aide de trois traitements en plus du témoin : Le trempage dans l'acide sulfurique concentré à 97 % pendant 1 h, scarification manuelle à l'aide de papier abrasif (verre), et trempage dans l'eau bouillante pendant 24 h. Le facteur traitement, provenance et leur interaction sont hautement à très hautement significatifs. La scarification mécanique et ou chimique sont les plus efficaces avec une légère supériorité du traitement à l'aide du papier abrasif (% de germination varie de 85 à 100 %) pour les deux tiers des provenances étudiées (Foum Zguid, Msied, Mcissi et Tazarine). D'après les résultats obtenus, l'inhibition de la germination est d'origine tégumentaire, et par suite sa levée par un traitement physique ou chimique ne peut être que bénéfique pour augmenter le taux et la vitesse de germination chez les pépiniéristes. Les plants sous-serre ont adopté la même cinétique de croissance durant le premier mois, cependant cette cinétique a considérablement changé pendant les cinq mois qui suivent, ainsi on trouve que la provenance de Foum Zguid au troisième mois a déjà développé 60 feuilles, 72 épines. L'analyse de la variance montre que seul pour les caractères nombre de ramifications, de feuilles, de nœuds et d'épines où le facteur provenance est très hautement significatif. Le classement des moyennes par le test de Newman et Keuls à 5 % montre que les plants issus de Foum Zguid sont les mieux classés, suivi de Mcissi. Ces deux provenances apparaissent avoir une production en biomasse au moins deux fois plus importante que les quatre autres provenances. Par ailleurs, les génotypes originaires de Foum Zguid et Mcissi peuvent être plus prometteurs et le suivi de ces individus sur plusieurs années pourrait servir pour la sélection d'arbres plus productifs.

Mots clés : *Acacia tortilis* subsp *raddiana*, germination, plantules, cinétique de croissance

Introduction

La biodiversité, au Maroc, connaît de graves problèmes liés à l'intense activité humaine et à la succession des périodes de sécheresse. L'interaction entre conservation de la biodiversité et développement socio-économique n'a pas toujours été bien perçue si l'on juge l'impact négatif des activités humaines qui a conduit, dans de nombreux endroits, à une dégradation irréversible des écosystèmes. Au Maroc, sur les 7000 espèces qui composent la flore marocaine, près de 1700 taxons sont actuellement considérés comme rares et menacés de disparition, ce qui représenterait une perte potentielle de plus de 24 % de notre richesse floristique. La déforestation entraîne la disparition de 31000 ha de forêt par an. *Acacia tortilis* subsp *raddiana* est une espèce considérée comme en danger du fait de la réduction de son aire de répartition et de la difficulté de sa régénération naturelle. La dégradation de l'écosystème à *Acacia tortilis* subsp *raddiana* résulte de causes multiples, cumulatives, liées aux activités anthropiques (surexploitation, coupes abusives, surpâturage ...) et climatiques (aridité climatique, sécheresses récurrentes ...). La régénération naturelle de ce taxon est délicate dans la partie nord de son aire (Lefebvre, 1889). Les obstacles à la faible régénération naturelle sont, pour l'essentiel, à mettre en relation avec l'infestation des graines par les bruches (Derbel *et al.*, 2007 ; Noumi *et al.*, 2010), la consommation des gousses par le bétail, auxquels il faut ajouter l'intense activité humaine et le surpâturage.

De nombreux programmes de réhabilitation des écosystèmes à *Acacia tortilis* subsp *raddiana* ont été mis en place, cependant la maîtrise des techniques de multiplication, d'élevage et de croissance des jeunes plants avec une bonne connaissance de la variabilité génétique de l'espèce peuvent contribuer à l'amélioration de ces types de programmes.

L'objectif de cette partie est d'étudier la capacité germinative des graines d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana*. Le test de trois traitements sur la levée de la dormance et un suivi des graines ayant germé a été réalisé. Nous avons ainsi réalisé, d'une part, une analyse de l'effet des traitements sur la vitesse et le taux de germination des graines d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* et d'autre part un suivi de la croissance des plantules sous serre pour déterminer les performances des différentes provenances.

I. Synthèse bibliographique

I.1. La dormance

Chez les plantes à fleurs, l'embryogenèse aboutit au développement d'une graine enfermée dans le fruit. Après séchage et dessiccation de la graine, l'embryon entre dans une période de repos ou de dormance. Les graines au repos germent lorsque les conditions appropriées nécessaires à la reprise de la croissance de l'embryon sont fournies, tandis que les graines dormantes ne germent que lorsque d'autres conditions additionnelles hormonales, environnementales, métaboliques, ou physiques sont respectées (Raghavan 2002). Malgré les différentes recherches menées sur la dormance, il n'existe pas de définitions claires du phénomène, peut-être parce qu'elle se manifeste et se brise de différentes façons chez différentes espèces (Bewley 1997). La dormance des graines peut être considérée comme l'échec d'une graine intacte et viable de compléter le processus de la germination sous des conditions favorables (Bewley 1997).

La dormance est une propriété innée des semences qui définit les conditions de l'environnement dans lequel la semence sera capable de germer. Elle est déterminée par la génétique, et les conditions environnementales qui ont également une influence importante sur la germination. Elle est due, au moins en partie, aux hormones : acide abscissique (Hilhorst 1995) et gibbérellines de la plante. (Finch-Savage *et al.*, 2006) et joue un rôle important chez les plantes pour surmonter les conditions environnementales défavorables (Bentsink *et al.*, 2008).

Chez certaines espèces, les graines ne peuvent pas accomplir la germination parce que leurs embryons sont soumis aux contraintes de structures qui les entourent. Ce phénomène est connu sous le nom de dormance renforcée, car les embryons isolés à partir de ces graines ne sont pas dormants. Chez d'autres espèces, un second type de dormance se manifeste, dans lequel les embryons eux-mêmes sont en dormance (dormance embryonnaire).

Pour comprendre les mécanismes de la dormance, il faut comprendre ceux de la germination qui restent inconnus en raison de la difficulté de gestion des populations de semences qui ne complètent pas le processus d'une manière synchronisée. Ajoutant à cela que la libération de la dormance peut être encore plus irrégulière parce que le stimulus seuil nécessaire pour favoriser la germination varie considérablement selon les graines.

les types de dormances sont répartis en deux groupes : dormance primaire et secondaire (Vallée *et al.*, 1999) :

- Dormance primaire liée à une dormance embryonnaire ou tégumentaire, observée même si les conditions environnementales sont favorables à la germination.
- Dormance secondaire liée principalement aux conditions nécessaires au bon déroulement de la germination, ainsi une levée de dormance primaire chez une graine qui coïncide avec des conditions défavorables de déroulement de la germination (manque de lumière, excès ou déficit de température, ...) peut provoquer une dormance secondaire (Symons *et al.*, 1987).

Plusieurs plantes de la famille des légumineuses sont caractérisées par des graines dures résistantes avec une dormance physique. Ces graines persistent plusieurs années, elles ne germent que lorsque leurs téguments sont fissurés, permettant ainsi une perméabilité à l'eau (Raven *et al.*, 2011). Les graines qui présentent une dormance physique, généralement leurs embryons ne sont pas dormants, cependant, elles ne peuvent pas germer à cause de leur imperméabilité à l'eau (dormance tégumentaire) (Baskin *et al.*, 2000b), une caractéristique qui doit être levée en réponse à des facteurs environnementaux qui signalent l'installation des conditions favorables pour amorcer une germination. Dans les régions tropicales/subtropicales et tempérées, les graines de type récalcitrantes sont intolérantes à la déshydratation, d'où le besoin continual d'un environnement humide qui assure leurs viabilités (Baskin *et al.*, 2000a).

I.2. Interaction d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* avec son environnement

Les facteurs abiotiques environnementaux occupent une place fondamentale dans les études et les théories écologiques sur la structuration des groupements végétaux (Callaway *et al.*, 1997 ; Grime 1998). Ainsi, la compétition, facilitation et allélopathie se superposent dans le bilan qui peut être fait de l'état ou de la distribution des individus à un moment donné.

Depuis une vingtaine d'années, les relations de compétitions sont évoquées à plusieurs reprises dans les modèles de fonctionnement et d'aménagement des zones arides. Actuellement, le regain d'intérêt pour les interactions positives a permis de favoriser la facilitation par rapport aux autres relations (Brooker *et al.*, 2008 ; Kikvidze *et al.*, 2011). De point de vue pratique, la facilitation paraît un outil très fascinant pour la restauration des milieux dégradés (Padilla *et al.*, 2006 ; Gómez-Aparicio 2009 ; Munro *et al.*, 2009 ;

Richardson *et al.*, 2010), que ce soit dans les milieux méditerranéens (Kunstler *et al.*, 2006 ; Riverst *et al.*, 2011) ou dans les forêts tropicales (Parrotta *et al.*, 1997 ; Engel *et al.*, 2001 ; Shono *et al.*, 2006 ; Griscom *et al.*, 2011 ; Ortega-Pieck *et al.*, 2011). L'action de la facilitation ne se limite pas seulement à l'amélioration de la survie ou de la croissance des plantes (Cavieres *et al.*, 2012), mais également à l'amélioration de la fertilité et de la teneur en eau du sol ainsi qu'à la modification du substrat (Abdallah *et al.*, 2012a ; Ross *et al.*, 2012).

Des études ont été menées dans ce sens à titre d'exemple nous notons : l'évaluation des variations spatiales et temporelles des effets positifs, négatifs et nets d'une herbe sur un autre (Maestre *et al.*, 2003) ; mesure des petites interactions biotiques ; et les variations locales déterminant la répartition spatiale ; et la performance des plantes (Gazol *et al.*, 2012) ; l'examen de l'effet de facilitation des plants (Callaway *et al.* 1997 ; Kunstler *et al.* 2006 ; Abdallah *et al.* 2008 ; Gómez-Aparicio 2009 ; Riverst *et al.* 2011 ; Goergen *et al.*, 2012).

Acacia tortilis subsp *raddiana* est une espèce clé de voûte des zones arides et sahariennes de l'Afrique (Munzbergova *et al.*, 2002 ; Andersen *et al.*, 2007a ; Andersen *et al.*, 2007 b ; Noumi *et al.*, 2012). Elle joue un rôle important dans l'amélioration des facteurs microclimatiques de son écosystème (Weltzin *et al.*, 1990 ; Khanna 1997 ; Abdallah *et al.* 2008) ce qui assure un développement de la diversité et de la production de la strate herbacée (Abdallah *et al.* 2008). L'impact positif d'*Acacia* est dû principalement à l'amélioration des disponibilités en eau et en nutriments du sol est approuvé par un ensemble des études (Weltzin *et al.* 1990 ; Bowie *et al.*, 2004 ; Abdallah *et al.* 2008 ; Abdallah *et al.* 2012a ; Abdallah *et al.* 2012 b ; Fterich *et al.*, 2012b).

La maîtrise de la germination et de la croissance des plants est essentielle d'une part, pour une meilleure gestion de la sélection des espèces autochtones, candidates, compte tenu de leur possible succès (tolérance à la sécheresse) au niveau de l'amélioration des systèmes agroforestiers et d'autre part pour augmenter les chances de réussite, et minimiser le coût des travaux de reboisement. Il est actuellement établi que la régénération des espèces sous bioclimat présaharien et aride est souvent entravée par un faible établissement des semis. L'information sur la biologie des semences et les indices de germination souffre d'une grande défaillance (Abari *et al.*, 2012). La germination est entre autres sujette à des caractéristiques endogènes des semences, mais aussi aux conditions environnementales du milieu, et en particulier à la disponibilité de l'eau, ainsi qu'à la salinité du sol (Guterman 2000).

II. Matériels et méthodes

II.1. Test de germination

II.1.1. Collection des graines

L'étude des propriétés germinatives des graines d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* a porté sur six provenances marocaines : Msied, Guelmim, Tata, Foum Zguid, Tazarine et Mcissi. La collecte des fruits murs, de type gousse, a été réalisée au mois de juin 2008. Les fruits récoltés ont été conservés dans des sachets en papier et placés dans un endroit aéré au Laboratoire de Biotechnologies et de Valorisation des Ressources Naturelles de la Faculté des Sciences d'Agadir.

Les graines utilisées dans notre expérimentation étaient toutes saines, sans traces de *bruchidés*, ou d'autres parasites. La viabilité des graines a été testée en plaçant les semences dans de l'eau ; les graines qui coulent sont supposées viables.

II.1.2. Prétraitement et prégermination des graines

Les téguments des graines d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* ont une structure anatomique typique des légumineuses, qui se traduit par une forte inhibition tégumentaire de la germination (dormance physique). Cela implique qu'une scarification naturelle ou artificielle du tégument est nécessaire pour permettre l'imbibition et la germination des graines. Pour lever la dormance physique des graines, trois prétraitements ont été testés en comparaison avec le témoin non traité :

- Trempage dans l'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré à 97 % pendant 1 h (Masamba 1994 ; Ashraf *et al.*, 2005 ; Akram Kiani Abari 2011 ; Abari *et al.* 2012)
- Scarification manuelle (Masamba 1994 ; Ashraf *et al.* 2005 ; Akram Kiani Abari 2011 ; Tadros *et al.*, 2011 ; Fox *et al.*, 2012) : à l'aide d'un papier abrasif (verre), nous avons réalisé une petite entaille au niveau du tégument de la graine du côté opposé au pôle de l'embryon (Orozco-Almanza *et al.*, 2003).
- Trempage dans de l'eau bouillante pendant 24 h (Masamba 1994 ; Akram Kiani Abari 2011 ; Ammondt *et al.*, 2012)

Après chaque traitement, les graines ont été désinfectées séparément par trempage dans l'hypochlorite de sodium (Eau de javel) 1 % additionné de quelques gouttes de Tween,

pendant une heure, suivie de trois rinçages de 10 min avec l'eau distillée stérile afin d'éliminer les traces de l'hypochlorite de sodium.

Pour chaque population et pour chaque traitement, nous avons réalisé trois répétitions à raison de 25 graines.

II.1.3. Mise en germination des graines

La préparation des graines et leur stérilisation a été réalisée sous une hotte à flux laminaire, afin d'éviter la contamination microbienne des échantillons. La hotte est équipée d'une lampe UV à effet germicide qui permet de stériliser le plan de travail et son contenu lorsqu'il n'est pas utilisé. Les graines traitées ont été placées dans des boites de Pétri contenant du papier Whatman préalablement stérilisé et imbibé d'eau distillée stérile (3 ml pour chaque boite). Les boites ont été ensuite incubées à l'obscurité à 25 °C. La germination *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* est optimale (supérieure à 90 %) dans une gamme de températures comprises entre 20 et 35 °C (Grouzis *et al.* 2003a).

Un apport de 1 ml d'eau distillée stérile est réalisé tous les sept jours avec, si nécessaire, changement de papier Whatman.

Un suivi journalier, de la germination, a été effectué sur une durée de 28 jours. Les pourcentages cumulés de germination ont été déterminés afin de comparer la capacité germinative *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* à l'échelle des différentes provenances étudiées. La germination est déterminée par l'extension de la radicule au-delà de 1 mm (Miller 1995 ; Mbaye *et al.*, 2002)

II.2. Test de croissance des plantules *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* sous serre.

II.2.1. Repiquage des graines germées sous serres.

Le montage de l'essai sous serre a été réalisé selon un dispositif en blocs aléatoires complets avec trois répétitions, où chaque répétition est représentée par cinq graines germées. Les graines ont été repiquées dans des plaques de 40 alvéoles, où chaque alvéole a une dimension de 20 cm de profondeur et 8 cm de diamètre, contenant un mélange de sable et de tourbe dans des proportions de 2:1 (Fig. 4).



Fig.4. Transplantation des graines germées dans les plaques



Fig.5. Mesure du diamètre au collet à l'aide d'un pied à coulisse

L’arrosage a été effectué quotidiennement à raison de 80 ml d’eau pour chaque alvéole. La température de la serre n’était pas contrôlée, elle variait selon les conditions climatiques, de 27 °C à 38 °C. Le suivi de la croissance a été réalisé du 23 Mars au 23 septembre 2010.

II.2.2. Paramètres de suivi de la croissance des plantules

Dans le but de déterminer la vitesse de démarrage de croissance des plantules, nous avons effectué un suivi de la date d’apparition de la première feuille, la deuxième feuille et des épines au niveau des six provenances étudiées.

Le suivi de la croissance des plantules d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana*, a été réalisé sur une période de six mois. Chaque semaine, sept paramètres ont été mesurés (Mehari *et al.*, 2005) : longueur de la tige (StL) en cm, mesurée en utilisant une règle graduée, la mesure est prise du collet à l’insertion du méristème apical, diamètre au collet (DC) en mm : mesure prise à l’aide d’un pied à coulisse numérique (Fig. 5), nombre de feuilles (NbLv), nombre de nœuds (NbNd), nombre d’épines (NbP) et leur taille moyenne (ASP).

II.3. Analyse statistique

II.3.1. Test Levene homogénéisation des variances, et transformation des données

« *Un postulat important à la base de l’ANOVA concerne l’homogénéité des variances. Plusieurs études semblent démontrer que dans le cas d’échantillons d’effectifs égaux, le test F est un test robuste, c'est-à-dire qu'il est peu affecté par la violation du postulat de normalité des données brutes et la violation de l’homogénéité des variances. C'est une des raisons pour laquelle plusieurs auteurs recommandent fortement l’utilisation de groupes égaux. Toutefois (Wilcox 1987) démontre que même dans le cas d’échantillons de tailles égaux, le test F peut être affecté par une hétérogénéité sévère des variances, d'où l'importance d'une vérification préalable à l'aide de tests statistiques. Conover et ses collaborateurs (Conover *et al.*, 1981) ont recensé et comparé 56 tests d’homogénéité des variances. Un des meilleurs est le test de Levene (Levene 1960) et sa variante, le test de Morton (Morton *et al.*, 1974),*

Le rejet de l’hypothèse nulle (un ratio F significativement supérieur à 1.00) implique la présence d’hétérogénéité dans les variances et la nécessité de recourir à une transformation non linéaire des données dans le but de ramener les scores extrêmes plus près de la moyenne. » (Anonyme 2012b)

En effectuant le test de (Levene 1960) sur nos échantillons il s'est avéré que nous avons une hétérogénéité des variances d'où nous avons procédé à une transformation des (normalisation) données selon l'équation : $x = \ln x + 5$, ou $x = \arcsin \sqrt{x}$ dans le cas des valeurs sous forme de pourcentage.

II.3.2. Analyse de variance

L'ensemble des données a été soumis à une analyse de variance à deux critères de classification : prétraitement et provenance pour le test de germination, provenance et bloc pour le test de croissance. Une comparaison multiple Post-Hoc des moyennes selon le test de Duncan au seuil de 5 % a été également réalisée pour définir les groupes homogènes. Ces derniers ont été réalisés par la procédure GLM (Modèle Linéaire Général) du logiciel Statistica V6.0 (StatSoft France 2003).

Nous avons calculé le pourcentage de germination des graines dans le but de définir le pouvoir germinatif de chaque provenance en nous basant sur l'équation : $G_p = \frac{n}{N} \times 100$

Avec G_p le pourcentage final de germination, n le nombre de graines germées, N le nombre initial des graines mises à germer.

De même, nous avons calculé le taux de germination qui donne une idée sur l'évolution de la germination des graines dans le temps. Le taux de germination est déterminé par le calcul du nombre de graines germées dans un intervalle de temps selon l'équation :

$$G_t = \sum_{i=1}^n \left(\frac{n}{t} \right)$$

Avec G_t le taux de germination, n le nombre de graines germées à l'intervalle de temps t, dans notre cas nous avons pris comme intervalle de temps une semaine (7 jours)

La vitesse de germination est également prise comme critère. Elle peut être quantifiée soit par le temps nécessaire pour obtenir la germination de 50 % du pourcentage cumulé des graines (Orozco-Almanza *et al.* 2003), soit par la valeur de la pente de la courbe représentant le pourcentage de germination en fonction du temps.

III. Résultats et discussion

III.1. Effet des prétraitements sur la germination *in situ* des graines

Nous avons testé trois méthodes pour lever la dormance des graines *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana*. Les figures (6a.b) montrent que le traitement chimique avec l'acide sulfurique et le traitement mécanique à l'aide du papier de verre ont donné les meilleurs résultats pour toutes les provenances à l'exception de Foum Zguid où le meilleur pourcentage de germination (75 %) a été obtenu par le traitement à l'eau bouillante (Fig.7). L'acide sulfurique est un acide fort, il dégrade les téguments augmentant ainsi leur perméabilité, ce qui rend le processus de germination plus rapide. L'usage de l'acide sulfurique concentré peut se révéler dangereux, l'application de cette technique en pépinière reste difficile et non recommandée aux débutants.

La scarification mécanique a généré les meilleurs pourcentages de germination pour les deux tiers des provenances étudiées il s'agit de : Foum Zguid, Msied, Mcissi, Tazarine, avec successivement un pourcentage de germination de 95 %, 87 %, 84 %. Pour la provenance de Tata et Msied ; l'effet de l'acide sulfurique et du papier de verre sur la germination finale était étroitement proche. Les deux traitements permettent d'obtenir un pourcentage de l'ordre de 100 % pour la provenance de Msied, tandis que pour les échantillons de la localité de Tata nous avons noté 76 % pour la scarification à l'aide du papier verre et 72 % de pour les graines traitées avec l'acide. La scarification par l'eau bouillante paraît la moins rentable en terme de pourcentage par rapport aux autres traitements. Les pourcentages de germination varient entre 75 % Foum Zguid et 47 % à Guelmim.

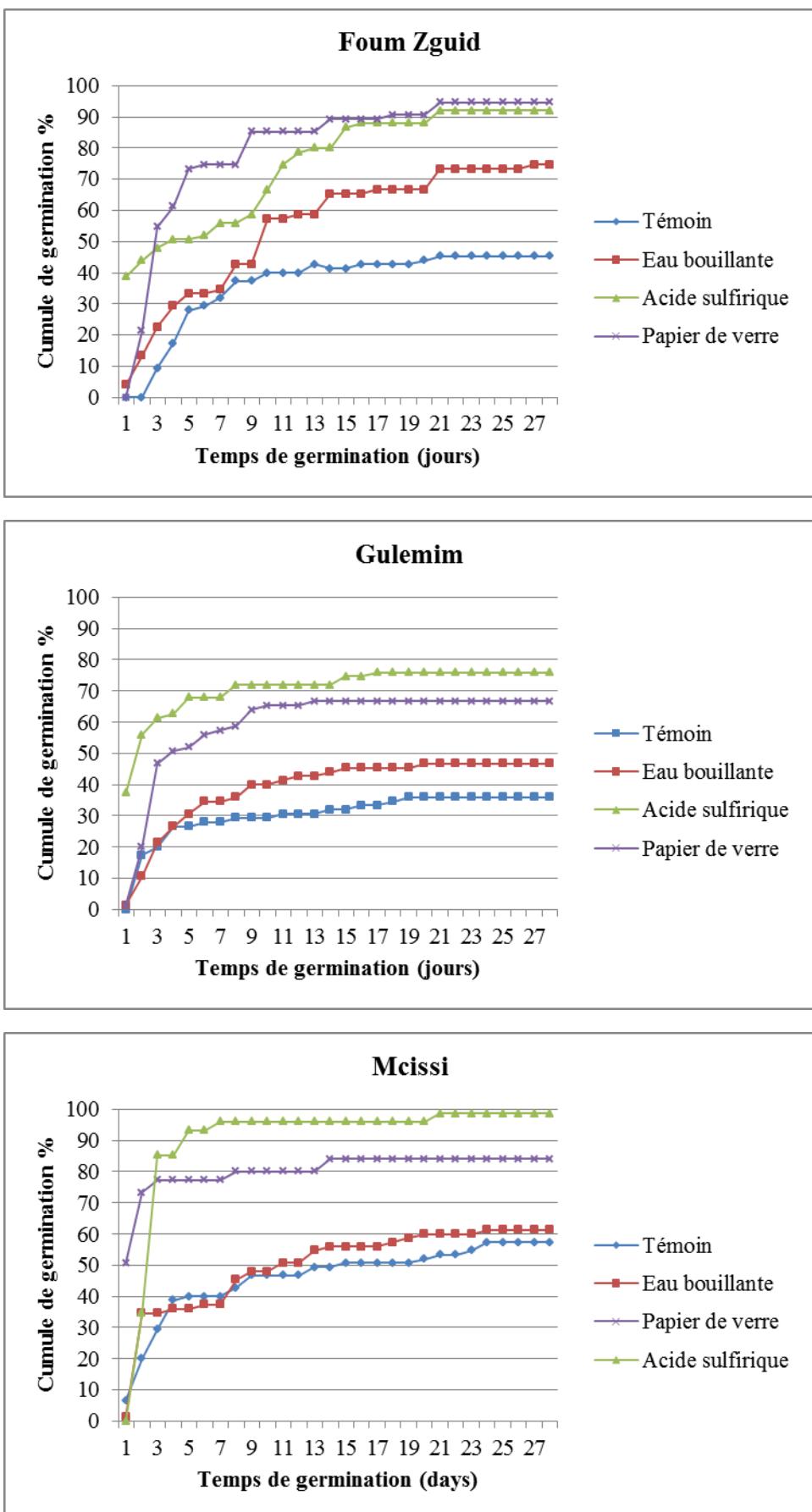


Fig.6a. Pourcentage de germination des provenances sous les trois traitements

La majorité des espèces d'*Acacia* ont un tégument dur qui leur permet de survivre dans des conditions environnementales difficiles (Teketay 1998 ; Venier *et al.*, 2012a ; Venier *et al.*, 2012b ; Venier *et al.*, 2012c), connue sous le nom de dormance physique (imperméabilité du tégument à l'eau) des graines. Ce mécanisme revêt une importance écologique en déterminant le lieu et le temps de germination des graines. Jurado et Westoby (Jurado *et al.*, 1992) supposent que les espèces à germination rapide profitent d'un seul événement de précipitations, tandis que, les espèces à germination lente ont besoin de l'incidence de plusieurs événements pluviométriques pour assurer une humidité suffisante du sol sur une longueur de temps considérable.

La dormance des graines d'*Acacia* peut être rompue par scarification mécanique ou ramollissement chimique (Sy *et al.*, 2001). Toutefois, la scarification manuelle ne garantit pas la germination de toutes les graines viables, et n'est pas appropriée pour une utilisation à grande échelle (Clemens *et al.*, 1977). Cependant, il a été démontré que la scarification mécanique des graines de *A. origena* et *A. pilispina*, assure une germination de 100 % (Teketay 1998). La germination d'*A. oerfota* a été augmentée de manière significative lorsque les graines ont été scarifiées par du papier verre. Pour *A. pilispina* et *A. origena*, le trempage dans l'acide sulfurique pendant 60 min, 90 min, 120 min fait que le pourcentage de germination peut augmenter de façon significative (>95 %) (Teketay 1998). Les travaux de (Rodrigues *et al.*, 2008) ont également démontré que l'immersion des graines de *A. mangium* dans l'acide sulfurique pendant 90 min, et dans l'eau bouillante pendant 60 s étaient les plus efficaces pour lever la dormance des graines, cela est dû au ramollissement du tégument qui augmente la perméabilité de la couche endocarpe (Rostami *et al.*, 2009).

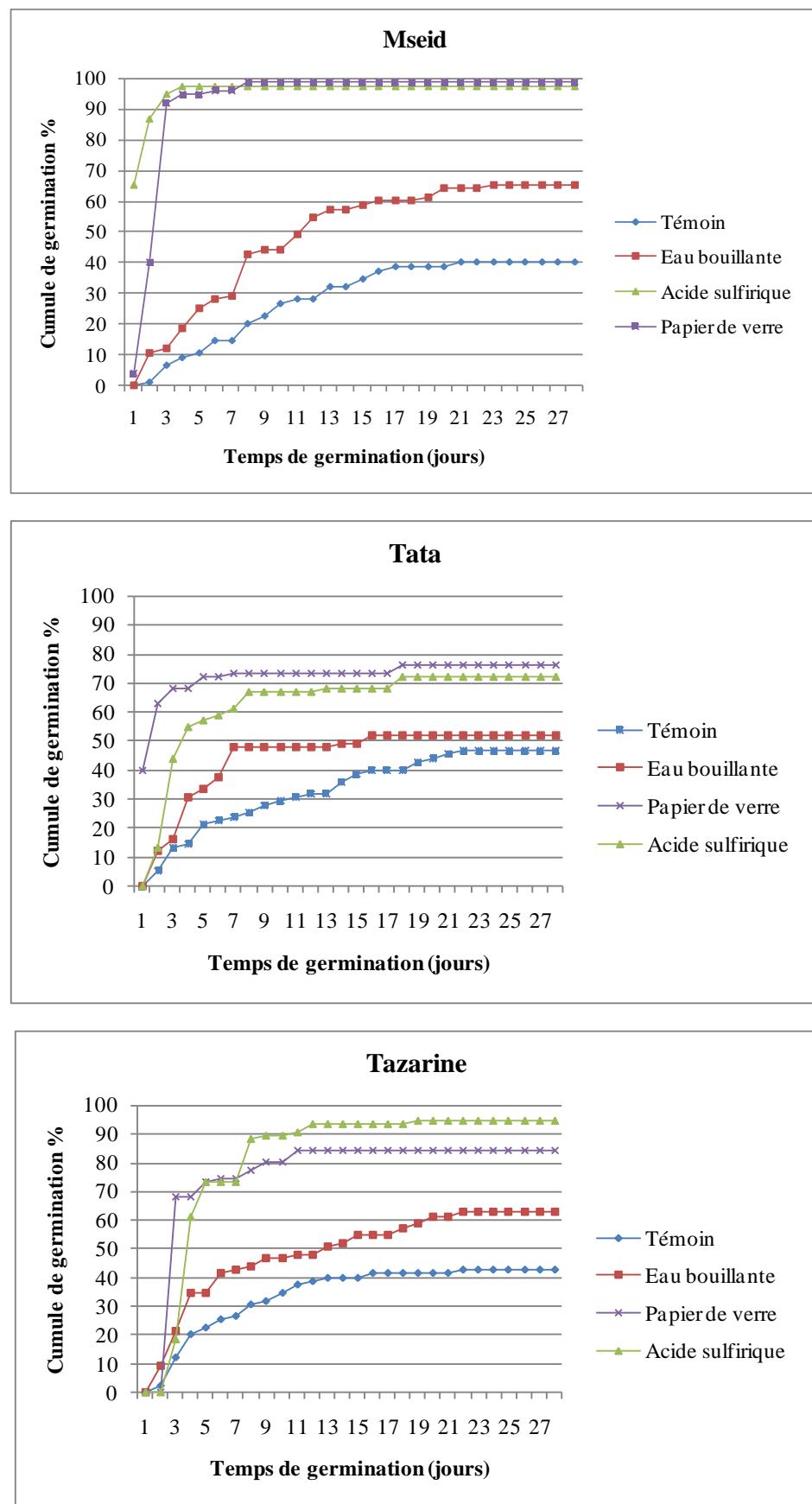


Fig.6b. Pourcentage de germination des provenances sous les trois traitements

Ces résultats qui s'accordent en partie avec ceux de (Teketay 1996 ; Aref 2000 ; Abari *et al.* 2012) montrent que la levée de dormance chez *Acacia tortilis* subsp *raddiana* se fait d'une manière efficace à l'aide de la scarification mécanique. Cette technique présente l'avantage d'être plus facile et plus sécurisée et peut remplacer l'eau bouillante et l'acide sulfurique, techniques plus lourdes et plus dangereuses. Cela n'empêche pas que plusieurs études ont démontré l'efficacité de l'eau bouillante et/ou de l'acide sulfurique pour la levée de la dormance chez les graines d'*Acacia* tel qu'*Acacia farnesiana* et *A. salicina* (Foroughbakhch, 2000 ; Rehman *et al.*, 1999). Le trempage dans l'eau du robinet froide pendant 48 h, génère les pourcentages de germination les plus faibles par rapport aux autres techniques (Abari *et al.* 2012). Un résultat similaire a été obtenu sur les graines *A. nilotica* après trempage de ses graines dans l'eau du robinet pendant 72 h. Cette dernière a produit un pourcentage de germination très faible de l'ordre de (4 %) (Goda 1986).

Nos constatations nous permettent de conclure que la dormance chez *Acacia tortilis* subsp *raddiana* est de type physique (Venier *et al.* 2012b), associée à la structure du tégument de la graine imperméable à l'eau. Le ramollissement du tégument par un traitement chimique (acide sulfurique) ou fissuration par traitement mécanique (papier de verre) s'avère essentiel pour favoriser la germination, en augmentant la perméabilité à l'eau et l'afflux de l'oxygène à l'embryon. Après un traitement approprié par l'acide sulfurique et/ou papier de verre, la majorité de nos graines a rapidement germé.

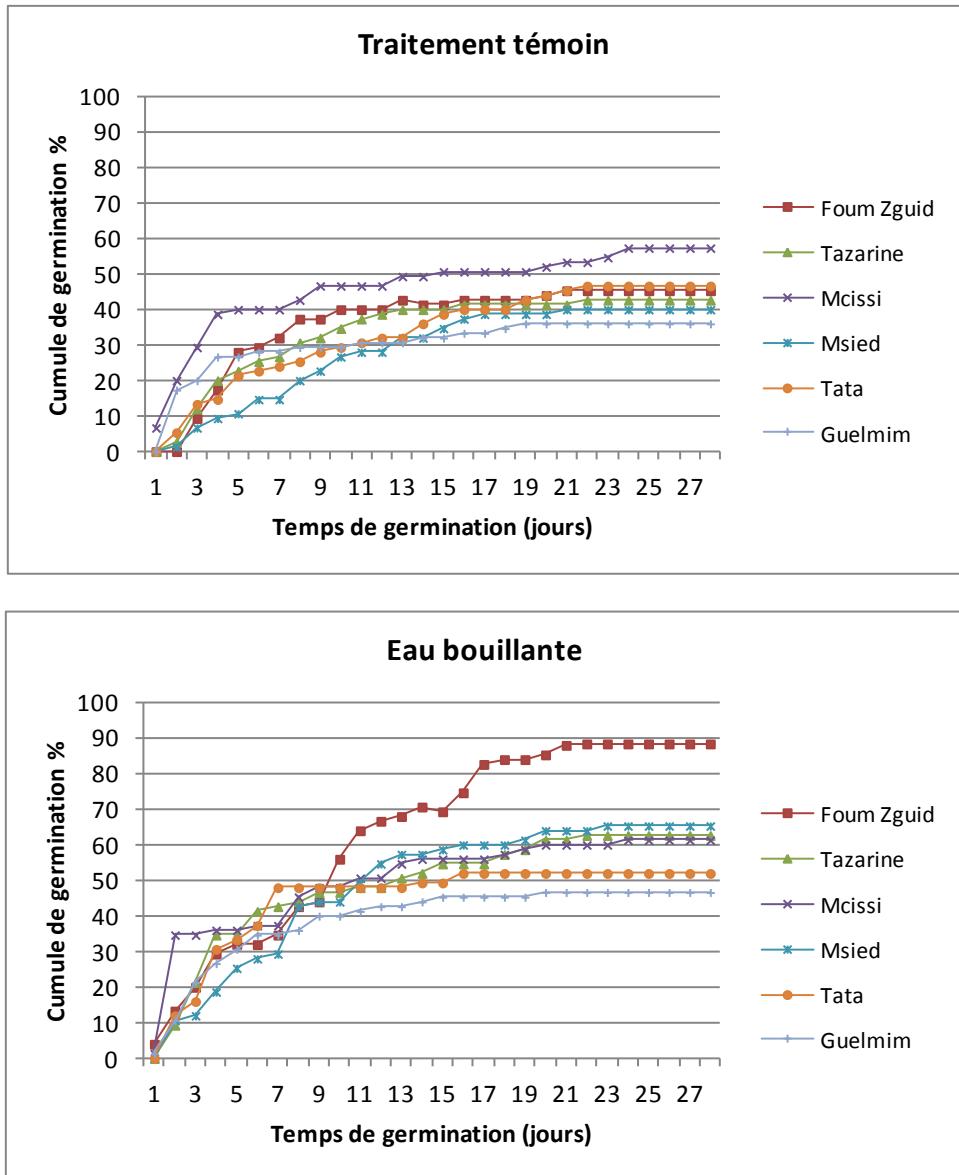


Fig.7. Comparaison de l'uniformité de germination des six provenances étudiées

III.2. Uniformité et taux de germination des provenances

L'analyse des courbes de germination (fig.6a, et 6 b) montre l'existence de trois phases dans la cinétique de germination :

- ✓ Une première phase de latence de très courte durée, la majorité des graines ont germé à partir du premier ou du deuxième jour, cette phase correspond à la phase d'imbibition des graines ;
- ✓ Une deuxième phase exponentielle où l'on assiste à une accélération de la germination ;
- ✓ Une troisième phase caractérisée par un palier indiquant un arrêt de la germination.

Bien que les courbes aient la même forme générale, d'importantes différences dans le pourcentage de germination cumulé apparaissent entre les populations. La forme des courbes dépend aussi de l'uniformité de la population, le degré de simultanéité ou la synchronie de la germination. Il est surtout évident que la population des graines représentée par la courbe de Foum Zguid pour les trois traitements, Mcissi dans le graphe de traitement par l'eau bouillante, et Guelmim dans le graphe de traitement par papier de verre n'est pas uniforme. Dans ces cas, un pourcentage limité de graines parvient à germer assez tôt, mais le reste commence à le faire après un délai.

En prenant le cas de Foum Zguid, on remarque que cette dernière a adopté le même comportement dans les trois traitements, par conséquent, la population semble se composer de deux groupes distincts : un groupe à germination rapide et l'autre à germination lente (voir Fig.7). Cet exemple illustre également le fait que les populations avec la même faculté germinative, par exemple, Msied et Guelmim pour le traitement d'acide sulfurique, peuvent être différentes par autres points tels que le pouvoir germinatif. Ainsi, on trouve que Msied avait un pouvoir germinatif de 99 % pour l'acide sulfurique alors que Guelmim n'avait que 76 %. L'allure homogène représentée chez l'ensemble des populations par une pente reflète que la majorité de la germination des graines, se produit sur une période de temps relativement court. Cela prouve que les graines en général germent plus dans la première que dans la seconde moitié de la période de germination.

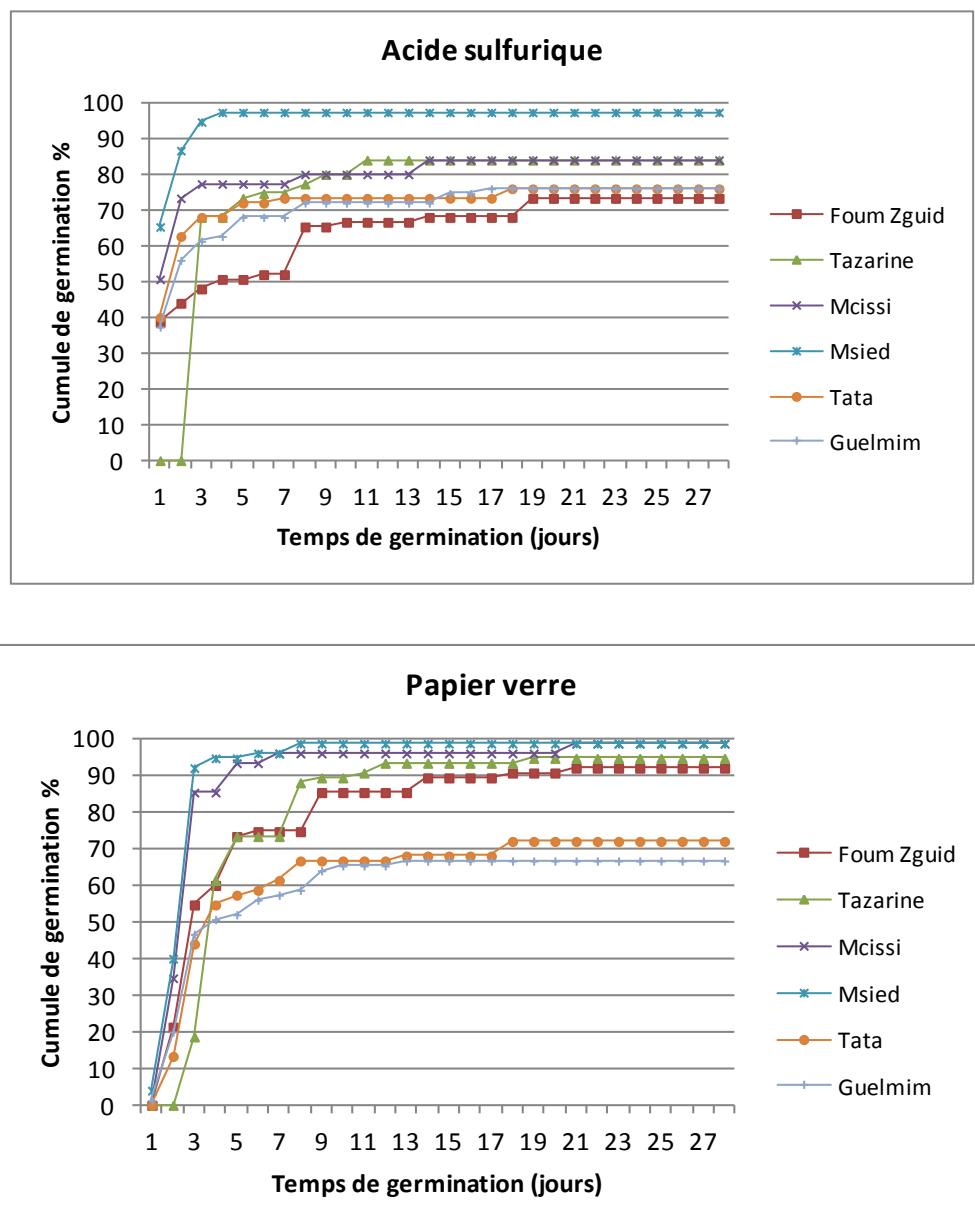


Fig.7b. Comparaison de l'uniformité de germination des six provenances étudiées

Bien que les échantillons de graines puissent être identiques dans la mesure où la capacité de germination et l'uniformité à la fois sont concernées, ils peuvent être très différents dans leur taux de germination. *Le taux de germination peut être défini comme l'inverse du temps pris pour que le processus de germination soit achevé, en commençant à partir du moment de l'ensemencement.* Cela peut être déterminé pour une graine individuelle, mais elle est généralement exprimée pour une population.

La mesure du taux de germination peut être basée sur le temps requis par un pourcentage quelconque de graines, généralement de 50 %, pour terminer le processus de germination (Bewley *et al.*, 1994). À ce stade, il est utile de revenir brièvement à la question de l'uniformité. La population de graine qui est très uniforme est celle dans laquelle les taux de germination individuels sont proches du taux moyen de germination pour la population dans son ensemble. L'uniformité, par conséquent, peut être exprimée comme la variance de temps individuels autour de la moyenne du temps de la population.

III.3. Effet de la provenance et des traitements sur le pourcentage et le taux de germination

L'ensemble des données a été soumis à une analyse de variance à deux critères de classification : prétraitement et provenance pour le test de germination.

Les résultats montrent que le facteur provenance n'a pas d'effet significatif pour le taux de germination (tableau 1), alors que ce facteur a un effet significatif pour le pouvoir germinatif au seuil $\alpha=0,001$ (tableau 2). L'effet du facteur traitement s'avère très hautement significatif pour les deux cas, ce qui prouve l'intérêt des traitements utilisant le papier verre et l'acide sulfurique par rapport au traitement à l'eau chaude. L'interaction des deux effets provenances et traitements présente des différences très hautement significatives pour le taux et le pourcentage de germination.

Nous avons eu recours au test Newman-Keuls au seuil $\alpha = 0.001$ pour associer les groupes homogènes avec les meilleures moyennes du taux et du pourcentage de germination (tableau 3). Les provenances Mcissi, Foum Zguid sont les meilleures en terme de pourcentage et taux de germination, suivie par Guelmim et en dernier on trouve successivement Tata et Tazarine.

Les meilleures vitesses de germination sont notées pour la provenance de Mcissi et Msied qui ont atteint 50 % de germination au premier jour après semi pour le traitement papier verre, et au deuxième jour pour le traitement acide sulfurique Fig.8.

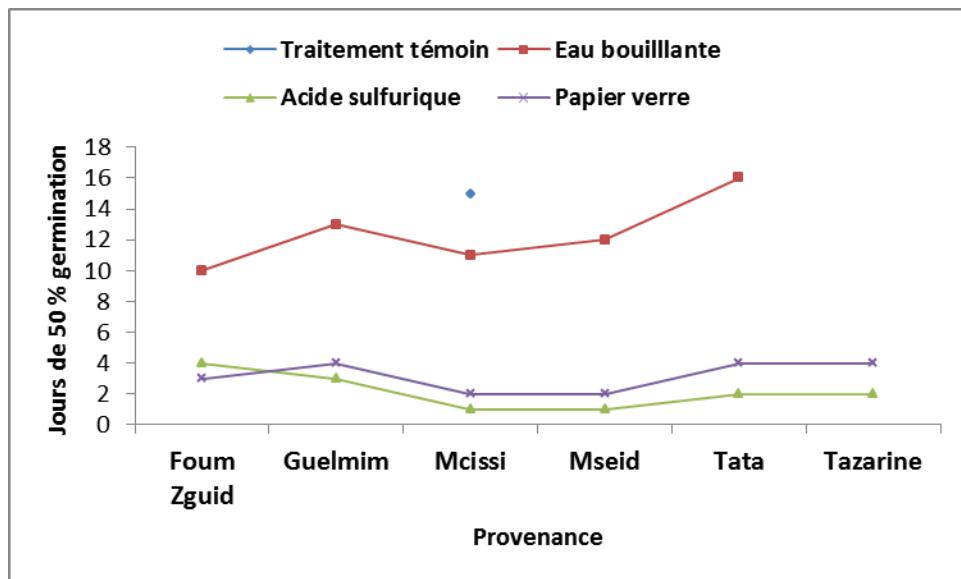


Fig.8. Vitesse de germination pour les trois traitements acide sulfurique, papier verre et eau bouillante pour les six provenances.

Tableau 1. Analyse de variance à une voie des taux de germinations des graines d'*A. raddiana* (*prov : provenance, Trait : traitement*)

df	1 ^{ère} et 2 ^{ème} phase de germination				3 ^{ème} phase de germination	
	1 ^{ère} semaine		2 ^{ème} semaine		3 ^{ème} semaine	
	F	P	F	P	F	P
Prov	5	1,66**	0,20	3,62**	0,02	7,53**
Trait	3	38,70***	<0,001	97,17***	<0,001	84,78***
Prov*trait	15	22,48***	<0,001	6,071***	<0,001	4,36***
Erreur	48					

Tableau 2. Analyse de variance à une voie du pourcentage de la germination d'*A. raddiana*

	df	Pourcentage de germination	
		F	P
Provenance	5	7,53***	<0,001
Traitements	3	84,78***	<0,001
Provenance*traitement	15	4,36***	<0,001
Erreur	48		

Tableau 3. Les groupes homogènes formés à partir test Newman-Keuls au seuil $\alpha = 0,001$

Taux de germination		Tata	Guelmim	Foum zguid	Msied	Tazarine	Mcissi
	1 ^{ère} semaine	7,47c	7,50c	7,54c	7,58bc	7,66b	7,79a
	2 ^{ème} semaine	7,73a	7,62b	7,82a	7,83a	7,74a	7,82a
	3 ^{ème} semaine	7,78b	7,60c	7,89ab	7,85ab	7,86ab	7,91a
	Pourcentage de germination	4,17b	3,98c	4,28ab	4,24a	4,24ab	4,30a

Tableau 4. Analyse de variance de l'apparition de la première et la deuxième feuille et la première épine entre les six provenances

Source de variance	Df	1 ^{ère} feuille		feuille 2 ^{ème}		Épine	
		F	P	F	P	F	P
Provenance	5	0	1	0,045	0,998801	0,0329	0,999438

III.4. Croissances des plantules

III.4.1. Le plant de six mois

D'une façon générale, le plant *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* de six mois est constitué d'une tige dressée qui présente, au-dessus des cotylédons, une série de feuilles penninerves composées paripennées à phyllotaxie alterne spiralée avec des folioles, et des épines qui marquent la présence d'un nœud. Le plant présente également un pivot, muni de nombreuses racines latérales fines. Dans la partie aérienne, la ramification apparaît entre le troisième et le quatrième mois de croissance, ces ramifications continuent de se prolonger et portent, par la suite, de nouvelles ramifications latérales. Ce mode de croissance a été observé chez toutes les provenances. Cependant, certains plants ont montré une importante croissance en hauteur sans présenter de ramification ce qui a fragilisé la tige et a causé sa courbature.

III.4.2. Cinétique de croissance des plants

III.4.2.1. Premier mois

L'existence d'une différence très hautement significative de la vitesse de germination des graines entre les provenances durant les premiers jours, nous a mené à suivre la cinétique de croissance des plantules durant le premier mois après repiquage des graines germées. Les variables étudiées sont l'apparition de la première et de la deuxième feuille, et de la première épine. L'analyse de variance à une voie ANOVA à un seul facteur « la provenance » (Tableau 4) a montré qu'il n'y a aucune différence significative entre les provenances pour ces trois variables, ce qui permet de conclure que toutes les provenances commencent leur croissance avec la même vitesse.

III.4.2.2. Taux de croissance durant les six mois

Les plants sous serre ont adopté la même cinétique de croissance durant le premier mois, cependant cette cinétique a considérablement changé durant les mois suivants. Par exemple, au troisième mois la provenance de Foum Zguid a développé un cumul de 60 feuilles et 72 épines, alors que pour la même période la provenance de Tazarine n'a montré que 15 feuilles et 15 épines (fig.9).

La comparaison des taux de croissance des plants a montré l'existence de périodes de croissance rapides en alternance avec des périodes de croissance lente (Fig.10). À titre d'exemple, on va citer celui de la provenance de Foum Zguid qui a développé 14 % de feuille

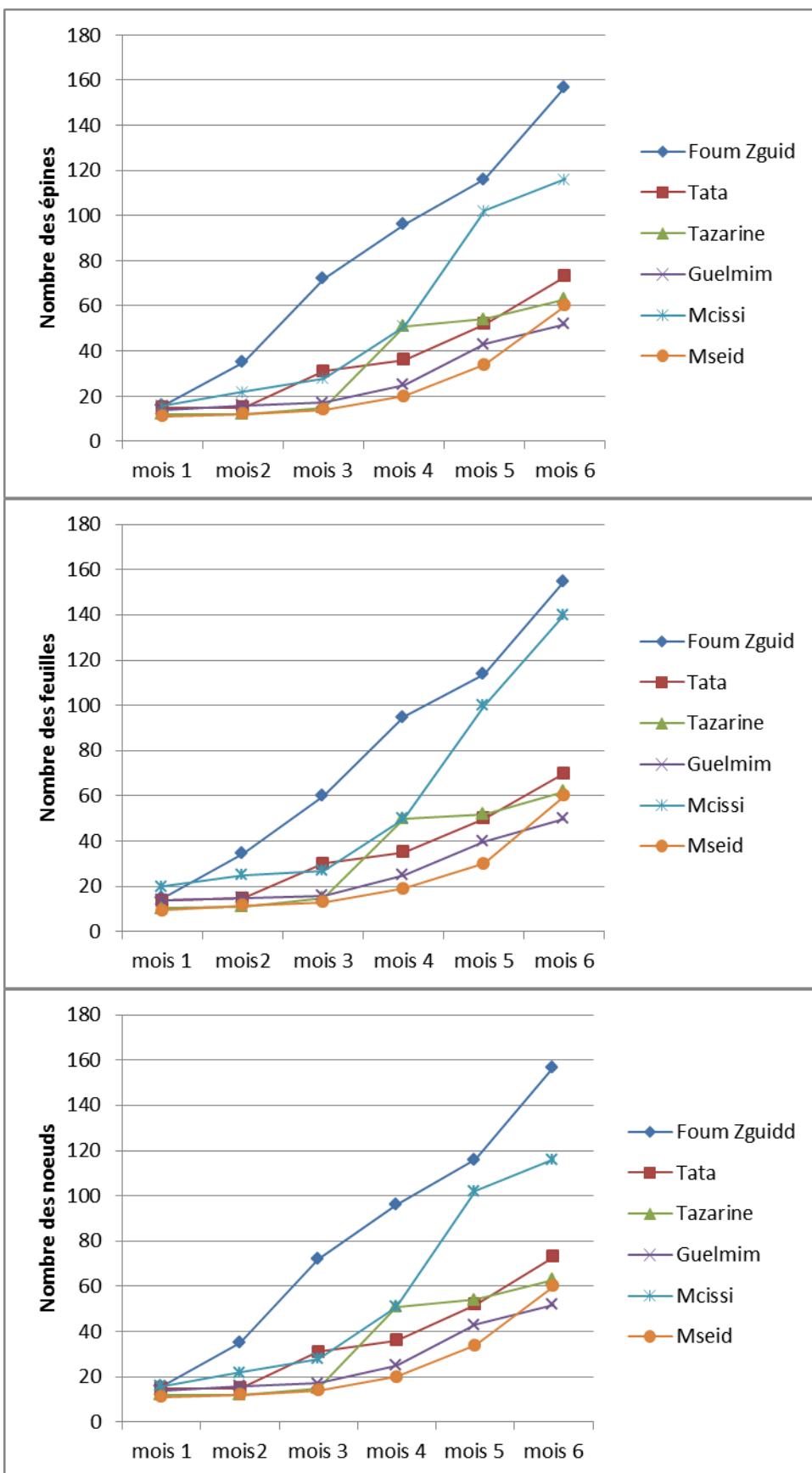


Fig.9.. Comparaison de la vitesse de croissances chez les six provenances durant six mois pour le nombre d'épines, de feuilles et des nœuds.

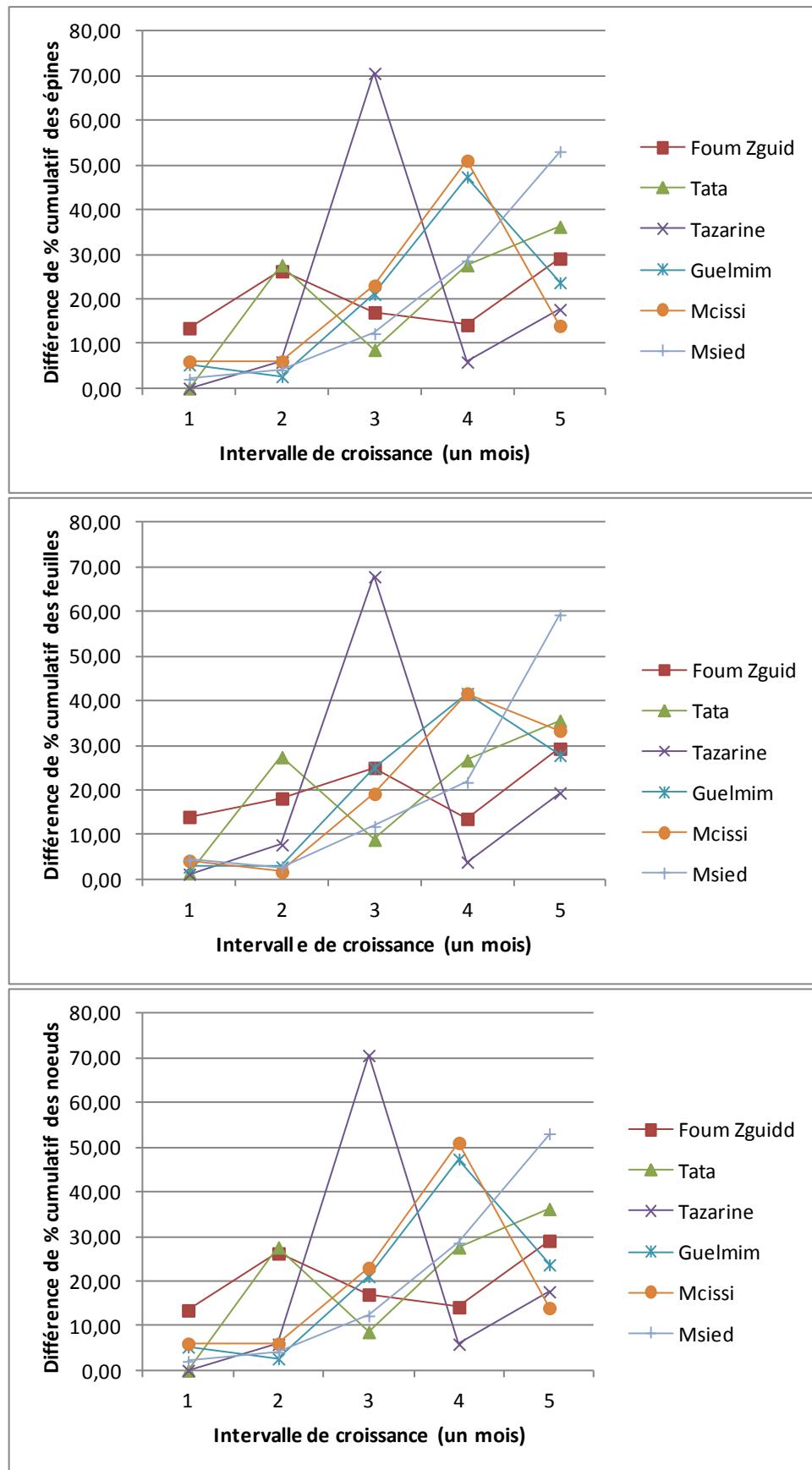


Fig.10. Comparaison du taux de croissance des plants pendant six mois.

au premier mois, il a remonté à 25 % au troisième mois, pour redescendre à 13,47 % au quatrième mois et remonter encore une fois à 25 %. Le même patron est adopté par les autres provenances pour le développement des feuilles, nœuds et des épines.

I.1.1.1. Effet de la provenance sur la croissance des plants

L'analyse de la variance (Tableau 5) montre que le facteur provenance est très hautement significatif pour les caractères nombre de feuilles, de nœuds et d'épines. Le classement des moyennes par le test de Newman et Keuls à 5 % (Tableau 6) montre que les plants issus de Foum Zguid sont les mieux classés, suivi de ceux de Mcissi. Ces deux provenances paraissent avoir une production en biomasse au moins deux fois plus importante que les quatre autres provenances (fig.11).

Les génotypes originaires des descendances de Foum Zguid et Mcissi peuvent être considérés comme vigoureux, leur suivi dans le temps et dans l'espace (différents sites) après transplantation pourrait servir pour la sélection des individus élités. À l'heure actuelle, il est encore prématué de considérer les autres caractères (Longueur de la tige, diamètre au collet, nombre de ramifications, taille moyenne des épines) comme non discriminants, étant donné qu'une période de six mois reste insuffisante pour avoir des différences notables, les corrélations juvéniles adultes nécessitent une période d'étude plus importante.

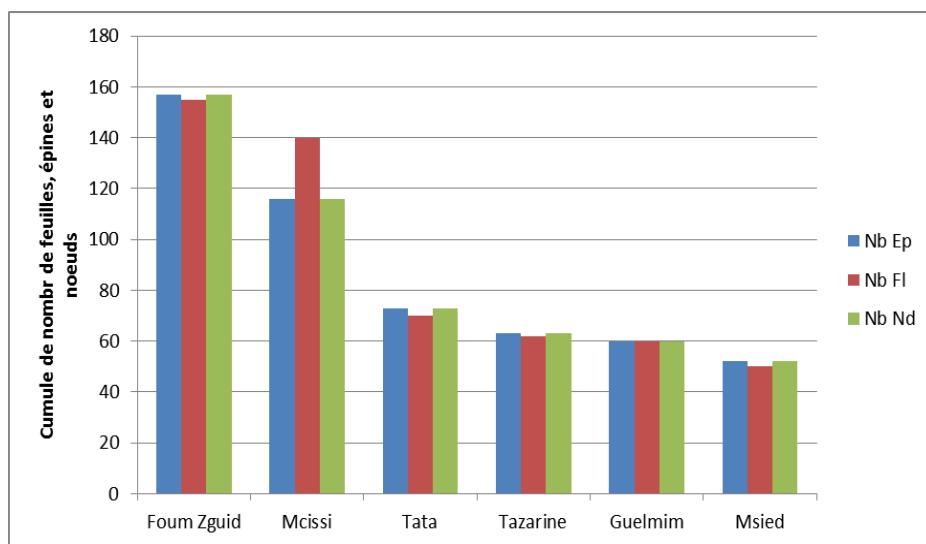


Fig.11. Cumul en nombre de feuilles, épines et des nœuds chez les six provenances. Nb Ep : Nombre des épines, Nb Fl : Nombre des feuilles, Nb : Nombre des nœuds.

Tableau 5. Analyse de la variance pour le facteur provenance en relation avec les caractères de croissance au stade plantule

	Effet de provenance	
	F	P-valeurs
Longueur de la tige (StL) en cm	0,28	0,38
Diamètre au collet (DC) en mm	0,753	0,15
Nombre de feuilles (NbLv),	12,91	<0,001
Nombre de nœuds (NbNd),	13,66	<0,001
Nombre d'épines (NbP)	13,66	<0,001
Taille moyenne des épines (ASP).	0,94	0,33

Tableau 6. Comparaison des moyennes par le test de Newman et pour les caractères ayant une différence significative (nombre de feuilles, de nœuds et des épines)

	Foum zguid	Tata	Tazarine	Guelmim	Mcissi	Msied
Nombre de feuilles	155 ^b	70 ^a	62 ^a	50 ^a	140 ^b	60 ^a
Nombre des noeuds	157 ^c	73 ^a	63 ^a	52 ^a	116 ^b	60 ^a
Nombre des épines	157 ^c	73 ^a	63 ^a	52 ^a	116 ^b	60 ^a

Tableau 7. Pourcentage de variation avec définition des axes de l'analyse canonique discriminante pour les six provenances *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana*

	Axe 1	Axe 2
Valeur propre	11,7	2,79
Proportion de la variance	78 %	18 %
	NbLv (0,69)	
Les variables définissant les axes et leurs corrélations	NbNd (0,68)	ASP (0,29)
	NbP (0,68)	

I.1.2. Analyse canonique discriminante ADC

L'analyse canonique discriminante a été appliquée sur les données du sixième mois. Le tableau 7 donne les pourcentages de variation et les paramètres qui contribuent le plus à la définition des deux premières composantes canoniques. Ainsi, on trouve que la première composante est définie par le nombre de feuilles, des épines et des nœuds présentant 78 % de l'inertie, et la deuxième composante est définie par la taille moyenne des épines qui absorbe 18 %. Ces deux axes rendent compte de la plus grande partie de la dispersion, puisqu'elles absorbent 96 % de la variabilité totale.

La représentation graphique (figure. 12) révèle un chevauchement plus ou moins marqué entre les polygones de dispersion représentant les six provenances. La composante canonique 1 oppose les populations Foum Zguid et Mcissi qui possèdent un nombre de feuilles important, par rapport au reste des provenances. La composante canonique 2 représente 18 % seulement de la variation totale. Elle permet de distinguer la provenance Foum Zguid caractérisée par une taille moyenne d'épines la plus basse que celle de Mcissi.

Foum Zguid présente les moyennes les plus importantes pour les variables discriminantes canoniques (NbLv, NbNd et NbP), en formant le premier groupe, cela pourrait s'expliquer par une adaptation d'*Acacia tortilis subsp raddiana* à la forte aridité de ce milieu par rapport aux autres provenances. La sécheresse du sol permettrait aux racines de s'allonger en profondeur, pour arriver aux horizons les plus humides (Grouzis and Le Floc'h, 2003). Par ailleurs, ce caractère pourrait être dû à l'influence de l'environnement d'une part sur la sélection des génotypes les plus vigoureux, les plus résistants et les plus aptes de subsister dans un microclimat stressant et d'autre part sur l'expression du génotype, menant à des changements dans la répartition des hormones de croissance dans la plante (Segura et al., 2004). En effet, la présence d'un nombre de feuilles plus élevé permettrait aux plants de synthétiser plus de matière organique ce qui faciliterait ainsi leur croissance (Sanon, 2009). La provenance de Mcissi montre une dispersion la plus importante ce qui indique une variabilité intraprovenances très marquée au sein de cet écotype.

Le troisième groupe forme une hétérogénéité continue entre les individus des quatre écotypes restants qui sont : Tazarine, Msied, Tata et Guelmim, ce groupe se caractérise par les moyennes les plus basses pour toutes les variables analysées. Ceci pourrait s'expliquer par le mode de reproduction chez l'espèce *Acacia tortilis subsp raddiana* qui est de type allogamie, ce dernier est capable de créer des variétés identiques, même avec un éloignement entre les provenances étudiées.

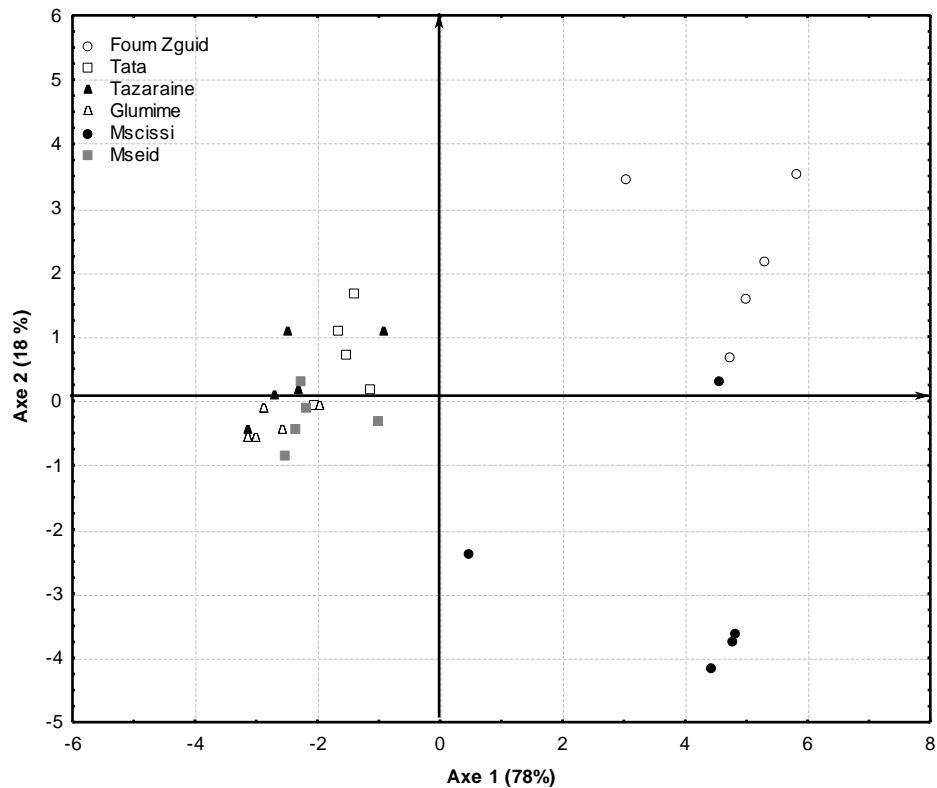


Fig.12. Analyse canonique des paramètres de croissance : cumul du nombre de feuilles, des nœuds, des épines et la taille moyenne des épines des six provenances étudiées Foum Zguid, Tata, Tazarine, Guelmim, Mcissi et Msied.

II. Conclusion

Les résultats relatifs aux tests de germination ont montré que la méthode la plus efficace pour lever la dormance tégumentaire chez *Acacia tortilis* subsp *raddiana* consiste au trempage des graines dans l'acide sulfurique 99 % pendant une heure. La scarification mécanique à l'aide du papier abrasif a donné également de bons résultats.

La germination des graines a été réalisée à une température de 25 °C, avec une incubation à l'obscurité, ce qui reflète le caractère non photosensible des graines. Une différence très hautement significative a été démontrée par l'analyse de variance pour le facteur provenance et traitement. Les meilleures moyennes du % de germination ont été notées pour la provenance de Msied, Foum Zguid et Mcissi avec successivement 97 %, 92 % et 99 % pour le prétraitement à l'acide sulfurique et 99 %, 95 % et 84 % pour le prétraitement avec du papier de verre.

L'acide sulfurique est un acide fort, il dégrade les téguments en augmentant ainsi leur perméabilité, ce qui rend le processus de germination plus rapide. Cependant, son usage peut se révéler dangereux, l'application de cette technique en pépinière reste difficile et non recommandée, ce qui rend son application limitée. Cette méthode peut être réalisée dans des laboratoires spécialisés. La scarification mécanique à l'aide du papier verre, quant à elle, peut s'appliquer sans danger et les moyens utilisés ne requièrent pas de compétence particulière et sont à la portée. Cette technique peut être recommandée pour la production de plants à faible coût. La scarification par l'eau bouillante, qui a prouvé son efficacité pour quelque espèces d'*Acacia* reste la technique la plus rapide, mais chez *Acacia tortilis* subsp *raddiana* son rendement était le moins satisfaisant.

Nous avons conclu, également que les populations avec des taux de germination similaires, peuvent différer pour leur cinétique. D'un autre point de vue, les provenances qui donnent des taux de germination importants ne sont pas forcément corrélées à la vitesse de leur croissance après transplantation. Ainsi, la provenance de Msied qui a donné un pourcentage de germination de l'ordre de 97 % pour le traitement chimique et 99 % pour le traitement mécanique, possède une croissance faible représentée par les plus faibles cumuls de feuilles, de nœuds et des épines.

Le suivi de la croissance des plants pendant six mois est marqué par un démarrage avec la même vitesse, mais dès le deuxième mois, ils commencent à se distinguer. En conséquence, nous avons trouvé que la provenance de Guelmim qui a présenté des taux de germination faibles a développé une biomasse la meilleure par rapport à Msied, et Tazarine qui ont donné des taux de germination importants. Toutefois, d'autres provenances gardent des niveaux élevés à la fin pour leur taux de germination et de leur vigueur au stade pépinière. Ainsi, la provenance de Mcissi a gardé le même comportement avec la meilleure capacité de germination et de croissance. De ce fait, on peut qualifier la provenance de Mcissi comme étant la meilleure provenance suivie par Foum Zguid pour les programmes de conservation et de sélection afin de boisser les espaces dégradés.

C. Chapitre 2

Quantification de la variation morphométrique des gousses *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana*

Résumé

Dans le but de la caractérisation du polymorphisme des fruits (gousses) chez les acacias sahariens (*Acacia tortilis* subsp *raddiana*) du Maroc, une étude comparative au sein et entre dix provenances (Mecissi Tazarine, Agdz, N'koub, Foum Zguid, Tata, Tissint, Assa, Gluemim, et Msceid) a été réalisée. En plus de la détermination de la forme des gousses échantillonnées, huit caractères biométriques ont été mesurés sur deux compagnes successives (2009 et 2010) : longueur de la gousse (LNGS) ; largeur de la gousse (LRGS) ; poids de la gousse (PGS) ; poids des graines de la gousse (PGR) ; poids de la gousse sans graine (PGS-PGR) ; nombre de graines par gousse (NGR/GS) ; nombre de graines infestées par gousse (NGRIf/GS) ; poids de 100 graines (P100GR).

Les résultats obtenus montrent que six formes de base ont été déterminées au niveau de la gousse (allongée, spiralée, ondulée, ronde, arquée et ressort) avec une nette dominance de la forme arquée. Pour les deux années d'étude, Tazarine, N'koub et Tissint présentent les valeurs moyennes les plus élevées pour la majorité des caractères étudiés. Les valeurs du coefficient de variabilité phénotypique (PCV) les plus faibles sont notées pour le caractère largeur de la gousse (LRGS) avec environ 12,5 % pour les deux années. Les valeurs les plus élevées pour le PCV ont été notées pour le nombre de graines infectées par gousse avec successivement 64,48 % (année 1) et 65,02 % (année 2). Les coefficients de variation génotypique (GCV) ont montré des tendances similaires à celles des coefficients de variation phénotypique (PCV). En ce qui concerne l'héritabilité au sens large, 92,75 % et 92,63 % pour le poids de 100 graines ont été enregistrés successivement pour l'année 1 et 2. D'après les analyses de variance et leur décomposition, selon les caractères, on peut opter dans la stratégie de gestion de la conservation de la diversité et dans la sélection soit pour le facteur arbre (i.e., poids de la gousse, poids de 100 graines) ou provenance (i.e., Longueur de la gousse, nombre de graines par gousse et nombre de graines infectées par gousse).

Mots clés : *Acacia tortilis* subsp *raddiana* – Variabilité - Gousses - Analyse de variance-coefficient de variation génotypique - coefficient de variation phénotypique – héritabilité

Introduction

Une population est composée d'un ensemble d'individus de la même espèce, ces individus occupent un habitat défini par des frontières géographiques. Elle présente une structure définie par ses structures spatiales et génétiques ainsi que par son taux de natalité et de mortalité. La structure spatiale comprend la densité, la taille, la distance de mouvement de ses individus, l'aire de répartition de ses espèces. La structure génétique quant à elle, mesure la variation génétique intra et inter populations (Ricklefs *et al.*, 2005).

On entend par variabilité génétique d'une population la mesure des différences génétiques entre les individus qui la composent. Ces différences génétiques génèrent des phénotypes multiples. Les variations phénotypiques se manifestent de deux manières, il s'agit soit de variations discontinues contrôlées par un nombre limité de gènes, on parle dans ce cas de caractères qualitatifs ou mendéliens, soit de variations continues reconnues sous le nom de caractères quantitatifs ou adaptatifs qui sont généralement contrôlés par un grand nombre de gènes et par la variation du milieu. Le terme de « variabilité génétique » est réservé aux caractères quantitatifs tandis que le terme « diversité génétique » est utilisé pour les caractères qualitatifs (Nanson 2004). L'intérêt de la variabilité génétique découle de son importance dans la sélection et l'évolution. Sa mesure permet d'évaluer la capacité d'une population à s'adapter aux changements environnementaux. Ainsi, une population avec une variabilité génétique importante garantit sa durabilité dans le temps, car sa variabilité lui permet d'évoluer rapidement en s'adaptant aux nouvelles contraintes environnementales. La variabilité génétique est donc sous le contrôle combiné des conditions environnementales et du génotype (Via *et al.*, 1985).

Des méthodes simples permettent de calculer la variabilité génétique : l'écart-type, la variance ou le coefficient de variation (écart-type / moyenne), l'ANOVA à deux facteurs permet de comparer deux ou plusieurs génotypes développés dans les mêmes conditions environnementales. L'ANOVA permet de calculer trois composantes : variance due au génotype (G), variance due à l'environnement (E), et la variance due à l'interaction des deux (G x E) (Schlichting 1986). Il faut distinguer entre la variabilité génétique qui décrit les variations au niveau d'un groupe et la plasticité phénotypique qui décrit les variations au niveau individuel.

Plusieurs études se sont intéressées à l'évaluation de la variabilité génétique dans le but de l'exploiter dans la sélection de caractères à intérêt économique et/ou écologique. Parmi les caractères étudiés, on peut citer le nombre de fleurs et de gousses par plante de soja, ces caractères présentent les traits agronomiques les plus importants pour la production des semences (Zhang *et al.*, 2010). Il s'est avéré que les conditions environnementales telles que la latitude et les températures basses influencent le développement des gousses chez le soja (Ohnishi *et al.*, 2010). Chez le colza d'hiver, le nombre de gousses et de graines par gousse et par plante constituent les composantes de rendement les plus variables, ainsi, le nombre d'ovules par gousse et le potentiel des ovules à se développer en une graine mûre peut dépendre de la position de gousse dans l'architecture des plantes et du moment de leur apparition (Wang *et al.*, 2011). Pour *Acacia senegal* (L.) Willd une étude s'est intéressée à la variation quantitative dans le but de caractériser les régions les plus susceptibles d'être désignées comme une source de semence pour la conservation du matériel génétique, sélection pour domestication et production de la gomme arabique (Chiveu *et al.*, 2009).

Cette partie a pour but de déterminer la variabilité morphologique des gousses d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana*, dans le domaine saharien du Maroc. Nous cherchons, ainsi, à mettre en évidence l'étendue et le potentiel de la variabilité génétique des gousses d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana*, l'adaptabilité intra et inter populations caractérisées par des conditions climatiques et édaphiques spécifiques et, enfin, de chercher si la variabilité des gousses peut constituer un trait agronomique.

I. Matériel et méthodes

I.1. Sites d'échantillonnages

Cette étude a pour objectif la caractérisation morphologique des gousses d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* de quelques régions sahariennes du Maroc. La variabilité morphologique a été étudiée chez les gousses matures par des mesures biométriques et des évaluations qualitatives des caractères illustrés dans le tableau 8.

Les caractères biométriques ont été étudiés chez dix provenances ; Agdz, N'Koub, Tazarine, Mcissi, Tata, Tissint, Foum Zguid, Guelmim, Msied, et Assa (fig.13, tableau 9).

Au Maroc, le domaine saharien se caractérise par des conditions climatiques très sévères ; les précipitations ne dépassent pas les 100 mm et se caractérisent par leur extrême

variabilité (Hübener, Schmidt et al. 2005 ; (Klose *et al.*, 2008). Les variations de température sont très larges et le taux de l'évaporation est très important (2000- 3000 mm/an).

Tableau 8. Présentation des caractères quantitatifs étudiés

Variable	Abréviation
Longueur de la gousse	LNGS (cm)
Largeur de la gousse	LRGS (mm)
Poids de la gousse	PGSp (g)
Poids des graines/ Gousse	PGR/GS (g)
Poids de la gousse vide	(PGS - PGR)(g)
Nombre de graines/Gousse	NGR/GS
Nombre de graines infectées/Gousse	NGRI/GS
Poids de 100-graines	P100 GR

Tableau 9. Caractéristiques géographiques des sites de collection des gousses.

Province	Provenance	Altitude (m)	Latitude	Longitude
Zagora	Agdz (1)	834	30°45' N	5°30' W
	N'kob (2)	960	30°50' N	5°44' W
	Tazarine (3)	1100	30°42' N	6°31' W
	Foum Zguid (4)	743	30°13' N	6°51' W
Errachidia	Mecissi (5)	820	31°13' N	4°48' W
Tata	Tissint (6)	676	29°51' N	7°30' W
	Tata (7)	630	29°43' N	7°57' W
Guelmim	Guelmim (8)	527	28°48' N	9°27' W
Tan Tan	Msied (9)	249	28°02' N	10°50 W
Assa-Zag	Assa (10)	385	28°42' N	9°14' W

I.2. Technique d'échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé au mois de juillet sur deux années successives (2009 et 2010). Dans chacune des 10 provenances 10 arbres ont été échantillonnés. Afin de minimiser le risque d'échantillonnage d'individus étroitement apparentés nous avons respecté un

espace de 100 m entre les arbres dans chaque station. Sur chaque arbre nous avons récolté cent gousses dont 30 ont fait l'objet des mesures quantitatives.

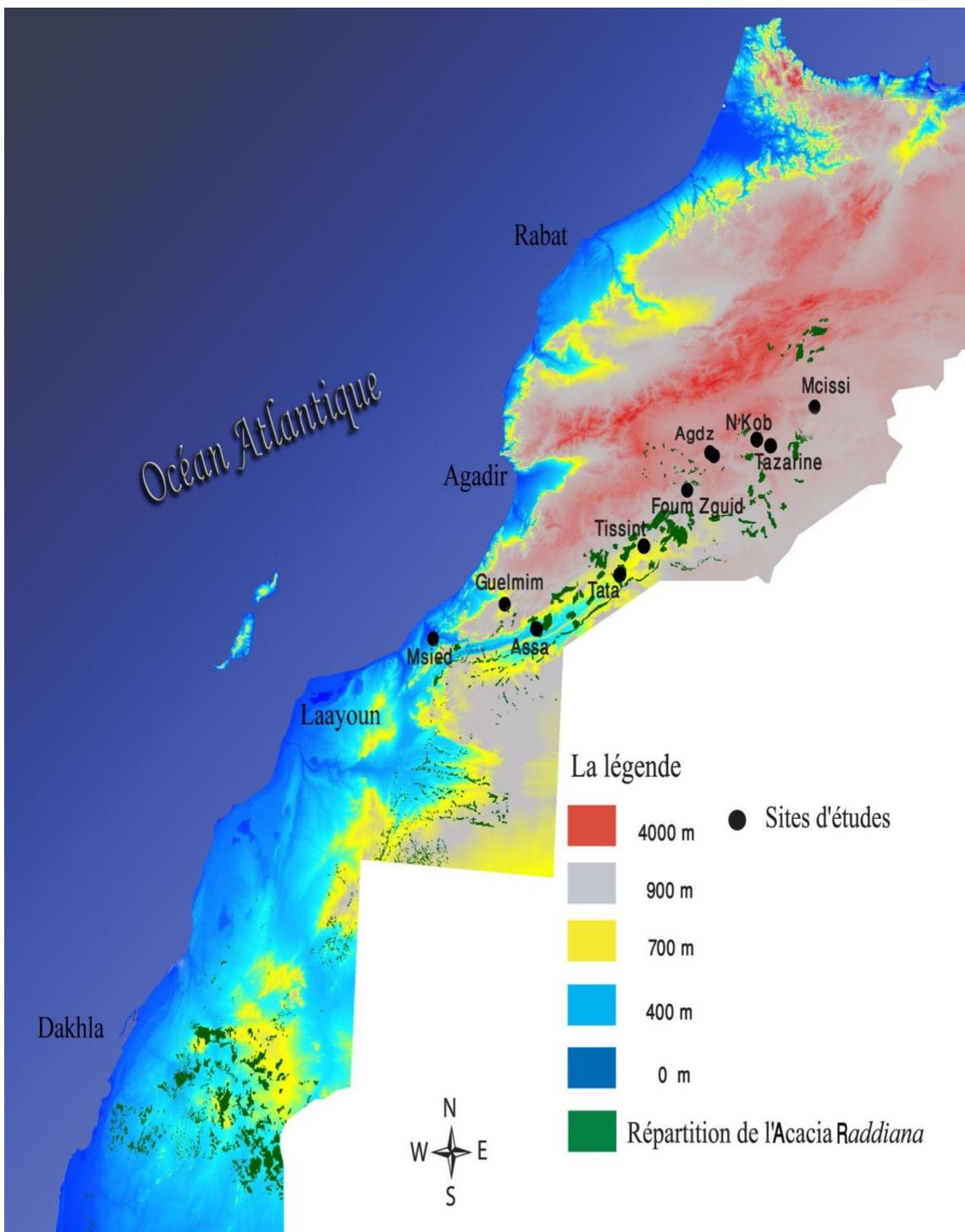


Fig.13. Carte des sites d'étude *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana*.

I.3. Variabilité morphologique

I.3.1. Biométrie des gousses

Chaque arbre a été défini par huit caractères morpho-métriques : longueur de la gousse LNGS (cm) ; largeur de la gousse LRGS (mm) ; poids de la gousse PGS (g) ; poids des graines de la gousse PGR (g) ; poids de la gousse vide PGS-PGR (g) ; nombre de graines par gousse NGR/GS ; nombre de graines infestées par gousse NGRIIf/GS ; poids de 100 graines P100 GR (g) compté sur des graines saines Fig.. 14.

Une graine est considérée infestée lorsqu'elle présente un orifice visible à l'œil nu, orifice encore fermé, ou quand elle est noire (figure. 15 et 16).

I.1.1. Forme des gousses

Les gousses ont été également caractérisées par leur forme, en effet, l'observation des gousses à l'œil nu a permis de repérer un niveau élevé de polymorphisme morphologique, ce qui nous a incités à étudier ce caractère.

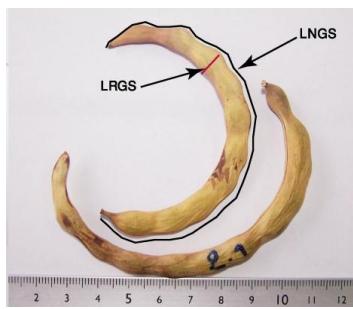


Fig.14. Mesure de la longueur et largeur de la gousse.

Fig.15. Graine infectée collée sur l'épiderme



Fig.16 Graines infectées.

I.2. Méthode d'analyse des données

I.2.1. Structure de la variation phénotypique

Les données biométriques et des paramètres de génétique quantitative sont analysés sur deux ans à l'échelle uni et multivariable, à différents niveaux de structuration des arbres (intra et interprovenances) (El Ayadi *et al.* 2012 ; El Ayadi *et al.*, 2011). D'abord, une analyse statistique descriptive a été appliquée : la moyenne, l'intervalle de variation, la déviation standard et le coefficient de variation ont servi à caractériser la tendance centrale et la dispersion de chacun des traits mesurés. La recherche d'une structure au sein d'un ensemble d'individus peut s'effectuer par le calcul de paramètres de corrélation. Ces paramètres sont ensuite utilisés dans les méthodes de classification des provenances. La structure de la variation phénotypique a été examinée successivement par :

- 1) L'analyse du degré d'association entre les différents caractères morpho-métriques, à travers le calcul du coefficient de corrélation de Person.
- 2) Une analyse de variance hiérarchique « ANOVA » séparant la variance observée en trois niveaux : entre provenances, entre arbres-mères au sein des provenances et à l'intérieur des arbres-mères.
- 3) Une analyse en composantes principales (ACP).

Les méthodes d'analyse multivariées ont été utilisées pour confirmer les patrons de classification des populations en accord avec l'ensemble des caractéristiques évaluées. Cette classification a pour objectif de déterminer si les entités échantillonnées (provenances) se différencient dans des groupes homogènes en accord avec leur origine, s'il existe une tendance à la différenciation.

Pour chacun des caractères mesurés, une matrice de données a été élaborée, dans laquelle chaque caractère constitue une variable et chaque gousse une unité d'observation. Ces matrices de données ont été utilisées pour calculer les statistiques descriptives et faire l'analyse de variance hiérarchique.

Pour les analyses multivariées (ACP), des matrices de moyennes par provenance ont été créées, dans le but de diminuer l'effet des différentes échelles et unités de mesure de chaque variable.

L'ensemble de ces analyses a été réalisé par le programme Statistica version 6.0 et Excel 2007.

I.2.1.1. Analyse de variance hiérarchique

Pour l'analyse de la structure de la variation phénotypique, on a considéré un modèle d'ANOVA hiérarchique à effet aléatoire, dans lequel les dix provenances testées représentent un échantillon aléatoire des populations présentes sur la zone d'étude et, pareillement, les arbres-mères collectés constituaient un échantillon aléatoire des individus présents dans chaque provenance.

L'analyse de variance (ANOVA), qui est une extension du test de comparaison des moyennes, elle s'intéresse à plus de deux groupes indépendants. Ce seront les écarts de la variance à la moyenne des populations étudiées qui permettront d'évaluer la pertinence de la séparation. La comparaison de la variance inter-provenance et intraprovenance permettra d'obtenir une statistique suivant la loi de Fisher-Snedecor qui servira à juger l'importance des différences entre les échantillons étudiés. Pour déterminer les différences entre les provenances, nous avons utilisé le test Duncan qui va comparer par paire les groupes retenus.

Elle a été réalisée par la procédure Statistica version 6 avec le modèle statistique suivant

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta(\alpha)j(i) + \varepsilon_k(ij)$$

Y_{ijk} = une observation

μ = moyenne générale

α_i = effet de la i-ème provenance

$\beta(\alpha)j(i)$ = effet emboîté du j-ème arbre dans la i-ème Provenance

$\varepsilon_k(ij)$ = effet aléatoire de la résiduelle

Avec un modèle à effet aléatoire, la structure de l'analyse de variance pour la décomposition de la variation phénotypique est celle présentée dans le Tableau10.

Tableau 10. Analyse de variance hiérarchique à trois niveaux

Source de variation	dl	CM	ECM
Saison	1	CM _s	$s^2 + 30s_{s*t/p}^2 + 3000s_s^2$
Provenance	9	CM _p	$s^2 + 60s_{t/p}^2 + 3000s_s^2$
Saison * Provenance	9	CM _{s*p}	$s^2 + 30s_{s*t/p}^2 + 300s_{s*p}^2$
Tree / Provenance	90	CM _{a/p}	$s^2 + 60s_{t/p}^2$
Saison*Tree/Provenance	90	CM _{s*a/p}	$s^2 + 30s_{s*t/p}^2$
Saison*Tree/Provenance*Echant	5800	CM _e	s^2

Carré moyen = CM

Degré de liberté = dl

Espérance des carrés moyens = ECM

Pour chacune des provenances, le même modèle d'ANOVA hiérarchique a ensuite permis de subdiviser la variation intraprovenance en variance inter-arbres et variance intra-arbre

Le test de Levene a été utilisé pour comparer la variabilité intra-arbre d'une même provenance. Si le test de Levene est statistiquement significatif ($P < 0.05$), l'hypothèse d'homogénéité des variances intra-arbre au sein de la provenance doit être rejetée et par suite faire appel à une transformation des données. Ce test est robuste quand les effectifs des groupes à comparer sont égaux, ce qui est le cas de notre étude.

I.2.1.2. Estimation des paramètres génétiques

Les analyses de génétique quantitative ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistica version 6. Les caractères mesurés suivent une distribution normale.

Comme les variances sont supposées indépendantes, la variance phénotypique totale σ^2_p a été calculée comme suit (Nanson 1970 ; Jacques *et al.*, 2004) :

$$\sigma^2_p = \sigma^2_G + \sigma^2_E$$

La variation de chaque caractère a été exprimée par le coefficient de variation phénotypique, le coefficient de variation génotypique et l'héritabilité au sens large calculé comme suit :

$$CVP = \frac{\sigma_P}{\bar{X}}, CVG = \frac{\sigma_G}{\bar{X}} \text{ et } h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_P^2}$$

Pour estimer les corrélations phénotypiques et génotypiques (r_P et r_G respectivement), une analyse bivariée a été réalisée. Ainsi, r_P et r_G ont été estimés comme suit :

$$r_P = \frac{cov_P(x,y)}{\sqrt{\sigma_{Px}^2 \cdot \sigma_{Py}^2}} \quad r_G = \frac{cov_G(x,y)}{\sqrt{\sigma_{Gx}^2 \cdot \sigma_{Gy}^2}}$$

I.2.1.3. Calcul du gain génétique

Les gains génétiques attendus pour les caractères étudiés ont été obtenus en utilisant l'équation (Nanson 2004 ; Jacques *et al.* 2004) :

$$\Delta G = ih_x^2 \cdot \sigma_{Px}$$

Où x fait référence au caractère sélectionné, h^2x est l'héritabilité au sens strict de ce caractère, i est l'intensité de sélection, σ_{Px} est l'écart type de la mesure du caractère dans la population.

Dans le cas d'une étude des caractères d'une population dans son état naturel, et dont le but de réaliser une comparaison rapide des caractères qui peuvent être sélectionnés, la différentielle de sélection standardisée est égale à 1. Ce principe est adapté aux espèces forestières longévives (i.e., Bani-Aameur *et al.*, 2001 ; Nanson 2004 ; Ait Aabd *et al.*, 2011) ainsi l'équation devient :

$$\Delta G = h_x^2 \cdot \sigma_{Px}$$

I.2.1.4. Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales permet de visualiser des données quantitatives, l'analyse factorielle des correspondances multiples, quant à elle, elle permet de mettre en évidence des données qualitatives. Nos données étant quantitatives, nous avons donc utilisé une analyse en composantes principales. Elle est utilisée à titre exploratoire en tant que technique d'analyse multidimensionnelle descriptive, elle vise à résumer l'information

contenue dans un ensemble de variables selon un certain nombre d'axes factoriels. Ces axes, appelés facteurs, correspondent à des combinaisons linéaires des variables initiales. L'objectif est de maximiser le pourcentage de variance de l'information initiale prise en compte par les facteurs.

À partir de la matrice de données, une matrice de corrélation a été calculée entre variables et on a obtenu les vecteurs propres permettant d'identifier les caractères les plus importants pour la différenciation morphologique dans chacune des composantes principales. Les provenances ont ensuite été projetées dans l'espace des deux premières composantes principales.

II. Résultats et discussion

II.1.Statistique descriptive des variables quantitatives

La moyenne, le coefficient de variation, écart type des différents traits observés lors des deux années d'essai sont présentés dans le tableau 11. Des variations importantes sont apparues pour tous les traits considérés, ainsi qu'entre les provenances et les deux saisons d'étude.

Les traits morphologiques relatifs à la largeur de la gousse et au poids de 100 graines sont régulièrement les moins variables, ils correspondent respectivement à 12 % et 20 %. Les coefficients de variation du nombre de graines infectées sont supérieurs à 70 % pour les deux saisons avec des valeurs de 87,16 % et 73,53 % respectivement pour la première et la deuxième saison. Les autres caractéristiques morphologiques de la gousse présentent des niveaux intermédiaires de variabilité, entre 26 et 39 %.

Les niveaux de variation sont très comparables entre les deux années d'étude, les valeurs de la moyenne, les minimums et les maximums révèlent que les deux années étaient similaires dans leurs conditions climatiques.

Tableau 11. Statistique descriptive des caractères biométriques de la gousse pour deux saisons

Variables	Saison	Moyenne	Minimum	Maximum	Varianace	Ecart type	Coefficient de variation %
Longeur de la gousse	1	13,14	1,36	28,20	12,17	3,49	26,55
	2	13,12	3,60	27,00	11,79	3,43	26,18
Largeur de la gousse	1	7,4	3,97	11,08	0,85	0,92	12,44
	2	7,33	3,97	11,08	0,88	0,94	12,83
Poids de la gousse	1	1,1	0,14	2,97	0,14	0,38	34,35
	2	1,08	0,25	2,97	0,14	0,37	34,06
Poids des graines/ Gousse	1	0,44	0,03	1,29	0,03	0,17	39,28
	2	0,42	0,03	1,16	0,03	0,16	39,03
Poids de la gousse vide	1	0,65	0,06	2,26	0,06	0,25	38,84
	2	0,66	0,06	2,04	0,06	0,25	38,17
Nombre des graines/Gousse	1	7,59	1,00	15,00	4,46	2,11	27,81
	2	7,5	1,00	15,00	4,30	2,07	27,66
Nombre de graine infectée/Gousse	1	3,78	0,00	13,00	9,25	3,04	80,44
	2	3,85	0,00	13,00	8,01	2,83	73,52
poids de 100-graines	1	6,56	3,16	11,00	1,64	1,28	19,53
	2	6,68	3,40	11,00	1,85	1,36	20,34

L’interaction des deux années présente les mêmes tendances de variation que présente chaque année indépendante, de plus le calcul de l’indice de l’intensité des effets (R^2) que le génotype exerce plus de 30 % d’effet sur l’ensemble de l’inertie observée au sein des provenances (fig.17), cette intensité intra-provenance augmente à plus de 40 % lors de sa combinaison avec le facteur saison et ceci pour la majorité des caractères étudiés. Le caractère nombre de graines infectées par gousse échappe à cet effet, on a observé que l’effet du facteur provenance sur la variation dépasse les 39 % et 30 % pour l’effet du facteur saison. Ceci trouve son explication du fait que des études (Ernst *et al.*, 1989 ; Barnes 2001 ; Grouzis *et al.* 2003a) ont démontré que le taux d’infestation des graines *Acacia* varie beaucoup entre les génotypes de la même provenance et du même génotype entre deux années différentes (fig.18).

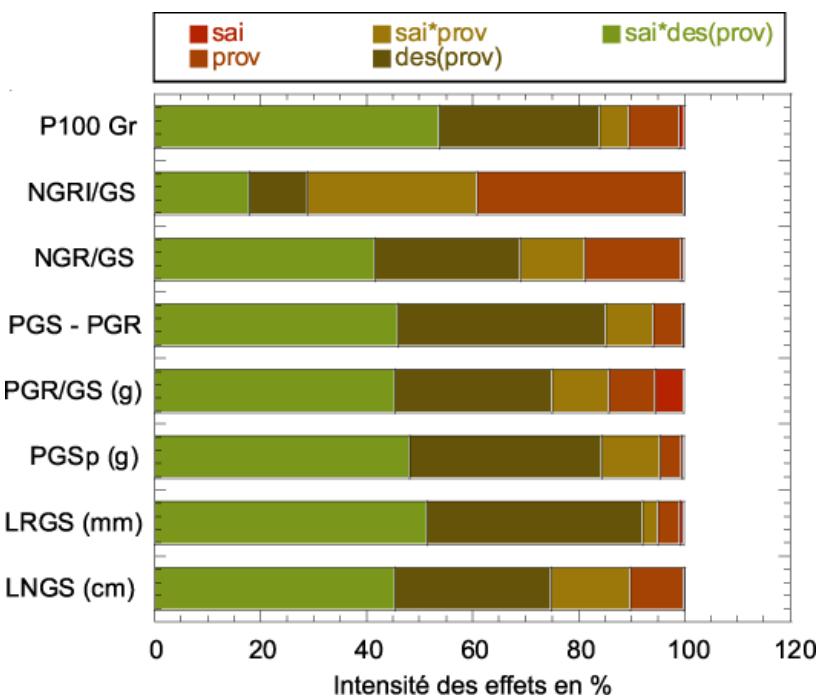


Fig.17. Intensité des effets saison, provenance, génotype et leur interaction sur l'inertie totale.

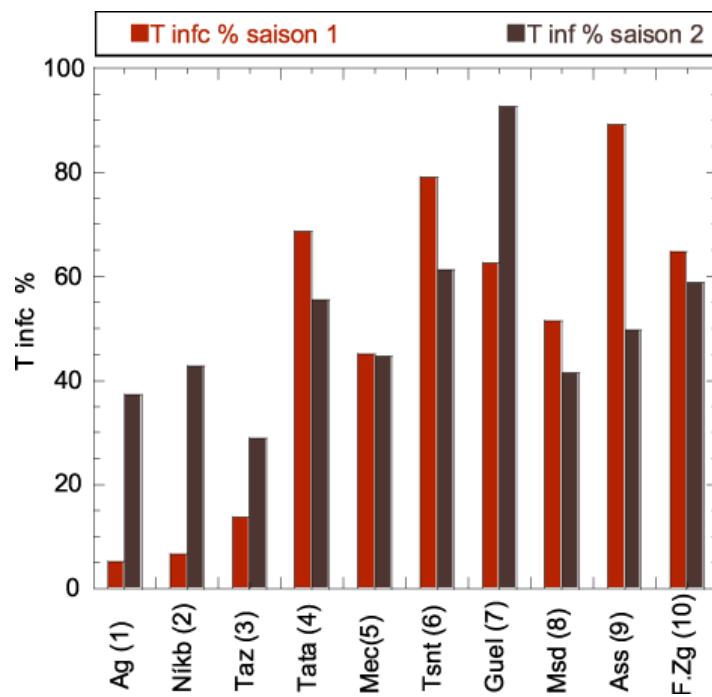


Fig.18. Taux d'infestation des graines entre les provenances des deux saisons Ag :Agdz, N'kb : N'Koub, Taz : Tazarine, Tata : Tata, Mec : Mcissi, Tsnt : Tisint, Guel : Guelmim, Msd : Msied, Ass : Assa, F.Zg : Foum Zguid.

II.2. Analyse de corrélation entre les traits morphologiques

Les coefficients de corrélation entre les différents traits observés chaque année sont présentés dans le tableau 12. La plupart des traits liés à la taille de la gousse (poids de la gousse, poids des graines de la gousse, poids de la gousse vide et nombre de graines par gousse) ont une corrélation positive avec la longueur de la gousse. En revanche, celle-ci reste indépendante de l'indice de qualité de la production en graine représentée dans notre étude par le poids de 100 graines non infectées. Dans les deux saisons, le poids de 100 graines présente une corrélation positive avec largeur de la gousse, poids de la gousse et le poids des graines de la gousse avec des valeurs de $r \geq 36$.

Les coefficients de corrélation les plus faibles ont été notés pour le nombre de graines infestées par gousse, ce qui montre qu'il n'y a aucun lien entre la qualité des traits de la gousse et l'infestation de ses graines. Bien que l'infestation des gousses *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* se produise dans une période très précoce de la floraison (Derbel *et al.* 2007), ceci n'altère pas le développement de la gousse (longueur, largeur, poids de la gousse) sauf pour le nombre de graines par gousse, la corrélation reste très faible avec une valeur moyenne de $r=0.31$

II.3. Structure de la variation phénotypique

L'importance relative des composantes inter-provenances, inter-génotypes et intra-génotype de la variance phénotypique était différente selon le trait considéré, et a montré un patron similaire entre les deux saisons (Fig.19).

La variation des traits morphologiques (LNGR, LRGS, PGS, PGR/GS et PGS-PGR) était dominée par les composantes : inter-génotypes et inter-gousses, le reste de leur variation est représenté par la composante entre provenances (sauf pour LRGS, pour laquelle la variation inter-provenances était presque nulle).

La variation du nombre de graines infestées par gousse est marquée par les composantes inter-provenances et inter-gousses. Le poids de 100 graines par gousse était le trait le plus fortement marqué au niveau des génotypes.

Tableau 12. Coefficient de corrélation Spearman entre les traits morphologiques observés dans les deux saisons.

saison 1 \ saison 2	LNGS (cm)	LRGS (mm)	PGSp (g)	PGR/GS (g)	PGS - PGR	NGR/GS	NGRI/GS	P100 Gr
LNGS (cm)		0,262***	0,804***	0,605***	0,787***	0,604***	0,224***	0,178***
LRGS (mm)	0,16***		0,472***	0,368***	0,452***	-0,007	0,009	0,432***
PGSp (g)	0,72***	0,48***		0,812***	0,927**	0,591***	0,166***	0,369***
PGR/GS (g)	0,61***	0,38***	0,85***		0,553***	0,639***	0,049	0,400***
PGS - PGR	0,68***	0,46***	0,93***	0,60***		0,463***	0,224***	0,276***
NGR/GS	0,67***	0,05	0,70***	0,71***	0,57***		0,349***	-0,100***
NGRI/GS	0,24***	0,01	0,15***	0,01	0,22***	0,28		-0,161***
P100 Gr	0,20***	0,47***	0,40***	0,50***	0,25***	0,05	-0,15	

La composante intra-génotype (inter-gousses) était plus importante que les composantes : inter et intra provenance pour la plupart des traits étudiés, sauf pour les caractères LRGS, NGRI/GS et le poids de 100 graines. La variation intra-génotype présente plus que 75 % de la variation totale pour le trait NGR/GS.

Deux groupes de traits semblent donc se distinguer :

- ✓ Ceux liés étroitement aux génotypes (arbre-mère): ils sont avant tout caractéristiques des génotypes eux-mêmes. Il s'agit des traits dont la variation intra-provenance dépasse les 60 % de la variation totale (poids de 100 graines saines, la largeur de la gousse).
- ✓ Ceux liés à la qualité de la gousse dominée par la variation intra-génotype (poids de la gousse, poids de graines par gousse, poids de gousse vide et nombre de graines infecté par gousse) : ils sont beaucoup plus dépendants du niveau gousse et liés aux conditions particulières de fécondation et d'infestation qui se déroule pendant la période de floraison, où les deux phénomènes se produisent avec des probabilités très différentes au sein du même génotype. Ce patron semble d'ailleurs bien illustré pour le trait nombre de graines infectées par gousse comme le suggère l'augmentation de la variance intra-génotype en saison 2.

Il ne s'agit donc pas à proprement parler de traits morpho-métriques de gousses qui sont liés, mais plutôt d'un résultat de deux phénomènes indépendants agissant étroitement sur la qualité de la gousse.

II.4. Variation inter-provenances

Des différences significatives existent entre les dix provenances *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* pour chacune des deux saisons (Tableau 13). Les traits LNGS, NGR/GS et NGRI/GS ont montré des différences inter-provenances significatives et stables entre les deux années d'études : Agdz, N'Koub, Tazarine suivie par Mcissi, Foum Zguid et Tissint ayant régulièrement les moyennes les plus élevées pour ces traits, à l'exception de Tissint qui présentait pour les deux saisons des taux d'infestations très élevés par rapport aux autres sites.

Les caractères PGS et PGS-PGR ont présenté des différences non significatives durant la première saison, ces mêmes caractères ont montré lors de la deuxième saison des

différences significatives. Alors que le caractère LRGS et le poids de 100 graines ont gardé, pendant les deux années d'étude, une différence non significative entre les provenances.

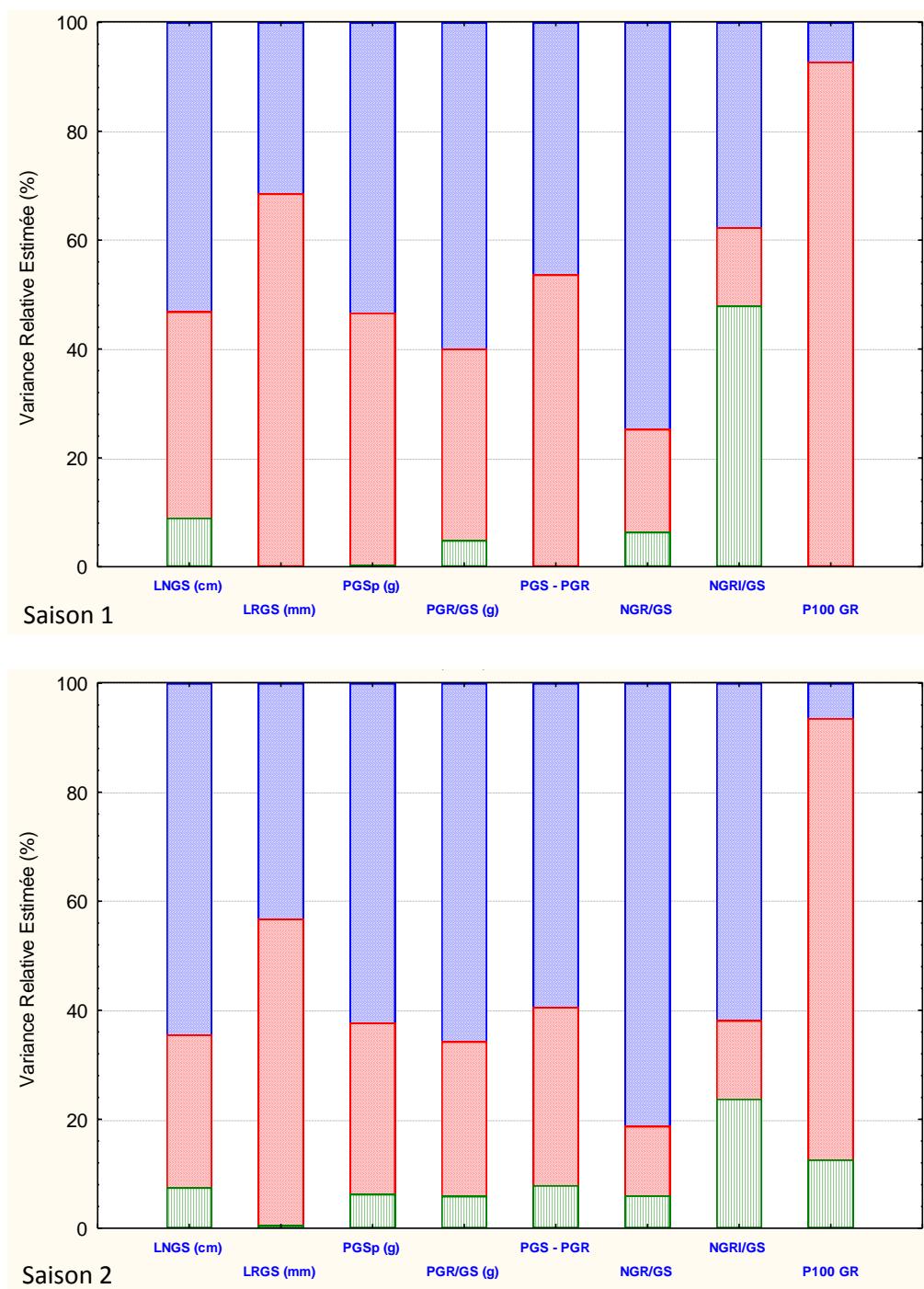


Fig.19. Distribution de la variance phénotypique au sein des dix provenances d'*Acacia tortilis subsp raddiana*) en saison 1 (2008-2009) et b) saison 2 (2009-2010)
Rouge : variation intra-provenance, bleue : variation intra-génotypes, verts : variation inter-provenance.

Tableau 13. Variation inter et intra provenance Analyse statistique de la saison 1 et 2 (dl : degré de liberté, SD : écart type, CV % : coefficient de variation, R² : intensité des effets et F : borne du domaine de rejet pour le seuil choisi.

Variables	Provenances					Génotype/Provenance					
	Moyenne	dl	(SD)	CV %	F	R ²	dl	(SD)	CV %	F	R ²
Saison 1	Longueur de la gousse (cm)	13,16	9	3,54	26,88	3,27**	24,64	90	3,54	26,88	22,37***
	Largeur de la gousse (mm)	7,47	9	0,91	12,17	0,47ns	4,54	90	0,91	12,17	62,38***
	Poids de la gousse (g)	1,11	9	0,39	34,7	1,08 ^{ns}	9,77	90	0,39	34,7	27,02***
	Poids des graines/gousse (g)	0,47	9	0,18	37,91	2,31 ^{ns}	18,77	90	0,18	37,91	18,58***
	Poids de la gousse vide (g)	0,65	9	0,25	39,12	0,75ns	7,01	90	0,25	39,12	35,76***
	Nombre des graines/gousse	7,68	9	2,14	27,87	3,98***	28,5	90	2,14	27,87	8,58***
	Nombre de graines infectées /gousse	3,71	9	3,23	87,16	31,68***	76,01	90	3,23	87,16	12,45***
	Poids de 100 graines (g)	6,44	9	1,18	18,39	0,90 ^{ns}	8,3	90	1,18	18,39	385,06***
Saison 2	Longueur de la gousse (cm)	13,12	9	3,44	26,21	3,48***	25,82	90	3,44	26,21	14,05***
	Largeur de la gousse (mm)	7,33	9	0,94	12,84	1,10 ^{ns}	9,94	90	0,94	12,84	39,97***
	Poids de la gousse (g)	1,08	9	0,37	34,18	2,87***	22,32	90	0,37	34,18	16,13***
	Poids des graines/gousse (g)	0,42	9	0,16	39,44	2,94**	22,73	90	0,16	39,44	13,94***
	Poids de la gousse vide (g)	0,66	9	0,25	38,12	3,27***	24,68	90	0,25	38,12	17,49***
	Nombre des graines/gousse	7,5	9	2,08	27,7	4,90***	32,89	90	2,08	27,7	5,69***
	Nombre de graines infectées /gousse	3,85	9	2,83	73,53	15,46***	60,73	90	2,83	73,53	7,969***
	Poids de 100 graines (g)	6,68	9	1,36	20,37	2,55 ^{ns}	20,34	90	1,36	20,37	378,16***

Différence significative à : *** $\alpha=0.001$, ** $\alpha=0.01$ et * $\alpha=0.05$; ^{ns} Différence non-significative.

La stabilité inter-saisons des traits : longueur de la gousse, nombre de graines par gousse et nombre de graines infectées par gousse traduisent la relation entre la taille de la gousse et la production de graines, malgré les fluctuations certaines de la production à cause des infestations. Ces traits pourraient donc être caractéristiques des provenances, mais seuls des essais de comportement des génotypes face à des stress environnementaux marqués permettraient de conclure.

II.4.1. Variation inter-génotype

Dans notre étude nous avons noté une variance inter-génotype importante par rapport à la variance inter-provenances. Celle-ci dépendait à la fois de l'année, de la localité et du trait considéré (Fig 20). Cela est dû en partie au type de reproduction, chez *Acacia tortilis* 40 % des graines proviennent d'une allo-fécondation (Campa *et al.*, 1998), et au caractère polyploïde de notre subsp *raddiana* (Cardoso 1995), ajoutant à cela que nos mesures ont été réalisées sur des sites non préservés, sauvages, dont les effets maternels sont forts et ont contribué fortement à

D'une façon générale, la variabilité intra-génotype dépasse la variabilité inter-génotype pour la majorité des provenances, ce qui suggère qu'une heritabilité des traits morphométriques de la gousse serait donc moins forte pour la plupart des traits concernés, à l'exception du poids de 100 graines et la largeur de la gousse.

Néanmoins, deux groupes de variables peuvent être distingués :

- ✓ Pour LNGS, PGS, PGR/GS, et PGS-PGR et NGRI/GS, la proportion de variances inter-génotypes a varié considérablement entre provenances et années. Pour Tissint par exemple, cette proportion est passée de 70 % pour LNGS en saison 1 à 18 % pour saison 2 et, pour cette même provenance le PGS de 58 % en saison 1 à 31 % en saison 2.
- ✓ Les traits poids de 100 graines et largeur de la gousse ont présenté généralement une variation inter-génotype importante, supérieure à 80 % pour le poids de 100-graine et a dépassé les 45 % pour LRGS.

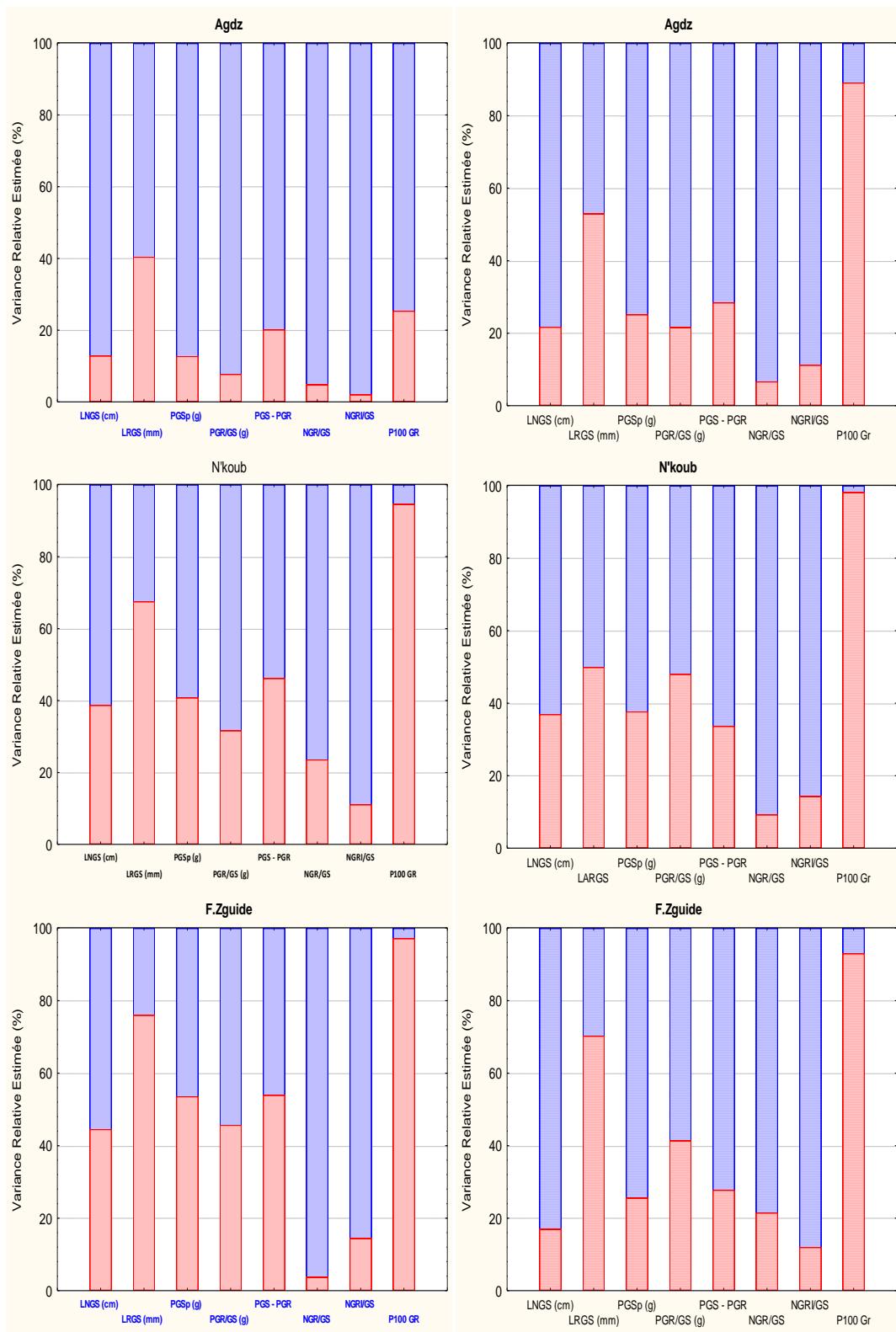
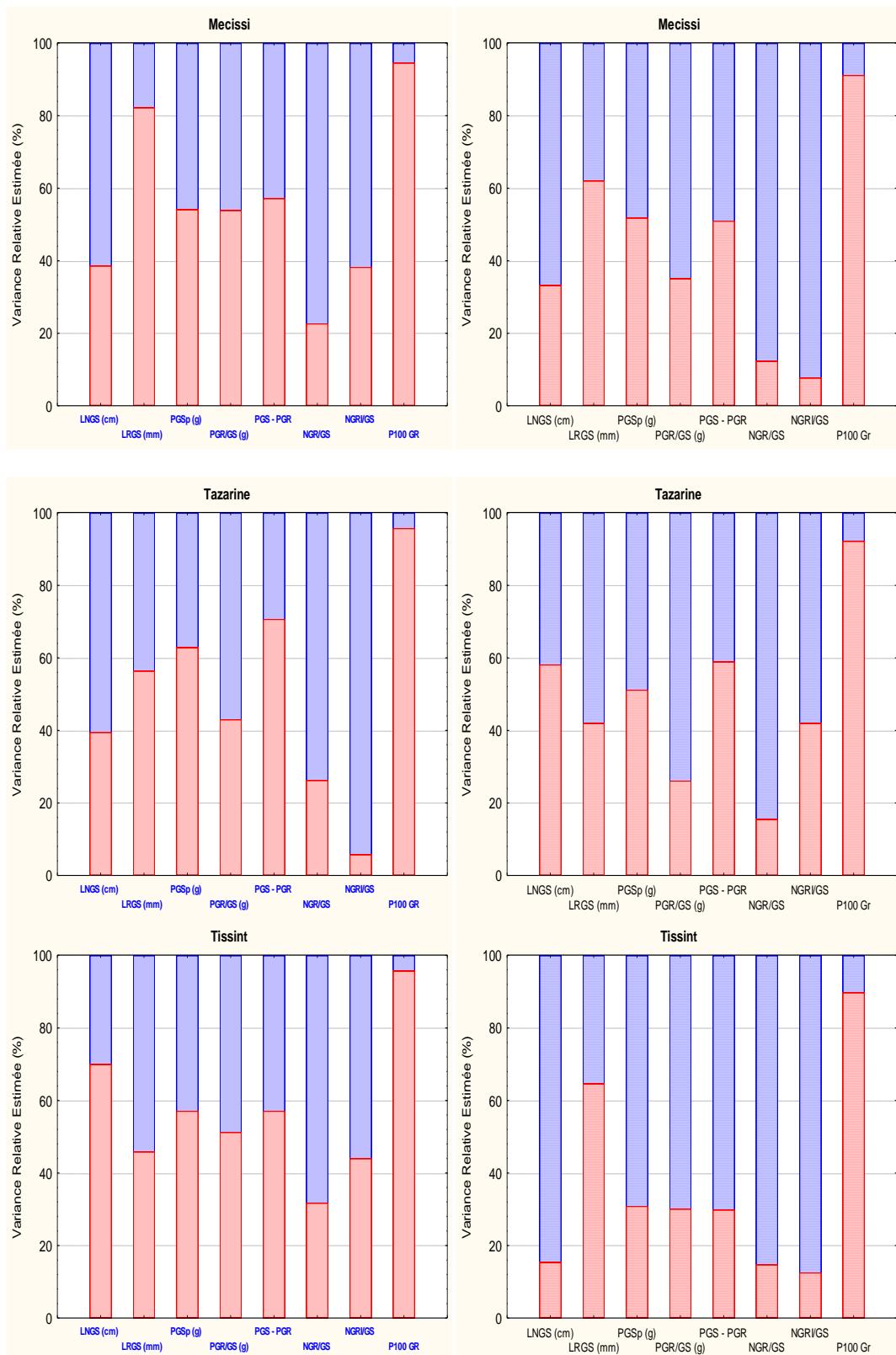
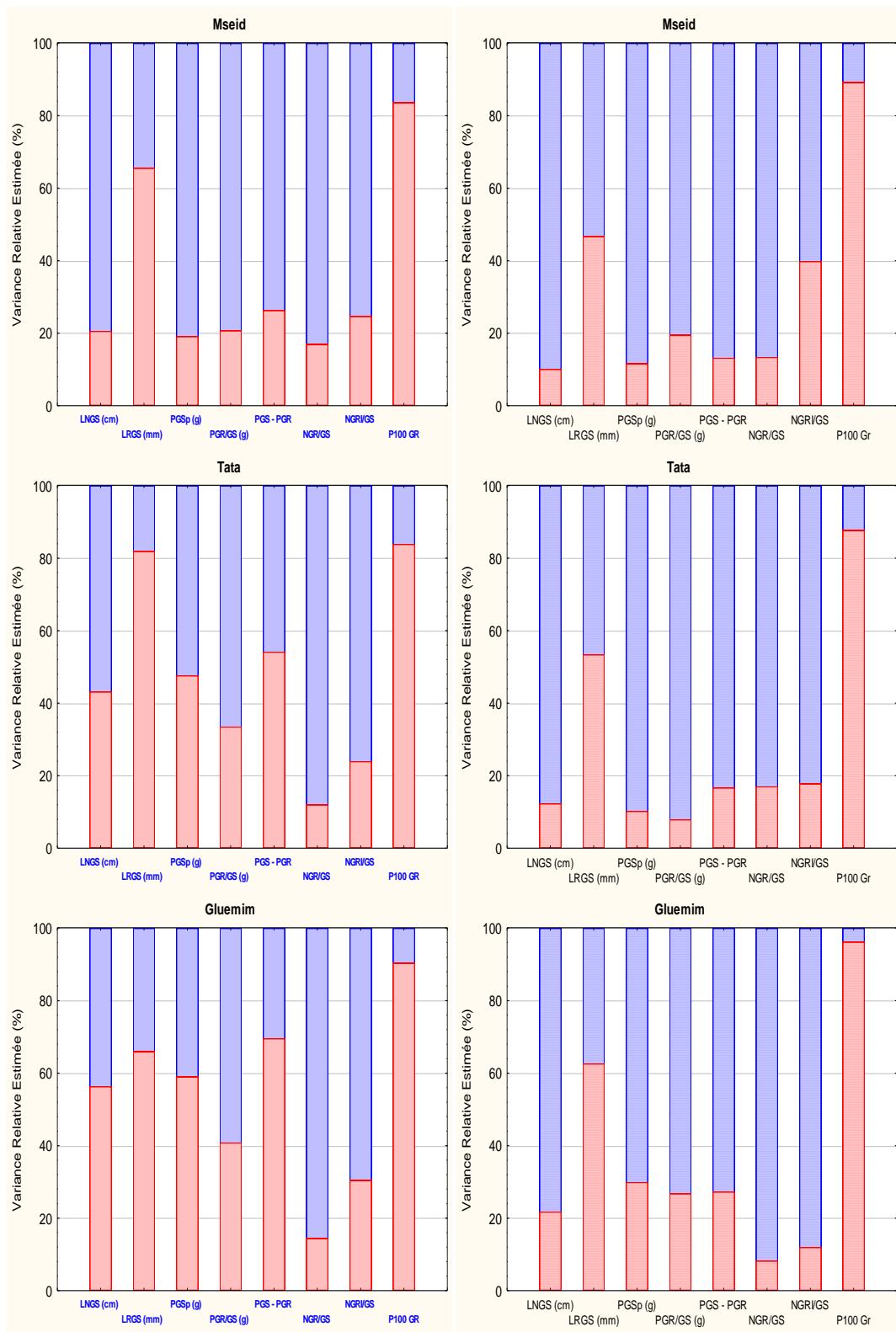


Fig.20. Répartition de la variance phénotypique inter-génotype (rayure rouge) et intra-génotype (rayure bleue) pour les huit traits morpho-métriques observés au sein des dix provenances étudiées (à gauche saison 1, à droite saison 2)

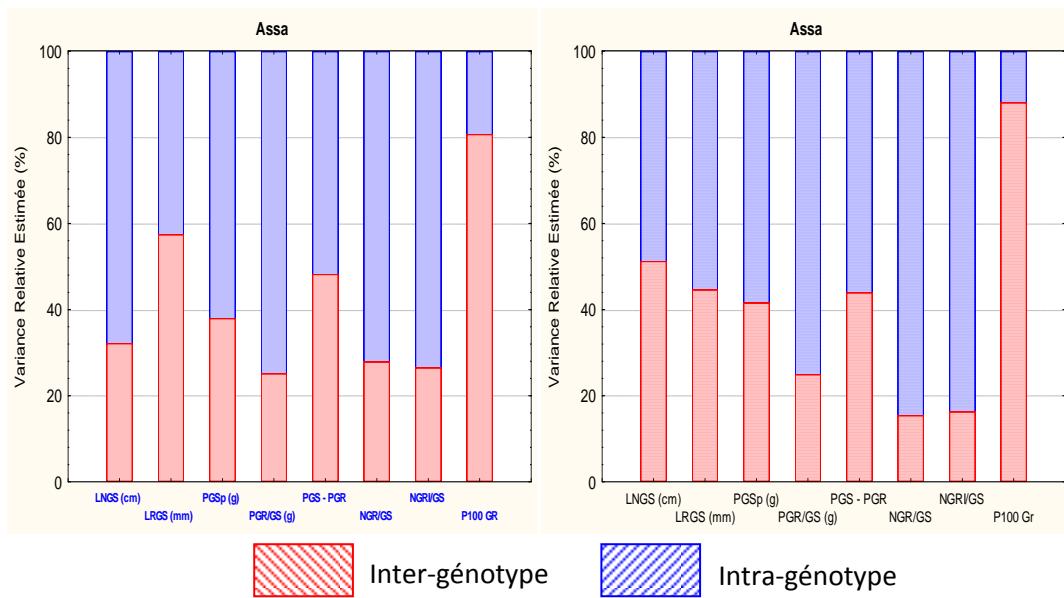
..



(Suite Fig.21) Répartition de la variance phénotypique inter-génotype (rayure rouge) et intra-génotype (rayure bleue) pour 8 traits morpho-métriques observés au sein de dix provenances *d'Acacia tortilis subsp raddiana* à gauche en saison 1, à droite en saison 2



(Suite Fig.22) Répartition de la variance phénotypique inter-génotype (rayure rouge) et intra-génotype (rayure bleue) pour 8 traits morpho-métriques observés au sein de dix provenances *d'Acacia tortilis subsp raddiana* à gauche en saison 1, à droite en saison 2



(Suite Fig.23) Répartition de la variance phénotypique inter-génotype (rayure rouge) et intra-génotype (rayure bleue) pour 8 traits morpho-métriques observés au sein de dix provenances *d'Acacia tortilis subsp raddiana* à gauche en saison 1, à droite en saison 2

II.5. Estimation des paramètres de variation génétique

Le coefficient de variation phénotypique (PCV) et génotypique (GCV), l'héritabilité au sens large ($h^2 b$) et le gain génétique (GA) sont présentés dans le tableau 15. Pour la plupart des caractères, les interactions génotype-environnement sont plus grandes que la variance génétique.

Dans la première et la deuxième saison les valeurs du coefficient de variabilité phénotypique (PCV) les plus faibles sont notées pour le caractère de largeur de la gousse, avec successivement 12,42 % et 12,84 % et il diminue à 10,62 % pour l'interaction des deux années. Les valeurs les plus élevées ont été notées pour le nombre moyen de graines infectées par gousse avec successivement 64,48 % (saison 1), 65,02 % (saison 2). Cette valeur diminue à 61,32 % à l'interaction des deux saisons. Les coefficients de variation génotypique (GCV) ont montré des tendances similaires à celles des coefficients de variation phénotypique (PCV) qui variaient entre 10,65 % ; 9,18 % pour la largeur des gousses et 33,89 % ; 28,23 % pour le nombre de graines infectées par gousse simultanément pour la première et deuxième saison. En ce qui concerne l'héritabilité (h^2), les estimations varient de 20,19 % à 13,53 % pour le nombre de graines par gousse, et 92,75 % ; 92,63 % pour les poids de 100 graines.

Tableau 14. Estimation des paramètres génétiques des traits de la gousse par saison.

Variables	Variance		Coefficient of variance (%)		Héritabilité (%)	Gain génétique (%)
	Génotypique	Phénotypique	Génotypique	Phénotypique		
saison 1	Longueur de la gousse (cm)	4,80	11,54	16,65	25,81	41,61
	Largeur de la gousse (mm)	0,58	0,86	10,18	12,42	67,17
	Poids de la gousse (g)	0,07	0,15	23,66	34,71	46,45
	Poids des graines/ Gousse (g)	0,01	0,03	22,57	37,13	36,96
	Poids de la gousse vide (g)	0,03	0,06	28,91	39,47	53,68
	Nombre de graines/Gousse	0,87	4,32	12,17	27,07	20,19
	Nombre de graines infectées/Gousse	1,58	5,72	33,89	64,48	17,81
saison 2	poids de 100-graines (g)	1,32	1,43	17,86	18,55	92,75
	Longueur de la gousse (cm)	3,35	11,06	13,95	25,34	30,32
	Largeur de la gousse (mm)	0,50	0,89	9,65	12,84	56,51
	Poids de la gousse (g)	0,04	0,13	19,25	33,24	33,53
	Poids des graines/ Gousse (g)	0,01	0,03	21,09	38,42	30,14
	Poids de la gousse vide (g)	0,02	0,06	21,92	36,79	35,48
	Nombre des graines/Gousse	0,55	4,09	9,92	26,96	13,53
	Nombre de graine infectée/Gousse	1,18	6,28	28,23	65,02	18,85
	poids de 100-graines (g)	1,53	1,65	18,52	19,24	17,82

II.6. Analyse multi-variable (ACP)

L'application de l'analyse en composante principale (ACP) sur les données quantitatives a permis de tracer les affinités entre les provenances par rapport à la globalité des variables ainsi que de définir des éventuelles corrélations. La projection sur le plan de l'ACP couvre 76,12 % de l'inertie totale (Fig 24-25). Le tableau 15 reporte la contribution des valeurs de chaque variable aux plans factoriels 1 et 2.

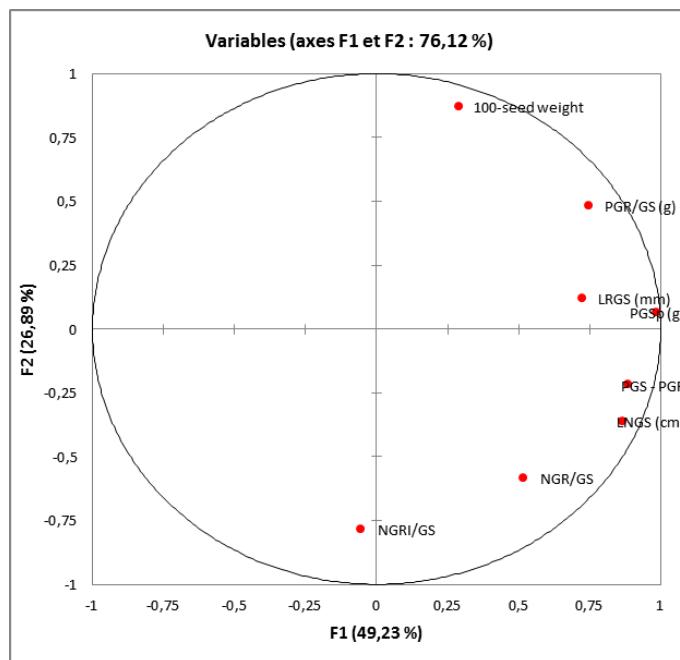


Figure 24. Cercle de corrélation entre les variables et les facteurs 1 et 2

Tableau 15. Contributions des variables en pourcentage dans la définition des facteurs 1 et 2.

	F1	F2
LNGS (cm)	19,099	6,086
LRGS (mm)	13,275	0,686
PGSp (g)	24,631	0,205
PGR/GS (g)	14,138	10,890
PGS - PGR	19,862	2,218
NGR/GS	6,795	15,874
NGRI/GS	0,073	28,570
P100 GR	2,127	35,471

La longueur de la gousse, le poids de la gousse, le poids des graines par gousse et le poids de la gousse vide sont les plus déterminants pour l'axe factoriel 1 qui absorbe presque 50 % de la variation. Tandis que le facteur 2 est défini par le nombre de graines infectées par gousse et le poids de 100-graines.

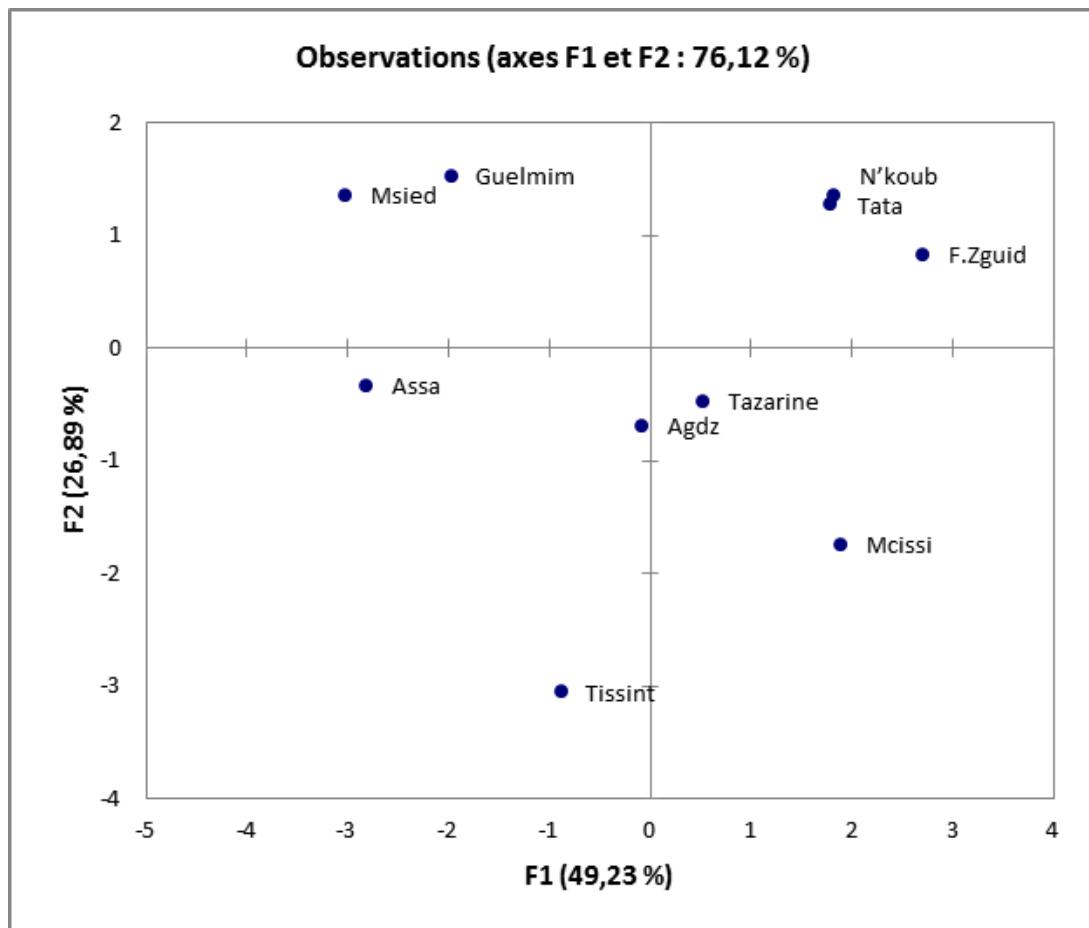


Figure 25. Projection sur le plan factoriel 1-2 des provenances sur la base des variables ayant une différence significative.

D'après les valeurs propres (cosinus carré) de chaque provenance (Tableau 16), toutes les provenances sont bien représentées sur le plan 1-2, sauf la provenance Tazarine. En effet, la somme des cosinus carrés qui mesure la proximité entre un point et la provenance qu'il représente, cette valeur est de 0,096 ce qui correspond à une faible représentativité sur le plan principal. La distance entre deux projections n'est pas proche de la distance réelle que si les deux provenances sont bien représentées (Anonyme 2012a)

Tableau 16. Cosinus carrés des observations

	F1	F2	somme des cosinus carrés
Agdz	0,003	0,245	0,248
N'kob	0,461	0,255	0,716
Tazarine	0,053	0,043	0,096
F.Zguid	0,644	0,060	0,704
Mcissi	0,396	0,337	0,733
Tissint	0,061	0,742	0,803
Tata	0,572	0,286	0,858
Guelmim	0,560	0,333	0,892
Msied	0,792	0,159	0,950
Assa	0,940	0,013	0,954

D'un côté, les provenances de Foum Zguid, N'Koub et Tata sont négativement corrélées avec le nombre de graines infectées par gousse, du fait qu'elles sont les plus saines, inversement à la provenance de Tissint, Mcissi qui sont positivement corrélé avec cette variable. D'un autre côté, les provenances Mcissi et Tazarine sont caractérisées par des valeurs moyennes du nombre de graines par gousse les plus importantes. La provenance de Tata et Foum Zguid quant à eux sont caractérisées par des valeurs moyennes supérieures à la moyenne pour le poids de 100 graines, au temps que Tissint est marquée par les moyennes les plus élevées de graines infectées. Les provenances d'Assa, Msied et Guelmim sont marquées par des valeurs les plus faibles des traits étudiés.

Dans l'ensemble, les provenances N'Koub et Tazarine peuvent être considérées comme sources assez stables pour l'approvisionnement en semis, puisqu'elles ont gardé le même comportement entre la première et la deuxième année. Ces provenances appartiennent à la province d'Ouarzazate, relativement moins soumises à la sécheresse par rapport aux autres provenances (Tableau 17).

Tableau 17. Performances annuelles moyennes des provenances en fonction des caractères biométriques de la gousse

Variables	Agdz	N'koub	Tazarine	F.Zguid	Mcissi	Tissint	Tata	Guelmim	Msied	Assa	
saison 1	LNGS (cm)	13,07 cd	13,80 bc	13,91 bc	11,92 d	12,16 d	15,68 a	14,52 ab	12,18 d	11,91 d	12,42 d
	LRGS (mm)	7,49 a	7,35 a	7,32 a	7,77 a	7,68 a	7,38 a	7,53 a	7,27 a	7,31 a	7,51 a
	PGSp (g)	1,01 a	1,23 a	1,20 a	0,97 a	1,13 a	1,22 a	1,14 a	1,06 a	1,09 a	1,06 a
	PGR/GS (g)	0,46 a	0,53 a	0,51 a	0,37 a	0,51 a	0,50 a	0,49 a	0,41 a	0,42 a	0,43 a
	PGS - PGR	0,54 a	0,69 a	0,68 a	0,59 a	0,61 a	0,71 a	0,64 a	0,64 a	0,66 a	0,63 a
	NGR/GS	7,07 cd	8,41 a	8,01 ab	6,41 d	7,99 ab	8,43 a	7,64 abc	7,30 abc	7,96 ab	7,52 abc
	NGRI/GS	0,37 a	0,56 a	1,11 a	4,15 bc	3,61 b	6,67 d	5,25 c	4,56 bc	4,09 bc	6,70 d
	P100 GR	6,93 a	6,55 a	6,69 a	6,23 a	6,75 a	6,27 a	6,66 a	6,15 a	5,76 a	6,38 a
saison 2	LNGS (cm)	13,93ab	13,27b	13,47b	13,94ab	14,96a	12,88bc	13,63b	11,64d	11,55d	11,90cd
	LRGS (mm)	7,28a	7,44a	7,26a	7,78a	7,15a	7,43a	7,62a	7,23a	6,98a	7,14a
	PGSp (g)	1,06abc	1,17ab	1,09abc	1,24a	1,20a	1,00bc	1,15ab	0,99bc	0,93c	0,90c
	PGR/GS (g)	0,38a	0,50a	0,45ab	0,44ab	0,42ab	0,34a	0,46ab	0,38a	0,38a	0,37a
	PGS - PGR	0,67abc	0,66abcd	0,64cd	0,79a	0,78ab	0,66bcd	0,68abc	0,61cd	0,55cd	0,53d
	NGR/GS	7,52abc	7,99ab	8,24a	7,08cd	7,97ab	7,98ab	7,59abc	6,64d	6,63d	7,33bcd
	NGRI/GS	3,22abc	2,98ab	2,39a	3,93bcd	4,88d	7,39e	3,39abc	2,75a	3,29abc	4,30cd
	P100 GR	6,22cd	7,40ab	5,98c	7,24ab	6,29abc	5,8c	7,52a	7,00abc	7,02abc	6,31abc

II.7. Forme des gousses.

Six formes de base de gousses ont pu être identifiées (Fig 27) : allongée, arquée, ronde, spiralée, ondulée, et ressort. Les formes les plus abondantes sont arquées et rondes (Tableau 18), tandis que les formes complexes (ondulées spiralées, ressort, spiralées ondulées) restent rares au niveau de l'ensemble des provenances.

Les provenances ont tendance à garder les mêmes formes entre les deux saisons.

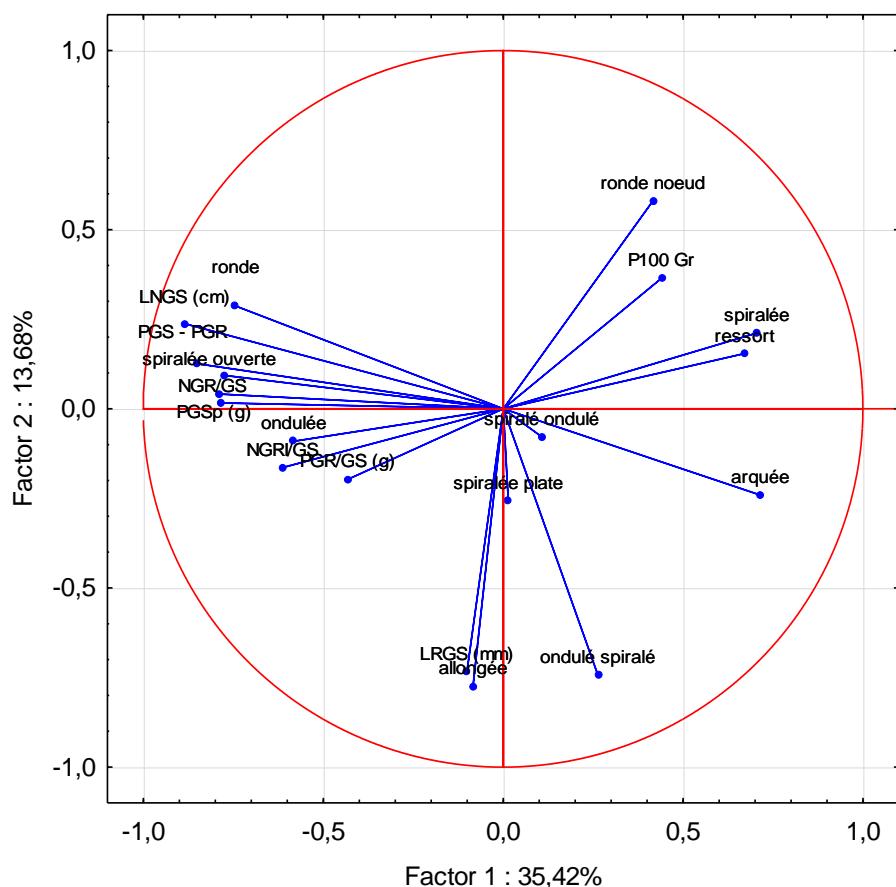


Figure 26. Cercle de corrélation entre les variables quantitatives mesurées et la forme de la gousse

à partir de l'établissement du cercle de corrélation des variables (Fig. 26), nous constatons que le poids de 100 graines est corrélé avec la forme ronde et arquée.

La largeur de la gousse est bien corrélée avec la forme allongée, au temps que la longueur de la gousse, le poids de la gousse et nombre de graines par gousse sont corrélés avec les formes ondulées et spiralées ouvertes.

L'étude plus approfondie de la forme des goussettes peut éclaircir davantage la structuration des provenances selon ce paramètre relativement discontinu.

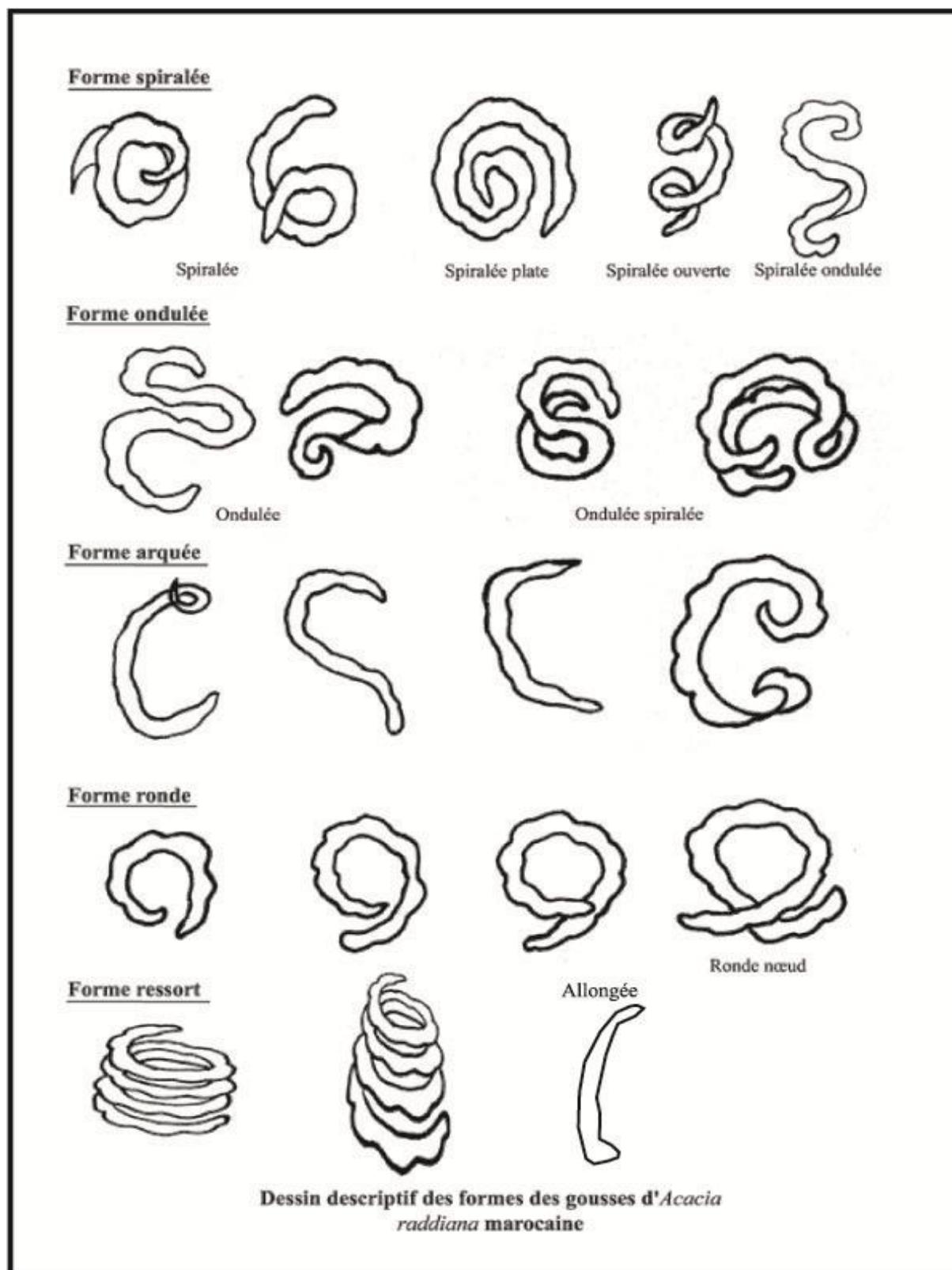


Figure 27. Formes des goussettes détectées au sein des six provenances.

Tableau 18. Répartition des pourcentages des formes des gousses au sein des six provenances.

		allongée	arquée	ondulée	ressort	ronde	spiralée	spiralée ouverte	spiralée plate	ondulée spiralée	spiralée ondulée	ronde noeud
saison 1	Mcissi	0,67	42,33	19,67	2,67	16,00	9,33	5,33	3,00	1,00	0,00	0,00
	Tissint	0,33	6,67	27,67	0,33	28,00	2,67	33,67	0,67	0,00	0,00	0,00
	Guelmim	0,00	42,67	8,00	1,67	19,67	6,00	14,33	6,67	0,67	0,33	0,00
	Msied	1,00	30,33	11,00	0,00	19,33	0,67	18,00	15,67	0,33	0,00	3,67
	Assa	2,67	50,33	5,00	0,00	17,33	0,33	10,67	12,33	0,00	0,00	1,33
	F.Zguid	3,33	30,00	19,33	1,33	21,00	4,33	13,67	3,33	1,67	0,00	2,00
saison 2	Mcissi	0,00	50,33	13,33	0,00	21,33	5,00	2,00	4,00	0,00	0,00	3,67
	Tissint	1,00	11,67	20,67	0,00	29,33	0,00	28,33	7,33	0,00	0,00	1,67
	Guelmim	1,00	32,33	10,33	0,00	30,00	4,00	10,33	2,33	0,00	0,00	9,67
	Msied	0,33	33,67	11,00	0,67	24,00	4,00	6,67	3,00	0,00	0,00	16,33
	Assa	0,00	40,33	3,33	5,33	13,67	12,67	9,67	6,67	0,00	0,00	8,33
	F.Zguid	0,00	30,00	23,33	1,00	18,00	5,00	16,67	1,67	0,67	0,00	3,00

Conclusion

Dans cette étude, les caractères morpho-métriques de la gousse ont été utilisés pour la caractérisation de la variabilité génétique au sein des peuplements naturels *d'Acacia tortilis subsp raddiana* au Maroc. Ils ont montré que tous les caractères morpho-métriques sont influencés par la part génétique et surtout environnementale, vu que les coefficients de variation phénotypique étaient supérieurs aux variations génotypiques. Ainsi, certaines variables étaient non significatives à la 1^{ère} saison et ils le sont à la 2^{ème} saison. Les facteurs de variation étudiés (Arbre dans la provenance, provenance et saison) sont tous significatifs. Des variations importantes au sein de l'arbre dans la provenance, entre provenances et entre saison pour l'ensemble des traits ont été observées. La variabilité intra et inter-provenances est parfois de même ordre. Par conséquent, la caractérisation des provenances en fonction de leur origine géographique n'est pas systématique. Différents cas de figure de ressemblances et ou de dissemblances ont été mises en évidence. En outre, les provenances de Tazarine et N'Koub ont présenté des valeurs moyennes élevées pour la majorité des caractères étudiés pendant la première et la deuxième année. L'approche de présélection pour des éventuels vergers à graines peut être initiée en exploitant les données recueillies sur l'arbre et sur la provenance. Ainsi, selon la répartition des génotypes qui dépassent la moyenne de l'ensemble des provenances pour les caractères étudiés, on peut opter pour la stratégie de gestion des ressources des Acacias sahariens soit pour le facteur arbre (i.e., poids de la gousse, poids de 100 graines) ou provenance (i.e., Longueur de la gousse, nombre de graines par gousse et nombre de graines infectées par gousse).

L'évaluation de la variabilité des caractères adaptatifs s'avère très utile pour la présélection d'arbres élites, mais elle reste insuffisante pour une description de la structure génétique des peuplements d'Acacias sahariens. Pour cela, l'exploitation du polymorphisme des marqueurs moléculaires neutres vis-à-vis de l'environnement, est une approche complémentaire et très utile pour la conception de la gestion des ressources phytogénétiques.

D. Chapitre 3.

Dénombrement chromosomique chez
Acacia tortilis subsp *raddiana* du
Maroc

Résumé

L'étude cytogénétique n'a jamais fait l'objet à notre connaissance d'une recherche sur les Acacias sahariens du Maroc, et notamment chez *Acacia tortilis* subsp *raddiana*. La présente étude cherche en premier lieu à savoir le nombre chromosomique à travers différentes techniques de coloration avec et sans fluorescence. Dans un second lieu, la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) avec double étiquetage *via* deux sondes de l'ADNr (18S-28S marquée à la biotine et 5S marquée au digoxigénine) a été utilisée pour tester l'existence d'anomalies intrachromosomiques.

Les résultats ont révélé une polyploidie avec un nombre de base $x = 13$. Nous avons mis en évidence : des octaploïdes ($2n=8x=104$). Les plaques à 104 chromosomes ont montré deux signaux à la fois pour ARNr 5S et pour ARNr 18S-28S. Un signal provenant d'ARNr 5S était moins intense. Cette inégalité d'intensité peut être expliquée par une différence du nombre de copies formant chacun des sites d'hybridation 5S. Le nombre limité des sites d'hybridation des ARNr 5S et 18S-28S chez *Acacia tortilis* subsp *raddiana* «type octaploïde» suggère que le dédoublement des chromosomes chez les autopolyploïdes affecte le réarrangement des gènes qu'ils portent, tout comme chez les allopolypliodes. La présence d'un site ARNr 5S avec un faible signal peut être témoin de la présence d'une perte de copies des ARNr au cours du temps de l'évolution. Ce résultat peut expliquer l'absence des autres sites qui ont probablement perdu un nombre important de leurs copies lors de la méiose, mettant en place des remaniements ou anomalies intrachromosomiques (i.e., insertion/délétion), lesquels sont techniquement traduits par la diminution ou la perte du signal au seuil détectable par la FISH.

Mots clés : *Acacia tortilis* subsp *raddiana*, chromosomes, polyploidie, FISH, délétion

Introduction

La cytogénétique est une science née du brassage de la cytologie et de la génétique. Elle a grandement participé dans la compréhension de la phylogénie et la taxonomie de nombreux taxons, et dans l'exploitation de la variabilité interspécifique. Elle s'intéresse au dénombrement des chromosomes et à leurs brassages. Pour ce faire, elle utilise des colorations homogènes des chromosomes, tels que le carmin acétique, acéto-orcéine, ou des colorations inhomogènes qui donnent lieu à des colorations en bandes. Avec le progrès de la biologie moléculaire, cette technique a été appliquée sur les chromosomes sous le nom de la technique FISH (hybridation *in situ* avec une sonde fluorescente). Le but de ce chapitre est la mise au point d'une technique permettant de dénombrer les chromosomes chez *Acacia tortilis* subsp *raddiana* du Maroc et savoir son niveau de ploïdie, ce qui permettra de bien mener l'étude de la diversité génétique chez cette espèce. En outre, aucune étude à notre connaissance au Maroc n'a été réalisée au niveau de sa diversité ou de sa garniture chromosomique.

I. Synthèse bibliographique

I.1. Le cycle cellulaire

La division cellulaire est une étape qui marque la vie d'une cellule qui n'est pas en quiescence (phase G₀ = phase de repos). Une fois, la cellule est excitée par un facteur de croissance, elle rentre en cycle cellulaire. Les premières études de division cellulaire remontent au 1821, avec le célèbre aphorisme de Rudolf Virchow (1821-1902) « Omnis Cellula E Cellula» « toutes cellules proviennent d'une cellule ». Depuis, les recherches se sont concentrées sur la compréhension du processus de cette division et la manière dont les cellules transmettent fidèlement l'information génétique d'une génération à la suivante. Deux événements majeurs sont une caractéristique commune pour tous les cycles cellulaires qui sont facilement détectables par microscopie optique. Il s'agit de la phase M et l'interphase. La phase M (phase mitotique = division cellulaire) composée de la mitose où les chromosomes répliqués ségrègent dans deux noyaux (Howard *et al.*, 1951 ; Howard *et al.*, 1986 ; Nurse 1990) et la cytocinèse (cytodiéthèse), où la cellule en division se sépare en deux cellules filles. La phase d'interphase où les chromosomes sont

répliqués. La notion de cycle cellulaire, a été mise en évidence par les travaux de Howard et Pelc en 1953, où il a été découvert que le cycle mitotique normal au niveau du méristème racinaire s'étale sur plusieurs heures, dont une période très courte est réservée à la division cellulaire, tandis que, le reste des heures est consacré pour la synthèse d'un nouvel ADN jusqu'à l'apparition de la prophase du nouveau cycle mitotique (Howard *et al.* 1986).

I.1.1. Les phases du cycle cellulaire

I.1.1.1. Interphase

L'interphase est une phase de croissance cellulaire. Elle comprend trois phases G_1 , S et G_2 . C'est une étape clé du cycle cellulaire, la cellule se prépare pour entamer la mitose. Ainsi, la cellule consacre toute sa machinerie pour répliquer son ADN et synthétiser son stock de protéines, et produire une quantité suffisante d'organites et de composants cytoplasmiques pour les deux cellules filles.

- La phase G_1 (Gap) : constitue une phase très variable en longueur qui précède la phase S , au cours de laquelle la cellule assure sa croissance en s'alimentant des nutriments absorbés (Galas *et al.*, 2008). Durant cette période, la cellule produit les composants nécessaires au déroulement des phases postérieures tels que les nucléotides, les enzymes, les acides aminés, les organites, etc., d'où son augmentation de volume. Aucune synthèse de l'ADN n'est notée à cette phase. Elle peut durer de quelques jours à des années comme le cas des cellules nerveuses qui ne se divisent pas ou les cellules cultivées qui cessent de se diviser par inhibition de croissance (De Robertis *et al.*, 1983). Si les conditions de croissance cessent à un moment spécifique de G_1 , la cellule entre en phase G_0 état de repos de la cellule.

- La phase S (Synthèse) : C'est la phase de synthèse d'ADN par l'intermédiaire de l'activation de l'ADN polymérase. Les nouvelles molécules d'ADN synthétisées sont structurées sous forme de nucléosomes à l'aide des Histones (Galas *et al.* 2008), on note également le déroulement des mécanismes de correction du matériel génétique pour éviter une accumulation des mutations. À la fin de la phase S , tous les chromosomes sont

sous forme de deux chromatides. La cellule entame également la duplication de son centrosome au cours, de la phase de transition entre G1/S (Lacey *et al.*, 1999)

•La phase G2 (Gap) : C'est l'étape qui précède la mitose, les préparatifs se complètent. À ce stade, la cellule contient un matériel génétique répliqué qui peut bien être visualisé en fusionnant des cellules en G2 avec des cellules en phase M (Karp *et al.*, 2004). Les chromosomes dupliqués sont dispersés dans le noyau, et commencent leur condensation. Les cellules avec un centriole achèvent la duplication de ce dernier, ainsi on trouve deux paires de centrioles en dehors de l'enveloppe nucléaire.

Les deux phases G, servent de phase de contrôle de l'intégrité du matériel génétique synthétisé, ainsi elles assurent la réparation en cas d'erreurs éventuelles risquant d'être ensuite transmises aux cellules filles (Lüllmann-Rauch *et al.*, 2008).

I.1.1.2. La division mitotique ou phase M

La division mitotique comporte deux événements : la mitose et la cytodiérèse. C'est une phase très bien contrôlée grâce aux mécanismes moléculaires et structuraux. À l'encontre de l'interphase qui peut être arrêtée selon les facteurs de la cellule à la phase G1 ou phase G2 grâce aux points de passage localisés à la fin de ces deux phases, la phase M est un processus continu dans le temps qui ne dure que quelques minutes à une heure (Raven *et al.* 2003). La mitose est divisée en 5 phases principales : prophase, pro métaphase, métaphase, anaphase et télophase.

I.1.1.2.1. Les stades de la mitose

a. La prophase

Le début de ce stade est marqué par des chromosomes encore filamenteux bien dispersés dans tout le noyau. Au fur et à mesure que ce stade progresse la condensation des chromosomes se poursuit pour se trouver à la fin de ce stade avec des chromosomes volumineux qui sont unis sur toute leur longueur, adhérés à l'enveloppe nucléaire avec libération du centre du noyau (Chen 1936). On assiste à un début de formation du fuseau qui permettra la séparation des deux chromatides sœurs, ainsi un pont se forme entre les deux pôles de la cellule.

b. Pro métaphase

Pendant ce stade, les chromatides sœurs attachées par des protéines spécialisées (complexe protéique de cohésine) se détachent au niveau des bras, mais reste attachées au niveau de la région du centromère (Lüllmann-Rauch *et al.* 2008). Les chromosomes condensés se fixent par l'intermédiaire du kinétochore au niveau du centromère sur le fuseau mitotique et se déplacent vers le centre de la cellule, en même temps l'enveloppe nucléaire termine sa désintégration. Les chromosomes pro métaphasiques occupent tous l'espace du noyau antérieur. À la fin, les chromosomes se regroupent tous au centre du fuseau mitotique.

c. Métaphase

La métaphase est la phase spectaculaire de la mitose. Les chromosomes sont rassemblés dans la plaque métaphasique (équatoriale) à l'aide des microtubules des kinétochores développés au niveau du centromère. Ces derniers exercent des forces équilibrées sur les chromosomes, les tiraillements continuent jusqu'à ce que les chromosomes soient tous alignés sur la plaque métaphasique, chaque chromatide est connectée vers un pôle opposé avec le centromère sur le plan équatorial. Si l'un des chromosomes reste non connecté à un microtubule, la mitose s'arrête : c'est le point de contrôle fusal (Lüllmann-Rauch *et al.* 2008). À cette étape, les chromosomes sont prêts pour entamer la phase suivante anaphase.

d. Anaphase

L'anaphase est caractérisée par sa courte durée, chacune des chromatides sœurs d'un chromosome migre brusquement dans un pôle contraire. À cette étape, la cohésine au niveau de la région centromérique (Warren *et al.*, 2000) se scinde ce qui permet la séparation des deux chromatides sœurs de telle sorte que chacune se déplace vers le pôle auquel elle est connectée. Le déplacement des deux chromatides sœurs vers les pôles se fait grâce aux protéines motrices qui fournissent de l'énergie, à côté on trouve aussi le phénomène de dépolymérisations kinétochoriens en perdant des sous unités.

e. La télophase

Au stade télophase, on s'aperçoit avec deux lots de chromosomes, identiques en nombre, qui commencent à perdre leur contraste en se décondensant. Ainsi, les chromosomes reprennent leur forme de filaments minces jusqu'à leur disparition, on ne peut plus les détecter sous microscope. La membrane nucléaire se reconstitue à nouveau pour les deux cellules filles et le fuseau mitotique disparaît (Lodish *et al.*, 1997).

I.1.1.2.2. La cytocinèse

Cytocinèse signifie la division du cytoplasme (Samuels *et al.*, 1995). Chez les plantes, deux événements marquent cette phase, il s'agit de la formation du phragmoplaste et de la plaque cellulaire (Samuels *et al.* 1995 ; Valster *et al.*, 1997 ; Otegui *et al.*, 2000). En 1993, Zhang et al, ont démontré que lors du déplacement des chromosomes vers les pôles, les microtubules du centre de l'appareil mitotique fusionnent latéralement pour donner naissance à la structure du phragmoplaste (Zhang *et al.*, 1993). Des microtubules du reste de l'appareil mitotique et des filaments d'actines qui ont une polarité définie (Otegui *et al.* 2000 ; Otegui *et al.*, 2001 ; Karp *et al.* 2004) s'assemblent avec d'autres qui sont nouveaux, pour former deux ensembles opposés de chaque côté du plan de division (Goddard *et al.*, 1994 ; Otegui *et al.* 2000), ces microtubules servent de moyen pour transporter les vésicules drivées de Golgi avec lesquels ils fusionnent (Brown *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2001 ; Damme *et al.*, 2004) pour former la structure du phragmoplaste, les nouveaux microtubules s'insèrent sur les marges latérales ainsi la structure s'étend par voie centrifuge (Karp *et al.* 2004) pour atteindre la membrane plasmique de la cellule mère. Les vésicules formant le phragmoplaste deviennent ensuite la membrane plasmique des cellules filles (Lodish *et al.*, 2005). La plaque cellulaire sera ensuite synthétisée grâce aux complexes enzymatiques contenus dans les vésicules dérivées de Golgi (Sonobe *et al.*, 2000).

I.2. Polyploïdie

On entend par polyploïdie, une augmentation du nombre de chromosomes dans une cellule animale ou végétale. Généralement, les cellules des animaux et des plantes

supérieures contiennent deux jeux de chromosomes dont chacun provenant de l'un des parents. Dans la reproduction sexuée ordinaire, ce nombre est réduit à la moitié lors de la maturation des cellules germinales (gamètes). Le nombre diploïde ($2x$) est restauré pendant le processus de fécondation par l'union de deux cellules germinales dont les noyaux portent chacun un nombre de chromosomes haploïde (x) (Gates 1924).

La polyplioïdie peut être naturelle à la suite d'un croisement de deux espèces avec des nombres chromosomiques différents ou à une ségrégation non parfaite des chromosomes (Gates 1924 ; Navashin 1925) ; comme elle peut être induite par des agents extérieurs tels que la température et des radiations (Randolph 1932). Cette augmentation du nombre de chromosomes est accompagnée par un agrandissement de la taille des cellules et par suite des organes qu'elles forment (Gates 1924 ; Navashin 1925), d'où une croyance largement répandue, mais non fondée, que les polyplioïdes sont plus grands que les diploïdes correspondants (Comai 2005).

Avec l'apparition de la théorie « caryo-géographique » et celle de la résistance des polyplioïdes par rapport au diploïde aux années 30 (Bowden 1940), la polyplioïdie a retenu l'attention de beaucoup de chercheurs dans le but de dévoiler les mécanismes développés chez ces espèces pour faire face aux conditions défavorables. Il s'est avéré que ce phénomène apportait un bénéfice aux plantes de tomates en terme de résistance au déficit hydrique et à la salinité (Tal *et al.*, 1976) grâce à certains changements physiologiques tels qu'une augmentation de la pression racinaire, et une diminution de la transpiration stomatique d'une part, d'autre part il y avait une réduction du nombre des ARN, et de l'activité des ARNase (Tal 1977). Une revue brève sur la polyplioïdie chez les plantes à fleurs (Levin 1983) a permis de conclure que ce phénomène n'est pas nécessairement néfaste, et il est accompagné de plusieurs changements, parfois progressifs ou brusques, ce qui permet son développement au point qu'il peut générer des espèces carrément différentes de leur ancêtre diploïde, ce qui fait de lui un obstacle à l'évolution progressive. Cependant, la polyplioïdie a joué un grand rôle dans l'évolution des angiospermes dont 70 % à 80 % ont vécu une période de polyplioïdisation (Leitch *et al.*, 1997 ; Soltis *et al.*, 1999) ceci a été vérifié grâce à l'émergence des marqueurs moléculaires (polymorphisme de la longueur des fragments de restriction RFLP) et de

l'hybridation *in situ* génomique (GISH) qui ont permis d'étudier l'origine de certaines plantes (Leitch *et al.* 1997). Ainsi, il a été suggéré que l'origine polyploïde des plantes est le cas normal et non pas l'exception chez les angiospermes, d'où une hypothèse d'origine polyphylétique a été mise en place pour ces espèces (Soltis *et al.* 1999).

Sur la base d'un nombre limité d'études revues par Soltis et al (Soltis *et al.*, 2000 ; Soltis 2005) des caractéristiques génétiques ont été liées à la polyploïdie :

(1) La polyploïdie à l'échelle individuelle et de population, maintient généralement des niveaux d'hétérozygotie plus élevés que ne le font leurs progénitures diploïdes.

(2) Elle présente moins de dépression de consanguinité que leurs parents diploïdes, et donc ne peuvent pas tolérer des niveaux élevés de l'autofécondation ; cependant, les angiospermes polyploïdes ne diffèrent pas en taux de croisement de leurs parents diploïdes.

(3) La plupart des espèces polyploïdes sont polyphylétiques, ils sont formés à partir de géniteurs diploïdes génétiquement différents. Ainsi, leur diversité génétique est beaucoup plus élevée que prévu par les modèles de formation polyploïde impliquant une origine unique.

(4) À la base des données provenant d'hybridation *in situ* du génome (GISH), polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et de la cartographie des chromosomes, le réarrangement du génome peut être une caractéristique commune des polyploïdes.

(5) Plusieurs groupes de plantes peuvent être des polyploïdes anciens, avec de grandes régions de l'ADN homologue. La duplication des gènes et des génomes peut subir une évolution divergente et crée de nouvelles fonctions.

En résumé, les avantages de la polyploïdie sont les conséquences de la possibilité de faire un meilleur usage de l'hétérozygotie, de l'effet tampon de la redondance génique sur les mutations, et dans certains cas, la facilitation de la reproduction par les moyens d'autofécondation ou asexuée (Comai 2005). Par ailleurs, la polyploïdie est une source de diversité naturellement induite et qui peut répondre à des situations adaptatives.

I.2.1. Classes de polyploïdie

Le premier critère de classification de polyploïdie est le mode d'origine (Ramsey *et al.*, 1998) : ainsi, on utilise le terme «Autopolyploïdie» pour désigner les polyploïdes découlant d'un croisement à l'intérieur ou entre population formée d'une espèce unique, et «Allopolyplodie» pour indiquer les polyploïdes dérivants d'hybride entre espèces, où l'espèce est défini selon son degré d'isolation prés ou post zygotique. Que ça soit autopolyploïdie ou allopolyplodie, les deux sont le résultat de l'union de gamètes non réduits (Soltis *et al.*, 2004) à l'état naturel.

II. Matériel et méthodes

Pour tout comptage de chromosomes, les cellules doivent être en division mitotique, et plus spécialement en métaphase pour que les chromosomes soient bien individualisés. Pour cela, il faut choisir des tissus reconnus pour leurs activités de division cellulaire, d'où notre choix du méristème racinaire.

II.1. Matériel végétal

Les graines issues de trois régions Tissent, Mcissi et N'Koub ont fait l'objet de l'étude cytogénétique. Les graines ont été mises en germination à 25° C dans des boites de Pétri jusqu'au développement d'une radicule de un à deux centimètres de taille, selon le protocole décrit au chapitre de germination. Les racines en croissance active sont excisées toutes à environ 1 cm de la pointe racinaire et collectées dans la solution de prétraitement.

II.2. Préparation des chromosomes

II.2.1. Prétraitement

Les radicules sont prétraitées avec la solution de 8-Hydroxyquinoline (0.0375 %) (Tjio *et al.*, 1950 ; Ganesan *et al.*, 1958) qui bloque l'activité du fuseau mitotique et contracte les chromosomes (Yakar 1952). Deux périodes de traitements ont été testées (2

et 4 heures) afin de déterminer le temps approprié pour accumuler un maximum de cellules au stade métaphase.

II.2.2. Fixation

Après rinçage des radicules deux fois pendant 10 min avec de l'eau distillée et une fois pendant 5 min avec la solution de fixation (méthanol-acide acétique glacial (3:1)), on les incube à 4 °C pendant 24 h dans la solution de fixation (Tlaskal 1979 ; D'Hont *et al.*, 1995).

Les racines fixées sont rincées pendant 10 min avec l'alcool à 70 % pour enlever l'excès du fixateur, puis transférées dans une nouvelle solution d'alcool à 70 % pendant une journée à température ambiante avant d'entamer l'étape d'hydrolyse et de préparation des plaques chromosomiques. Les racines peuvent être stockées dans l'alcool pendant plusieurs années, il faut juste renouveler la solution de temps en temps.

II.2.3. Hydrolyse

Nous avons testé deux types d'hydrolyse ; une chimique à l'aide d'acide chlorhydrique (HCl) 2 N, et une enzymatique. La première permet d'amollir la racine tandis que la deuxième permet la préparation de protoplastes.

➤ Hydrolyse chimique (Schreiber 1951 ; Ganesan *et al.* 1958) : les radicules sont trempées dans une solution d'acide chlorhydrique 2N avec essai de trois temps d'hydrolyse 10 min, 20 min et 40 min pour comparer le degré de ramollissement.

➤ Hydrolyse enzymatique (D'Hont *et al.* 1995 ; Islam-Faridi *et al.*, 1995) : les radicules fixées sont rincées trois fois avec de l'eau distillée pendant 10 min, puis traitée avec HCl 0,2 N pendant 15 min à 20 min, rincées avec l'eau distillée pendant 20 min, suivies d'un lavage avec le tampon citrate 0,1 M pendant 5 à 10 min. Une portion de 2 mm de la pointe racinaire méristématique est coupée sous la loupe binoculaire et transférée dans un tube eppendorf de 1,5 ml contenant la solution enzymatique

(tableau 19) de dégradation de la paroi pecto-cellulosique pour une durée de 25 à 30 min selon l'épaisseur de chaque radicule à 37 °C.

Tableau 19. Composition de la solution enzymatique

	Concentration	Quantité
Cellulase (v/v) (Sigma C2730)	40%	4 ml
Pectinase (v/v) (Sigma P2611)	20%	2 ml
0.1M Citrate buffer		4 ml
Cellulase "Onozuka" RS* (w/v)	3%	0.3g
Macerozyme R-10 (w/v)*	2%	0.2g
Pectolyase Y-23 (w/v)**	1.5%	0.15g

Après trois lavages avec le tampon citrate pour éliminer les traces des enzymes de dégradation, les radicules sont mises dans de l'eau distillée pour entamer la dernière étape qui est la préparation des lames.

II.2.4. Étalement des chromosomes

L'étalement des chromosomes est réalisé avec deux méthodes différentes selon le traitement d'hydrolyse utilisé :

Étalement par écrasement : les radicules hydrolysées avec HCl, sont transférées sur une lame préalablement nettoyée avec de l'alcool, la pointe méristématique est excisée sous la loupe binoculaire transférée sur une autre lame propre contenant une goutte d'acide acétique 45 %, on recouvre avec une lamelle et on l'écrase doucement.

Pour les pointes méristématiques hydrolysées par la solution enzymatique, on dépose 5 µl de la suspension contenant les protoplastes sur une lame bien nettoyée avec de l'alcool, on laisse sécher pendant 30 min à l'air libre. Les lames séchées sont émergées dans l'éthanol absolu pendant 1 heure, puis séchées en les passant sur une flamme d'alcool (sans ébullition) ou à l'air libre.

II.2.5. Technique de coloration des chromosomes

Nous avons réalisé trois colorations différentes, une avec un colorant simple visualisé à la lumière visible sous microscope photonique c'est l'Acéto-Orcéine 1 %, et deux colorants fluorescents l'Iodide de Propidium (IP), et le 4 ',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI). L'excitation des deux derniers colorants se fait avec les lumières ultraviolets laser sous microscope Confocal qui fonctionne en fluorescence, un laser est utilisé comme source de lumière d'où l'appellation de microscope Confocal à balayage laser.

Les lames contenant les pointes racinaires écrasées sont rendues dépourvues de leurs lamelles après un passage bref (30 s) dans le liquide nitrogène, et séchées à l'air libre.

II.2.5.1. Coloration à l'Acéto-Orcéine 1 %

L'Acéto-Orcéine 1 % est à la fois un colorant basique et un colorant acide naturel qui est extrait des lichens à orseille (*Lecanora* et *Rocella*) (Cour 1941). On met 10 µl de la solution colorante fraîchement préparée et filtrée sur la préparation des chromosomes qu'on laisse réagir pendant 15 à 20 min, on recouvre avec une lamelle, on élimine l'excès du colorant et l'on examine sous microscope photonique au grossissement x400. Cette coloration a été appliquée sur les pointes méristématiques hydrolysées avec HCl 2 N.

II.2.5.2. Coloration fluorescente

Il s'agit de colorants fluorescents qui permettent de visualiser spécifiquement l'ADN, car ils s'intercalent entre les bases de la double hélice.

II.2.5.2.1. L'Iodide de propidium

Iodide de propidium est un agent intercalant qui a la caractéristique réversible de s'intercaler entre les bases des ADN et des ARN d'où la nécessité d'un traitement à la RNase avant de procéder à la coloration des lames. Il a un maximum d'absorption et d'émission situé successivement vers 535 nm à 617 nm, le maximum d'excitation étant

décalé d'environ 30 à 40 nm vers le rouge et le maximum d'émission est décalé d'environ 15 nm vers le bleu (Molecular 1999).

a. Protocole de coloration

Étant donné que nous avons réalisé la fixation avec le méthanol : acide acétique glacial 3:1, nous n'avons pas réalisé un traitement avec les RNase comme le prescrit la brochure d'IP.

Les préparations chromosomiques sont équilibrées avec le tampon 2xSSC (0,3 M NaCl, 0,03 M citrate de sodium, pH=7.0) pendant 5 min. Par la suite, on remplace le tampon avec 40 µl d'Iodide de Propidium préparé à partir d'une solution mère de 1 mg/ml, en utilisant la proportion de 1:1000 dans le tampon 2xSSC, on laisse agir pour une durée de 10 min à l'abri de la lumière. On rince trois fois 5 min avec le 2xSSC, on couvre avec une lamelle propre et l'on visualise sous microscope Confocal à balayage laser.

II.2.5.2.2. 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) et hybridation *in situ*

Le DAPI est un colorant cationique fortement fluorescent qui se lie spécifiquement aux régions riches en adénine-thymine des acides désoxyribonucléiques (ADN riche en AT). Le caractère fluorescent permet l'utilisation du DAPI par la microscopie à fluorescence. Il montre une très grande stabilité à la lumière UV. Pour les colorations sur une lame, une exposition de 15 à 20 minutes à 37 °C avec une solution de concentration de 0,1g /ml de DAPI est suffisante pour une bonne coloration. La solution est stable pendant des semaines si elle est conservée au froid. Il présente un maximum d'absorption à 340 nm et un maximum de fluorescence à 488 nm (Technical. *et al.*, 1999)

a. Protocole de coloration

Les lames avec étalement des chromosomes ont été colorées avec le DAPI (4 ', 6-diamidino-2-phénylindole), incluant le Vectashield (antidécolorant). Une petite goutte (8

à 10 µl) de milieu de montage Vectashield avec le DAPI (H-1200, Vector Laboratories, CA, USA) a été appliquée sur chaque préparation, après on recouvre avec une lamelle propre bien nettoyée avec de l'éthanol. Les lames sont ensuite placées dans une grande boîte de Pétri et recouvertes avec du papier aluminium pour empêcher l'exposition lumière. Les préparations de chromosomes ont été visualisées sous l'objectif apochromatique 63X, l'image numérique a été enregistrée à l'aide du microscope à épi-fluorescence (Carl Zeiss, Allemagne) avec jeu de filtres UV (Chroma Technology, VT, USA).

Hybridation *in situ* : Les lames ont été immergées dans une solution de 2 x SSC avec une concentration de 30 µg / ml de RNase pendant 45 min à 37 °C, dénaturées premièrement à 70 °C puis dans du formamide à 70 % dans le 2 x SSC 2,5 min, ensuite déshydratées dans une série d'éthanol 70 %, 85 %, 95 % et 100 % pendant 2 min chacun à -20 °C (1 x SSC est composé de 0,15 M de NaCl, 0,015 M citrate de sodium). Le mélange de sondes a été dénaturé à 80 °C pendant 5 min, puis appliqués aux lames avec un volume de 25 µl, on recouvre d'une lamelle 20 mm x 40 mm. Les lames sont ensuite déplacées dans une chambre humide à 80 °C pendant 7 min, et on laisse incuber pendant une nuit à 37 °C. Le volume de 25 µl de mélange d'hybridation contient 50 % de formamide déionisée, 10 % de sulfate de dextrane, 9 µg d'ADN d'*Escherichia coli*, et 90 ng de sonde d'ADN marqué à la biotine dans la 2 x SSC. Pour le double étiquetage, 90 ng de sonde 18S-28S marquée à la biotine et 90 ng de sonde ADNr 5S marquée au digoxigénine ont été utilisées par lame.

Après une nuit d'incubation à 37 °C, on enlève les lamelles et on procède au rinçage des lames à 40 °C dans : deux fois à 2 x SSC 5 min chacune, 10 min dans le formamide 50 % dans 2 x SSC, puis deux fois dans le 2 x SSC 5 min chacune, et 5 min au 2 x SSC. Le signal de sondes marquées à la biotine a été ensuite amplifié avec les applications séquentielles 30 min de 5 µg / ml de fluorescéine isothiocyanate (FITC)-avidine DCS (Vector) dans 4 x SSC, 0,2 % de Tween 20, 10 µg / ml biotinylé anti-avidine D (Vector) dans 2 x SSC, 0,2 % de Tween 20 et 5 µg / ml d'avidine-FITC à 4 x SSC, 0,2 % Tween 20. Pour les deux sondes de détection, une incubation finale avec 20 µg / ml de rhodamine anti-digoxigénine (Boehringer Mannheim) a été ajoutée. Après chaque étape,

trois lavages ont été effectués dans 4 x SSC, 0,2 % de Tween 20 pendant 5 min chacun à 37 °C.

III. Résultats et discussion

Dans les échantillons issus de la provenance de N'Koub et Tissent, 20 métaphases sont analysées, dont 16 présentaient 104 chromosomes sans ambiguïté, sur les préparations des trois populations deux présentait des cellules avec un nombre différent de chromosomes 54, 65, et 78 avec la coloration à l'Acéto-Orcéine (Fig. 28A, B et C). La coloration avec les colorants fluorescents IP (Fig. 29) et DAPI (Fig. 30) confirme un nombre chromosomique de $2n=8x=104$. La différence est notée entre les préparations chromosomiques réalisées avec un écrasement de la pointe racinaire et la suspension des protoplastes obtenue après hydrolyse enzymatique, dans ces derniers il y avait une seule plaque présentant des cellules avec des nombres différents de chromosomes (manque d'un seul chromosome).

Le nombre de chromosomes a été reporté pour la première fois chez les légumineuses en 1936 (Cooper 1936), où l'auteur a fait une description de 13 espèces de 7 genres. En 1938 dans le cadre d'une étude comparative du nombre des chromosomes des herbacés et des ligneuses, il a été noté que chez les légumineuses, le nombre de base le plus fréquent parmi les genres herbacés était 8, tandis que 9, 10, 12, et 13 ont été enregistrés pour les genres ligneux, dont *Acacia* n=13 fait partie (Stebbins 1938), les genres différents d'une même famille présentaient des écarts significatifs (Stebbins 1938). La comparaison du nombre de chromosomes au niveau des racines et des nodules chez des *Acacia*, a révélé un dédoublement au niveau des nodules, qui a été liée à leur caractère de fixateur de l'azote (Wipf 1939).

Le degré de polyplioïdie n'a apporté aucun lien avec l'adaptation morphologique chez *Acacia*, cependant les espèces de l'Afrique et de l'Asie montraient une tendance de polyplioïdie, à l'encontre des espèces australienne et américaine qui étaient diploïdes (Atchison 1948 ; Tjio 1948). Aucune division polyplioïde n'a été observée au niveau de la région méristématique des racines secondaires.

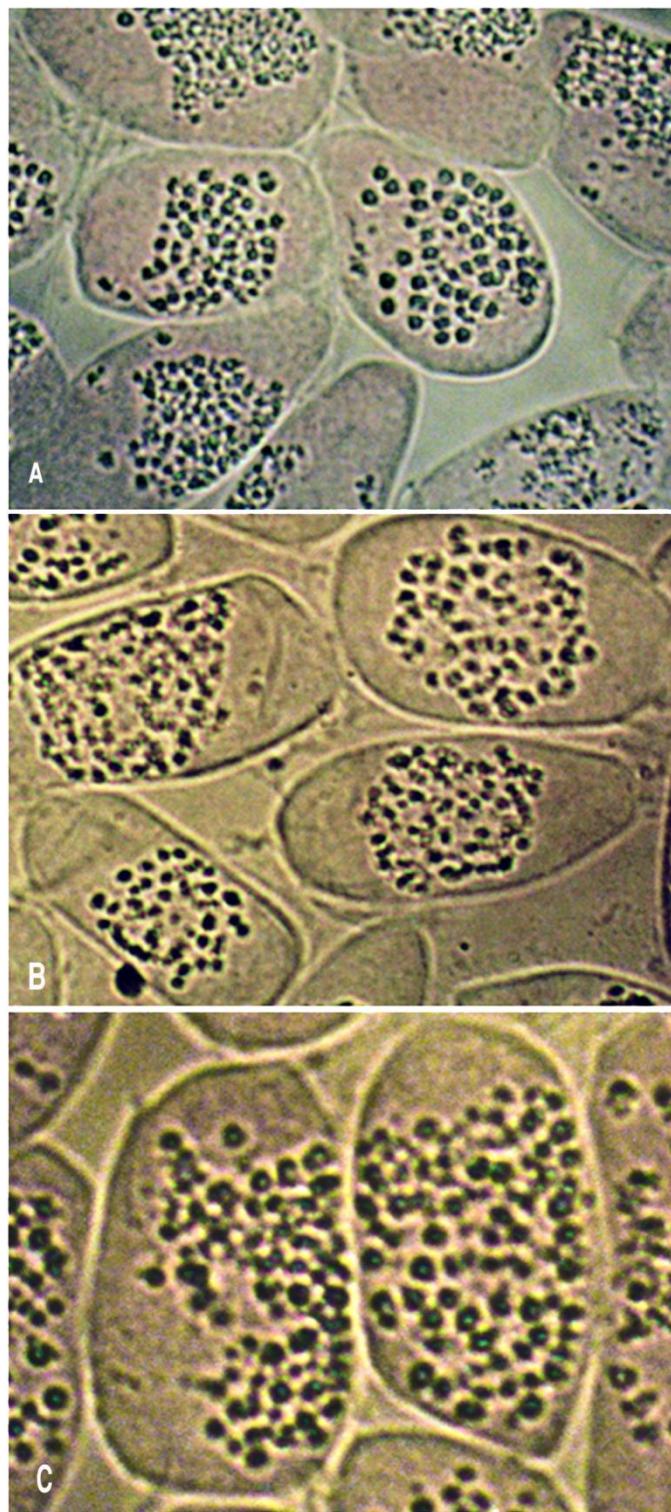


Fig.28. Coloration Acéto-Orcéine A. cellules en métaphase $2n=52 \pm 2$, B. cellules en prométaphase $2n=64 \pm 2$, C. cellules en métaphase $2n=78 \pm 2$. Gx400.

La détection de polyploidie a été jumelée avec des radicules dont la taille est comprise entre 2 à 30 mm pour le genre *Albezzia*, la fréquence diminue avec la longueur de la radicule (Berger *et al.*, 1950 ; Berger *et al.*, 1958).

L'hypothèse d'un niveau octaploïde a été avancée pour *Acacia tortilis* subsp *raddiana* de Mauritanie, Algérie, Sénégal et Palestine. En 1975, une note a été publiée sur de nouveaux nombres de chromosomes chez le genre Acacia, avec un exemple d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* de Mauritanie avec $2n=8x=104$ (Hamant *et al.*, 1975). D'autres études ont reporté le même chiffre au Soudan (Bukhari 1997), au Palestine, Sénégal et Niger. Quant au Kenya, Oballa *et al.*, (1993) a reporté un nombre chromosomique de $2n=4x=52$.

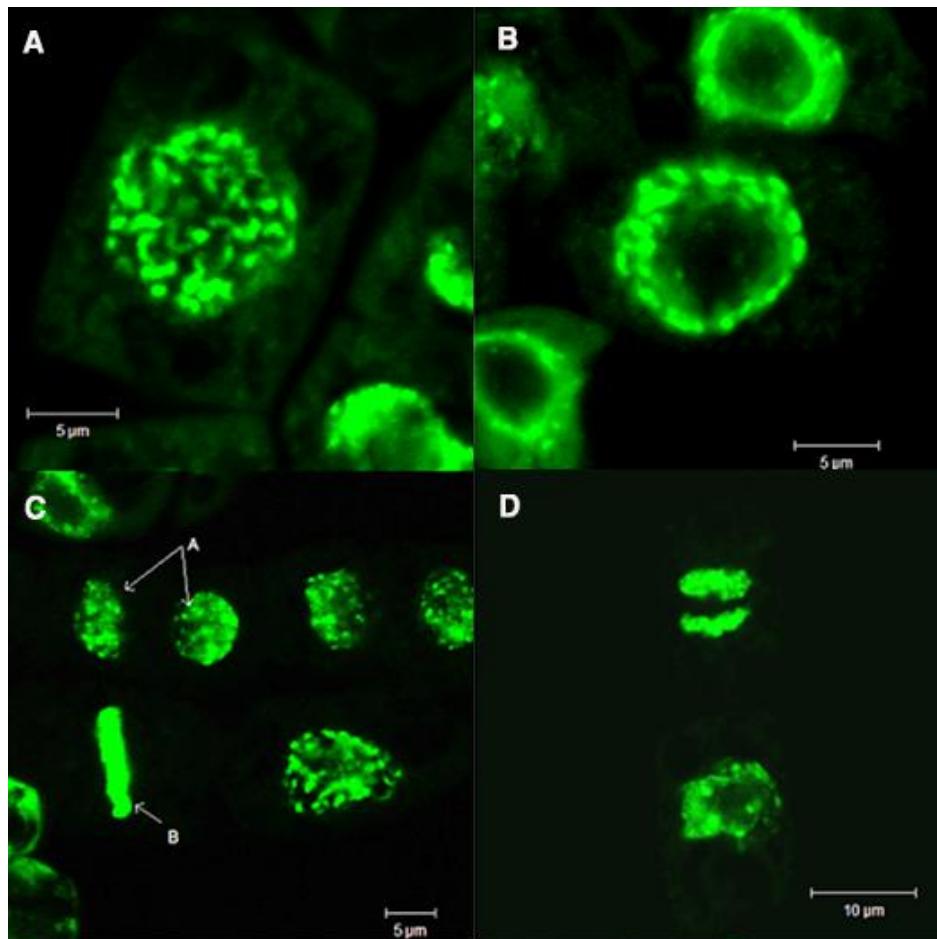


Fig.29. Coloration avec Iodide de propidium (A. télophase, B. métaphase)

Notre étude est la première à mettre en évidence le nombre de chromosomes de cette espèce au Maroc. La polyploïdie est bien développée dans le sous-genre *Acacia tortilis* subsp *raddiana* avec un nombre de base $x= 13$ (Guinet *et al.* 1978). Avec la découverte de populations tétraploïde et octaploïdes au Maroc, une question se pose sur le sens de l'évolution de la polyploïdie de cette espèce au Nord d'Afrique notamment par rapport aux populations tunisiennes qui ont été déclarées diploïdes et tétraploïdes (El Ferchichi Ouarda *et al.*, 2009), à savoir que l'étude est venue compléter une étude antérieure dans le même pays qui a annoncé l'octaploïdie El Ferchichi (1997) in.(El Ferchichi Ouarda *et al.* 2009). Si on reconstitue la carte de distribution des *Acacia tortilis* subsp *raddiana* selon le nombre chromosomique, on va trouver que seule la Tunisie qui est localisée au centre du Nord d'Afrique présente des populations tétraploïdes, et tous les pays qui l'entourent présentent des populations octaploïdes. De ce fait, on peut bien se permettre de conclure que les isolats de la Tunisie sont les moins évolués en conservant un nombre de chromosomes $2n=4x=52$ et $2n=2x=26$ par rapport aux autres pays, alors que les peuplements *Acacias* marocains peuvent être en état de transition de polyploïdie tétraploïde au octaploïde.

Des études sur les espèces polyploïdes ont mis en évidence que la formation des polyploïdes est un processus répété de façon continue (Leitch *et al.* 1997 ; Soltis *et al.* 1999 ; Soltis *et al.* 2004 ; Soltis 2005 ; Parisod *et al.*, 2010). La présence de certaines plaques avec $2n=52$ et $2n = 104$ chromosomes sur des *Acacias tortilis* subsp *raddiana* au Maroc nous laisse à ouvrir l'hypothèse d'un second phénomène d'autopolyploïdie de cette espèce dans cette région, sachant qu'un individu a reproduction sexuée nouvellement octaploïde au sein d'une population tétraploïde a de forte chance d'avoir une descendance hexaploïde, car ses partenaires sont généralement des tétraploïdes.

Habituellement, les polyploïdes sont connus par leur tendance de diminution de fertilité (Comai 2005 ; Parisod *et al.* 2010) et de viabilité à cause soit des perturbations que connaissent leurs chromosomes lors de la ségrégation pendant la division mitotique, la méiose, et ou de celle due à l'expression de gène causée par le dosage des gènes altérés et des gènes «silencing» (Yu *et al.*, 2009). Hegarty et ses collaborateurs (Hegarty *et al.*, 2008) reportent que pour les espèces nouvellement polyploïdes, leur chance de

croisement avec des polyploïdes est rare, ainsi pour s'échapper à leur élimination, l'autofécondation et la reproduction asexuée (exemple apomixie) peuvent être développées. Cependant, pour les autopolypliodes, les croisements restent plus fréquents ce qui peut expliquer la coexistence des formes hexaploïdes et pentaploïdes qui restent un constat dont il faut approfondir l'étude pour le valider, en réalisant des échantillonnages stratifiés entre les peuplements où les hybrides seront plus favorisés.

L'avantage tiré de la polyploidie et en particulier la tétraploidie, repose sur le fait que les organismes peuvent avoir recours à un plus grand nombre de gènes et une augmentation du nombre de variant alléliques. Cela est considéré comme intéressant pour le métabolisme des plantes en termes des taux de synthèse et ou la variabilité des composés métaboliques qu'ils produisent (Yu *et al.* 2009). Les gènes dupliqués ont trois devenirs : ils peuvent être perdus, conservés ou maintenus en copies qui font souvent l'objet d'une Néo-fonctionnalisation ou Sous fonctionnalisation (Comai 2005).

Dans le cadre de l'expression des gènes après hybridation de type allotétrapiode, il a été démontré que certains gènes passent à l'état de gène «silencing», qui après une accumulation de mutations ils sont perdus (Hegarty *et al.* 2008), ceci a été vérifié dans plusieurs études connectées aux allopolypliodes, mais qu'est-ce qui se passe pour autopolypliodes ? L'hybridation *in situ* de rDNA 18S-28S réalisée sur deux variétés de *Parnassia palustris* L. var. *palustris* et var. *condensata* Travis & Wheldon (Celastraceae) tétraploïdes, a montré que ces derniers ont le même nombre de copie de ces gènes que leur homologue diploïde (Gornall *et al.*, 2011). L'hybridation *in situ* des sondes rDNA 5S et 18S-28S sur les plaques *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* $2n=8x=104$ qui est une espèce supposée autopolypliodes, et si on considère uniquement les grands signaux, on a révélé la présence de deux sites d'hybridations pour chacun des gènes (Fig.31). Alors que, si on prend en considération les petits signaux, on va rencontrer deux cas, une plaque avec trois sites (Fig.32. A), et une autre représentée par la Fig.32 B avec 5 sites 5S et 4 sites de 18S-28S. Ces observations remettent en question le dédoublement du nombre de gènes chez les autopolypliodes qui est proportionnel à la duplication des chromosomes, et de la rétention préférentielle des gènes intervenant dans la transcription et la traduction (Adams *et al.*, 2005). Les données disponibles sur les autopolypliodes suggèrent que ces

derniers ne subissent pas de changement notable ni dans leurs structures génomiques ni dans leurs expressions de gènes pendant les premières générations, mais ceci peut se produire dans les générations suivantes (Parisod *et al.* 2010).

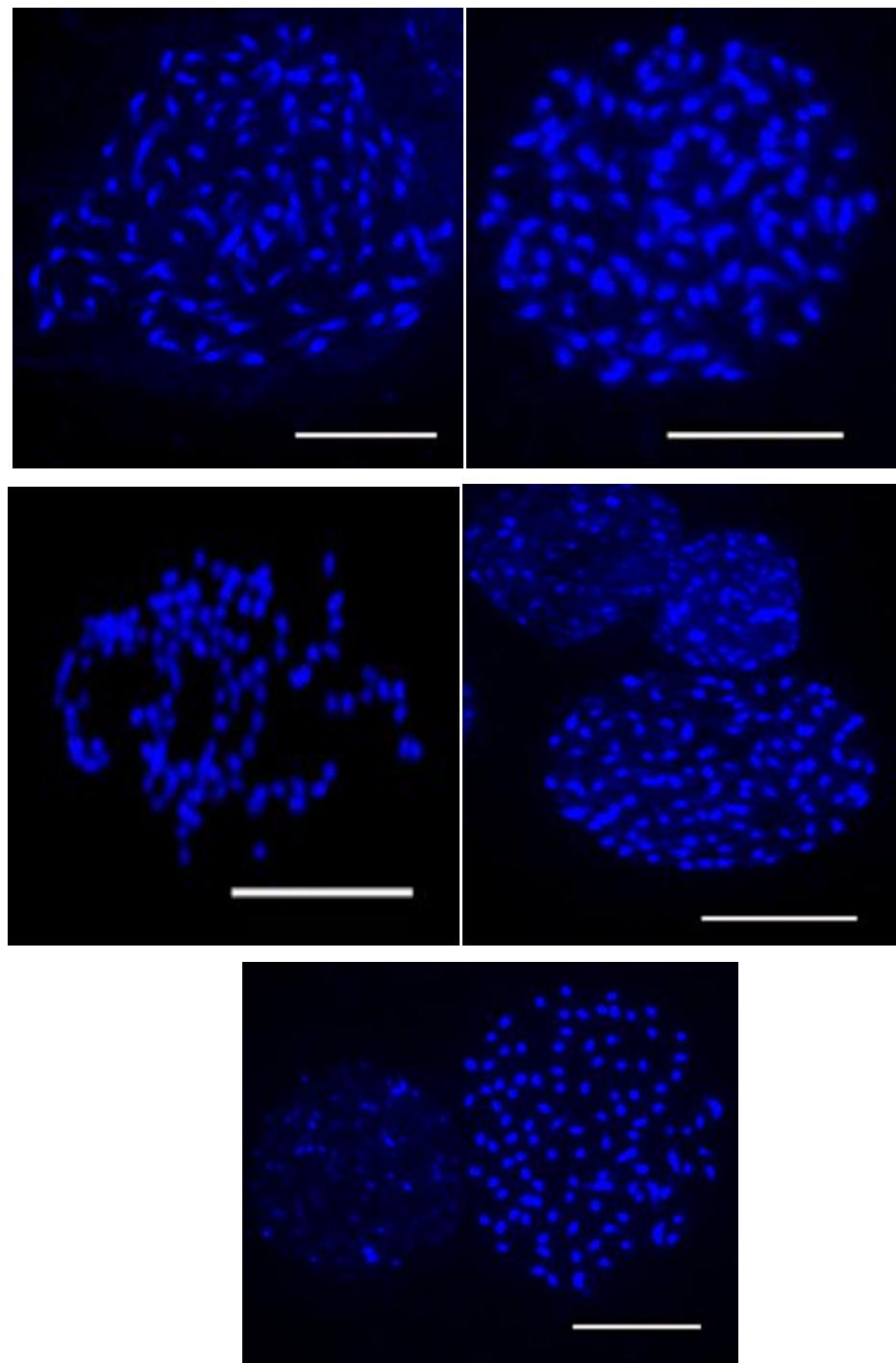


Fig.30. Coloration au DAPI (échelle représente 5 µm).

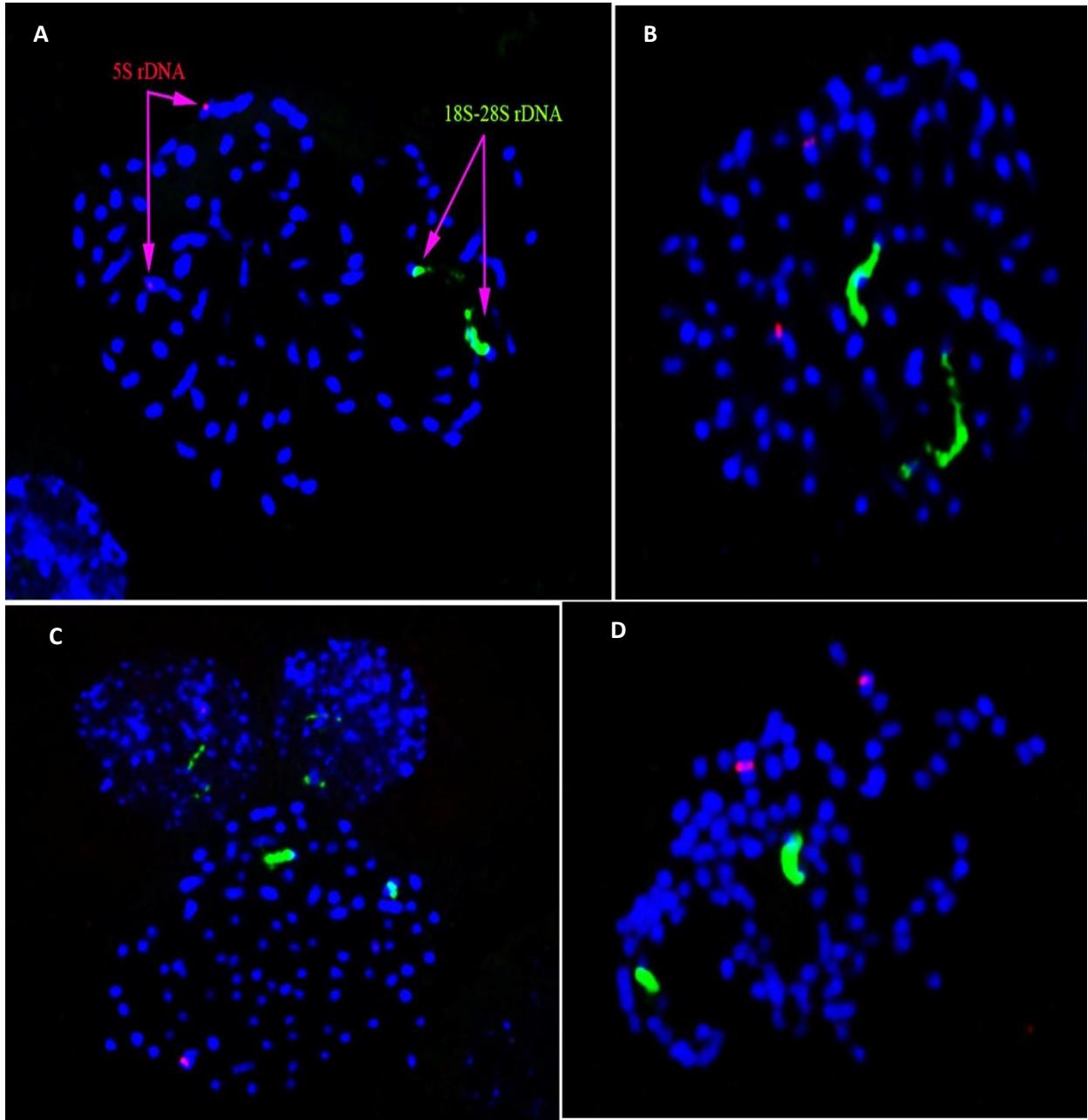


Fig.31. Distribution des rDNA 5S, 18S et 28 S au niveau des chromosomes d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana*

L'absence des sites à très faible signal sur les plaques peut être expliquée par le nombre insuffisant de répétitions des copies de rDNA auxquelles les sondes sont hybridées, et par suite il reste en dessous du seuil détecté par la FISH. La diminution du nombre de copies de rDNA ne peut avoir lieu que suite à une translocation délétion ou fusion (Gornall *et al.* 2011). Une étude réalisée sur les autotétraploïdes synthétiques a révélé que ces derniers ont perdu 17 % de leur ADN à la troisième génération (Raina *et al.*, 1994). Ce résultat nous laisse supposé qu'après dédoublement des chromosomes chez certains autopolyplioïdes, un système de restauration du nombre de gènes de leur homologue diploïde est déclenché. La perte de gènes a été observée chez les allopolyplioïdes, elle se produit dans les premières générations, juste après hybridation ou dédoublement des chromosomes dans le but de favoriser un équilibre génétique, ainsi il contribue d'une façon irréversible dans la diploïdisation de nouveau amphiploïdes (Kashkush *et al.*, 2002).

Des études sur la spéciation par les allopolyplioïdes ont suggéré que cette dernière se fait par le biais de la perte d'ADN touchant les séquences moins répétitives, le plus probable celles qui sont non codantes (Feldman *et al.*, 1997), et elle se fait d'une manière équilibrée au niveau de l'ensemble des chromosomes en dehors de leur taille, ainsi que ça soit un petit ou un grand chromosome, les deux perdent la même quantité (Raina *et al.* 1994). Par ailleurs, une étude ultérieure serait nécessaire à mener dans le complexe d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* comprenant les espèces diploïdes, tétraploïdes et octaploïdes des différents pays abritant cette espèce pour comprendre son processus évolutif qui peut être la source du schéma de variation qu'elle montre actuellement d'une part, et de chercher d'éventuelles relations avec des critères d'adaptation aux stress biotiques ou abiotiques, et des caractères d'intérêts agro-sylvo-socio-économiques d'autre part.

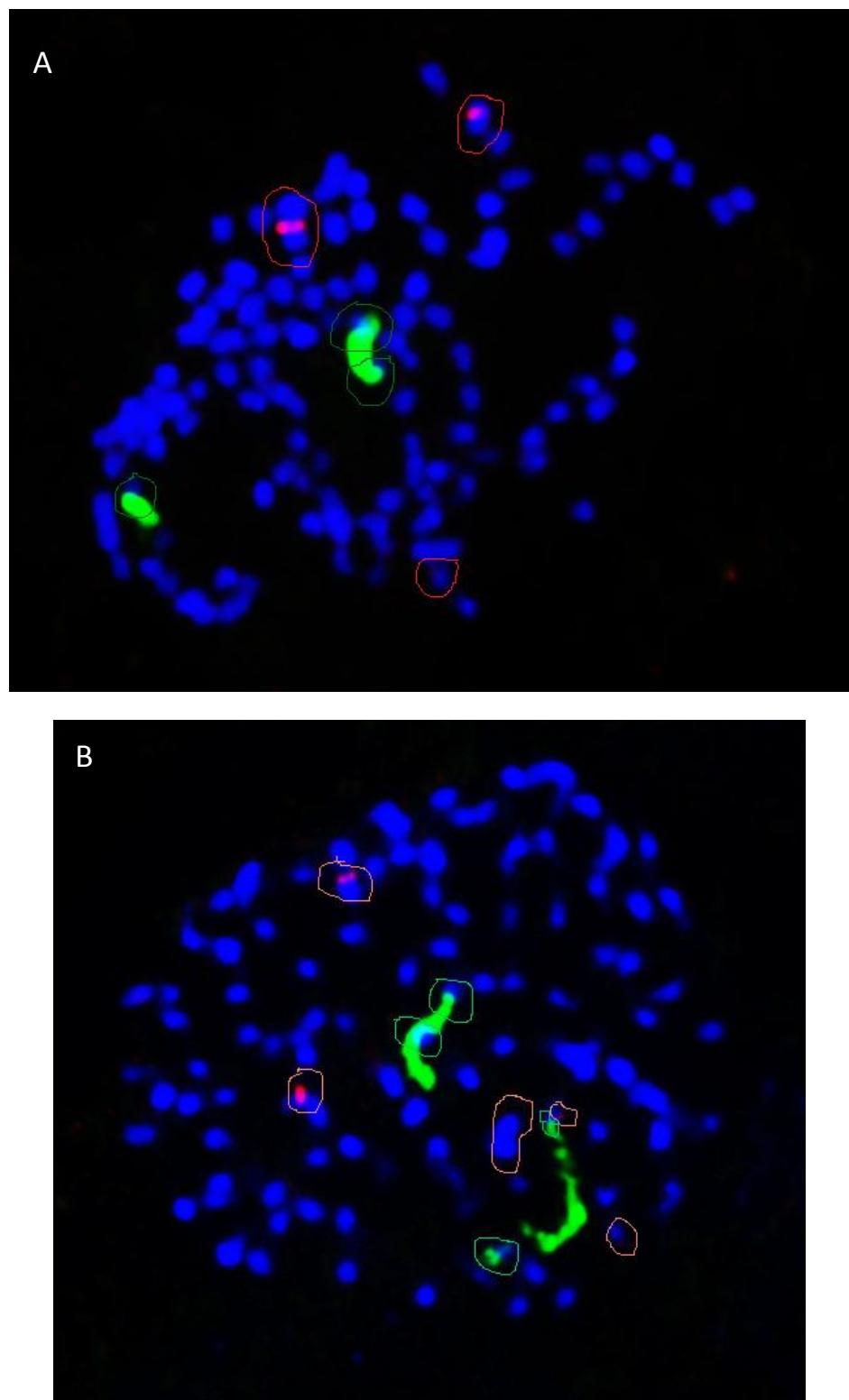


Fig.32. Les signaux faibles des rDNA sur *Acacia tortilis* subsp *raddiana* (les sites rouges 5S, les sites verts 18S-28S) A. 3 sites 5S et 3 sites 18S-28S, B. 5 sites 5S et 4 sites 18S-28S

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence la présence de la polyploïdie, notamment l'octaploïdie ($2n=104$ chromosomes) chez *Acacia tortilis* subsp *raddiana* du Maroc à l'aide de la coloration simple Acéto-Orcéine et la coloration par florescence à l'iodide de propidium et le DAPI.

La technique d'écrasement de racines hydrolysées par l'acide chlorhydrique 2N pendant 10 min à 20 min, ensuite colorer par l'Acéto-Orcéine 1 % s'avère suffisante pour le dénombrement des chromosomes sous microscope photonique. Cependant, ce protocole requiert une expertise des minutages des trois premières étapes, qui sont : i) la récolte des radicules que nous avons réalisée le matin entre 8h30 et 10h où on a remarqué une activité cellulaire importante. ii) le prétraitement avec le 8-hydroxyquinoline (0.0375 %) pendant 2h qui permet d'avoir un culminant important de cellules en métaphase, ii) L'hydrolyse chimique avec l'acide chlorhydrique 2N pendant 10 min à 20 min.

L'utilisation d'une suspension de protoplastes suite à une hydrolyse enzymatique reste la meilleure technique pour garantir un étalement de cellules le plus facile à réaliser avec absence du risque d'éclatement des cellules qui provoque un débordement des chromosomes de leurs compartiments, sauf que son coût demeure plus élevé que l'hydrolyse chimique.

La préparation des plaques nous a permis de distinguer les niveaux de polyploïdie : pentaploïde $2n=5x=64\pm 2$, hexaploïde $2n=6x=78\pm 2$ et octaploïde $2n=8x=104$, ce que peut avoir un impact sur la capacité d'adaptabilité des individus des populations aux conditions climatiques et édaphiques.

L'hybridation *in situ* nous a permis de déceler que les espèces octaploïdes présentent quatre sites des rDNA 5S et 18S-28S positionnés sur quatre chromosome, ce qui suggère une perte de certains sites avec le dédoublement des chromosomes. La présence de sites d'hybridations avec un signal faible témoigne de la présence préalable de ces sites au niveau des autres chromosomes, mais peut être sous l'effet de remaniements intrachromosomiques (délétion fusion ou translocation), ils ont perdu un nombre important de leur copie ce qui les rendent sous le seuil détectable. Ces

phénomènes qui se produisent généralement dans les premières générations après une hybridation ou dédoublement des chromosomes nous permettent de lancer l'hypothèse d'un événement de polyploidie récent chez cette espèce à cette région. En outre, une étude cytogénétique approfondie selon un échantillonnage ciblé par typologie de l'arbre, s'avère indispensable afin de mieux comprendre son patron évolutif.

E. Chapitre 4

Développement de marqueurs moléculaires EST-SSR et application à l'étude de la structure génétique *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana*.

Résumé

Les microsatellites sont des marqueurs informatifs dans l'étude de la génétique des populations. Cependant, leur développement constitue un investissement couteux en terme financier et de temps. Avec le progrès des études génomiques, une nouvelle source alternative de l'isolement des microsatellites a été utilisée, c'est l'identification de microsatellites à partir des Étiquettes de Séquence Exprimées (EST). Il s'agit dans cette étude de faire une première contribution à l'analyse de la diversité génétique de six provenances *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* du Maroc, en développant des microsatellites à partir d'EST. Nous avons utilisé deux lots de séquences disponibles sur Genbank codantes, issues de l'assemblage de 9110 EST développés sur *Acacia mangium*, et 2459 sur l'hybride *Acacia auriculiformis* x *Acacia mangium* pour détecter l'ensemble des sites SSR. L'analyse bioinformatique a permis de retenir 46 marqueurs, dont trois sont polymorphes. Ainsi, 50 haplotypes ont pu être identifiés. La diversité intra-provenance est très importante, elle est de l'ordre de 0,432 sous l'hypothèse de l'équilibre Hardy Weinberg. La variation intra-provenance représente 96 % de la variation totale (test AMOVA). La différenciation génétique inter-provenances ($G_{ST}=0,03$) est très faible ce qui reflète le niveau élevé du brassage génique entre les peuplements. De plus, le test de Mantel a montré une divergence entre la distance génétique et la distance géographique ($r = -0,06$; $p\text{-value} = 0,556$) ce qui traduit son indépendance de sa répartition spatiale. Ces résultats apportent des informations de base et présentent une première contribution à l'étude de la structure génétique *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* au Maroc, d'où nous suggérons une profonde investigation en développant des marqueurs microsatellites génomiques spécifiques pour cette espèce.

Mots clés : *Acacia tortilis* subsp *raddiana* - microsatellites SSR-EST - diversité – différenciation-

Introduction

Dans le monde des arbres, la description de la variabilité à l'aide des caractères adaptatifs est souvent complétée par des caractères neutres vis-à-vis des fluctuations de l'environnement. Les premiers sont basés sur des caractères qualitatifs (i.e., forme des fruits, de l'arbre..) ou quantitatifs (rendement, poids ; dimensions des parties de l'arbre, de fruits ; phénologie...) et permettent une évaluation des potentialités adaptatives à différents niveaux de structuration de l'espèce étudiée. Ainsi, plusieurs collections de ressources phytogénétiques ont été construites sur cette stratégie (i.e., collections SODEA au Maroc ou Vasal en France ; OWGB Marrakech : collection de variétés d'oliviers mondiale à Tassaoute). Elles constituent une réserve qui préserve le potentiel de création pour des variétés nouvelles présentant un ensemble inédit de caractéristiques notamment chez les espèces sauvages. Par ailleurs, l'observation morphologique est la base de la description du matériel végétal ; elle est simple et facile à pratiquer. Cependant, elle manque de précision à cause de la variation importante de l'expression des caractères observés due à une interaction «génotype environnement », au manque des caractères discriminants. Les marqueurs biochimiques ont ainsi été utilisés pour la description du matériel végétal et pour l'identification variétale. Toutefois, ces marqueurs ont également leurs limites: faible nombre accessible, faible polymorphisme et influence du stade physiologique (Zhang 2002). Les marqueurs moléculaires (aussi qualifiés comme des marqueurs génétiques) constituent des outils plus performants et ont été développés depuis une vingtaine d'années. Ils sont utilisés pour leur capacité à générer du polymorphisme (de séquence, d'insertion délétion et de nombre d'unités de répétitions). Par ailleurs, le caractère co-dominant de certains marqueurs permet de visualiser tous les allèles. L'évolution des techniques moléculaires, en complément des descripteurs morphologiques, apporte actuellement un grand nombre d'outils basés sur l'étude du polymorphisme de l'ADN. En effet, ces outils sont utilisés pour l'analyse des ressources génétiques et dans les programmes d'amélioration des plantes (Santoni *et al.*, 2000). De nombreuses techniques sont actuellement disponibles et leur utilisation dépend du degré d'information que l'on souhaite obtenir (Siret 2001). Les marqueurs moléculaires communément utilisés sont les marqueurs RAPD (Random Amplified Ploymorphims DNA), les marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), les marqueurs AFLP (Amplified Fragement Lengh Plymorphism) et les microsatellites.

Par conséquent, la caractérisation de ressources phytogénétiques *via* l'approche phénotypique et moléculaire constitue une démarche primordiale à la gestion et la conservation de la diversité pour la sélection des variétés de demain et faire la distinction entre les génotypes qui sont pertinents pour un caractère d'intérêt en amélioration génétique.

L'objectif de ce chapitre est de rechercher en premier temps des marqueurs SSR-EST à partir de séquences codantes d'espèces proches d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* disponibles sur Genbank et ensuite, de les adapter comme marqueurs neutres polymorphes pour l'étude de la diversité génétique des *Acacia tortilis* subsp *raddiana* du Maroc. Les résultats attendus permettront d'avoir une première connaissance sur la structuration génétique des peuplements d'Acacias sahariens, afin d'envisager une stratégie de gestion de cette ressource génétique.

I. Synthèse bibliographique

I.1. Les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires constituent une nouvelle génération de marqueurs génétiques qui ont été fournis par l'utilisation de l'ADN (Ziegenhagen *et al.*, 2005). Un marqueur génétique par définition, implique les principes de l'évolution : un trait variable ou un phénotype est défini comme marqueur génétique lorsque la relation entre le phénotype et le génotype sous-jacent est clairement déterminée par l'analyse de descendance (Gillet 1999). Les marqueurs moléculaires quant à eux permettent d'observer, de façon plus ou moins fine, le polymorphisme de séquence de l'ADN de sites ou de locus répartis sur le génome. Ce polymorphisme est détecté soit directement sur des séquences codantes ou non codantes de la molécule d'ADN, d'où le nom de marqueurs moléculaire, ou indirectement sur les séquences de certaines protéines qui révèlent le polymorphisme des séquences d'ADN, à partir desquelles elles sont traduites, dans ce cas on parle des marqueurs biochimiques (Tanksley 1983). Ils constituent un outil puissant pour étudier la structuration de la variabilité génétique au sein d'une espèce et retracer son histoire évolutive. On admet en général qu'ils révèlent un polymorphisme neutre non soumis à la sélection (Rand 1996).

I.2. Techniques de détection du polymorphisme des séquences

I.2.1. Marqueurs biochimiques

I.2.1.1. Allozymes

L'étude de la diversité génétique dans les populations végétales a été grandement facilitée par le développement de marqueurs à base de protéines comme les allozymes (Loveless *et al.*, 1984 ; Hamrick *et al.*, 1990 ; Chung *et al.*, 2012 ; Flight *et al.*, 2012 ; Glasenapp *et al.*, 2012 ; Zhou *et al.*, 2012) qui ont été largement utilisées pour caractériser les patrons de variation génétique au sein et entre les populations, et d'examiner les processus de dispersion et les modes de reproduction qui influencent les niveaux de la différenciation génétique, ainsi, ils demeurent l'outil le plus approprié pour répondre aux questions de la biologie des populations végétales (Cruzan 1998). Ces marqueurs ont été appliqués sur les espèces d'*Acacia* d'Afrique et d'Australie, et ils ont fourni des données utiles pour la sélection végétale et l'établissement des programmes de conservation (Playford *et al.*, 1993 ; Mandal *et al.*, 1994 ; Mandal *et al.*, 1995 ; M. McGranahanl *et al.*, 1997 ; Dangasuk *et al.*, 2000 ; Ng *et al.*, 2009). Il a été mis en évidence chez *Acacia tortilis* subsp *raddiana* 13 locus et 40 allèles, soit en moyenne 2,5 allèles par locus polymorphe (Olng'otie 1991), la diversité génétique attendue était de l'ordre de 0,49, alors que le coefficient de différenciation génétique entre populations n'est que de 0,025 (Cardoso 1995). Cardoso (1995) a mis en évidence 6 locus et 20 allèles, soit 2,4 allèles par locus polymorphe chez la même sous-espèce *raddiana*. Cette diversité élevée est attribuée à l'hérédité tétrasomique. La variabilité génétique d'*A. tortilis* dépasse celle de l'ensemble des espèces africaines, qui sont en moyenne nettement plus variable que les espèces australiennes, avec un taux de polymorphisme de 79 % contre 47 % et une diversité génétique plus du double. La structuration de la variabilité mesurée par le G_{ST} varie de 2,5 % (Cardoso 1995) à 11 % pour *raddiana* (Olng'otie 1991).

Cependant, le développement des marqueurs moléculaire à base d'ADN (Karp *et al.*, 1996 ; Jones *et al.*, 1997 ; Khandka *et al.*, 1997) a révolutionné ce domaine au cours des dernières années, car il présente un polymorphisme de haut niveau, de plus ils ne sont pas sensibles au phénomène de la sélection (Jenczewski *et al.*, 1999).

I.2.2. Marqueurs moléculaires à base d'ADN

I.2.2.1. Marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)

Les marqueurs RAPD (Williams *et al.*, 1990 ; Hadrys *et al.*, 1992) sont représentés sur le génome en nombre illimité, généralement très polymorphe, dont la plupart d'entre eux sont considérés comme non codants et révélés en masse (dominants). Ils impliquent l'utilisation d'une seule « amorce arbitraire décamère » dans une réaction PCR. Le résultat consiste en une amplification de plusieurs fragments distincts. Chaque produit est dérivé d'une région du génome qui contient deux segments courts avec une orientation inversée sur les deux brins opposés, qui sont complémentaires de l'amorce. Les produits d'amplification sont séparés sur des gels d'agarose, en présence de bromure d'éthidium et visualisé sous une lumière ultraviolette (Williams *et al.* 1990 ; Karp *et al.* 1996). Il est largement reconnu que, pour obtenir des profils reproductibles sur les gels, il est absolument essentiel de maintenir des conditions de réaction homogènes. De nombreuses études ont rapporté les effets distincts de la modification des différents paramètres de PCR telle que: le ratio de la matrice d'ADN et l'amorce, la concentration de la Taq polymérase et de MgCl₂ sur les bandes obtenues (Devos *et al.*, 1992 ; Pammi *et al.*, 1994). De ce fait, cette technique a été largement critiquée du point de vue reproductibilité entre laboratoires, qui reste faible par rapport aux autres techniques moléculaires (Karp *et al.* 1996 ; Jones *et al.* 1997). Toutefois, les données de l'analyse RAPD ont indiqué que leur diversité est généralement supérieure à la diversité des allozymes chez les espèces végétales.

Chez *Acacia tortilis* subsp *raddiana* cette technique a été appliquée pour étudier la structure génétique de populations isolées dans la région de Nejev en exploitant 18 amorces (Shrestha *et al.*, 2002). Ces derniers ont révélé 290 marqueurs dont 90,69 % présente un polymorphisme. Certaines populations ont présenté des allèles qui lui sont spécifiques soit un pourcentage de 14,89 % des allèles totaux. De ce fait, la variation inter-population était très importante de l'ordre de 59,4 %.

I.2.2.2. Polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés

Les marqueurs AFLP rentrent dans la catégorie des marqueurs anonymes tels que les RAPD, ils produisent des marqueurs dialléliques avec un allèle dominant. Ils permettent de concevoir des marqueurs génétiques sans développement antérieur. Ils consistent à la recherche de bandes polymorphes entre les individus dans un profil multi bandes. Ces marqueurs sont le

résultat d'une digestion enzymatique de l'ensemble de l'ADN génomique, puis amplification PCR sélective des fragments de restriction (Vos *et al.*, 1995). Il est bien adapté à la réalisation de cartes génétiques des espèces non encore cartographiées, en raison du gain de temps et d'argent qu'apporte leur utilisation en comparaison avec les marqueurs microsatellites non encore développés et l'étude de la diversité génétique (Powell *et al.*, 1996b ; Angiolillo *et al.*, 1999 ; Pometti *et al.*, 2012) . Il a été adapté pour les espèces avec de grandes tailles de l'ADN génomique (Han *et al.*, 1999), et ou polyploïde (McNeil *et al.*, 2011). Pour augmenter sa réussite en termes d'élaboration de cartes génétiques chez les espèces polyploïdes, la technique a été améliorée en combinant les microsatellites et les AFLP M-AFLP (Albertini *et al.*, 2003).

À titre d'exemple pour son application sur les *Acacia*, on note les travaux de structuration de la variation génétique chez *Acacia auriculiformis* (Zhang *et al.*, 2001), l'analyse phylogénétique *d'Acacia sénégal* (Sirelkhatem *et al.*, 2009) et l'évaluation de la diversité génétique des habitats nouvellement restaurés (Krauss *et al.*, 2006 ; Ottewell *et al.*, 2011).

Cependant la dominance des marqueurs AFLP et RAPD, font d'eux des marqueurs moins informatifs sur : la structure génétique des populations surtout de sa composition hétérozygote, et la recherche des variantes fonctionnelles des gènes pertinents.

I.2.2.3. Les microsatellites (SSR)

I.2.2.3.1. Caractéristiques des SSR

Les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat) sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono, di, tri ou tétra-nucléotidiques. Les plus courantes sont (A) n , (AT) n , (GA) n , (GT) n , (TAT) n , (GATA) n , (Santoni *et al.* 2000). Outre leur distribution sur l'ensemble du génome, l'intérêt en génétique des microsatellites réside dans leur polymorphisme extrêmement élevé sous forme de nombre des unités de répétition qui constituent la séquence microsatellite. Les crossing-over asymétriques peuvent être une des origines de ce fort polymorphisme des microsatellites, mais ils sont très peu présents dans les séquences codantes (Kijas *et al.*, 1994).

Les régions flanquantes de microsatellite, sont conservées ce qui permet de les amplifier par PCR (Weising *et al.*, 1995) à l'aide de deux amorces spécifiques (sens et anti-sens) (Akkaya *et al.*, 1992). Ils constituent une autre génération des marqueurs moléculaires, connus pour leur taux de mutations élevé, ceci est vérifié sur les différences de taille entre deux allèles pour un individu donné (Powell *et al.*, 1996a). La diversité de la taille résulte d'une différence de nombre de répétition du motif SSR (Akkaya *et al.* 1992). L'unicité et la valeur des microsatellites résultent de leur polyallélisme (Tautz 1989 ; Akkaya *et al.* 1992), codominance (Morgante *et al.*, 1993), facilité de détection par PCR, abondance relative, large répartition dans l'ensemble du génome (Powell *et al.* 1996a ; Powell *et al.* 1996b). Leur révolution dans le règne végétal a débuté avec la découverte de leur polymorphisme chez le *Soja* (Akkaya *et al.* 1992).

I.2.2.3.2. Faisabilité d'application des SSR sur le règne végétal

À l'issu d'une enquête réalisée sur les séquences d'ADN des plantes supérieures, il a été découvert que les séquences microsatellites sont présents, fréquents et largement distribués chez 34 espèces, avec une fréquence d'un motif tous les 50 kb, et une abondance importante du motif (AT) n (Morgante *et al.* 1993). L'exploitation du polymorphisme par les marqueurs microsatellites nécessite la détection de leurs sites sur le génome, et le développement d'amorces spécifique (Brown *et al.*, 1996). Depuis leur découverte, ils ont constitué un moyen de choix des généticiens pour la conception des cartes génétiques (Hearne *et al.*, 1992 ; Dib *et al.*, 1996 ;

Cheng *et al.*, 2009 ; Jaari *et al.*, 2009) et pour l'étude de la structure génétique des populations (Aldrich *et al.*, 1998 ; Dayanandan *et al.*, 1999 ; Collevatti *et al.*, 2001 ; Lemes *et al.*, 2003 ; Gutierrez *et al.*, 2005 ; Barkley *et al.*, 2006 ; Ma *et al.*, 2009 ; Sharma *et al.*, 2009 ; Tanaka *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012). Ils ont permis aussi l'étude des flux du pollen et des gènes, en retracant les trajectoires des pollens fécondatrices et les origines parentales, et de juger la nécessité d'établissement des programmes de protection et de conservation des espèces (Di Vecchi-Staraz *et al.*, 2009 ; Kamm *et al.*, 2009 ; Salvini *et al.*, 2009 ; Slavov *et al.*, 2009 ; Ashley 2010).

I.2.2.3.3. Aperçu sur des microsatellites isolés chez les *Acacia*

Chez les *Acacia*, un ensemble de microsatellites ont été développés pour mieux comprendre la structure génétique des espèces de ce taxon (Tableau 20). Le développement de 33 marqueurs microsatellites pour *Acacia mangium* a fourni des marqueurs hautement informatifs pour la cartographie génétique de cette espèce. La grande variabilité de ces marqueurs par rapport aux RFLP et aux allozymes a augmenté le pouvoir de distinction génétique entre les individus étudiés. Par conséquent, ils pourraient être exploités pour estimer la contamination pollinique dans les semences, les taux de consanguinité et le succès de la pollinisation en masse, afin de déterminer le régime approprié d'accouplement dans les vergers à graines, et à identifier les parents mâles élites basées sur la performance de la progéniture (Butcher *et al.*, 2000). Cinq locus microsatellites sont aussi développés pour *Acacia nilotica* ssp. *indica* (Benth.) Brenan. Ces microsatellites ont été obtenus grâce à la construction d'une banque enrichie, leur utilisation permettra de déterminer l'origine génétique et l'étendue de la diversité génétique (Wardill *et al.*, 2004). Une autre étude a rapporté l'isolement de 15 microsatellites chez l'hybride *Acacia* (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*). Cinq de ces locus ont démontré une hérédité mendéienne dans la population en ségrégation F1, quatre ont montré un ratio non conforme et les six autres n'ont pas ségrégué dans les descendances, car ils étaient homozygotes chez les deux parents (Ng *et al.*, 2005).

Tableau 20. Revue sur les microsatellites développés sur Acacia MDv : méthode de développement ; SSR : microsatellites ; EHW : équilibre de Hardy-Weinberg ; DEHW : déviation de l'équilibre de Hardy-Weinberg ; BGE : banques génomiques enrichies en microsatellites

Auteurs	Espèce	MDv	Nb de SSR	Transférabilité	Autres caractères
(Butcher <i>et al.</i> 2000)	Acacia mangium Willd. (Section Juliflorae within the subgenus Phyllodineae)	BGE	33	<ul style="list-style-type: none"> • 11 SSR amplifie l'ADN de <i>Pararchidendron pruinosa</i>, <i>Archidendron luci</i> et <i>Archidendron ramiflorum</i> (même section que <i>A. mangium</i>) • Pas d'amplifications des autres espèces de sous genre <i>Acacia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • 11 avec EHW • Motif abondant (AC)n
(Wardill <i>et al.</i> 2004)	Acacia nilotica ssp. indica	BGE	5		<ul style="list-style-type: none"> • Présence d'allèle nul
(Ng <i>et al.</i> 2005)	Acacia hybrid (<i>Acacia mangium</i> × <i>Acacia auriculiformis</i>)	BGE	15	<ul style="list-style-type: none"> • <i>A. mangium</i> • <i>A. auriculiformis</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 SSR avec EHW • 4 SSR avec DEHW • 6 SSR non ségrégé, ils étaient homozygotes chez les parents
(Otero-Arnaiz <i>et al.</i> 2005)	Acacia brevispica	BGE	24		<ul style="list-style-type: none"> • 5 présentent des allèles nuls • Nombre non défini sont en DEHW
(Ruiz-Guajardo <i>et al.</i> , 2007)	Acacia (Senegalia) mellifera	BGE	11		<ul style="list-style-type: none"> • 3 SSR en DEHW • Présence d'allèles nuls
(Fredua-Agyeman <i>et al.</i> , 2008)	Acacia koa	BGE	31		<ul style="list-style-type: none"> • 9 SSR sont hautement polymorphes • 3 SSR observé présentant des allèles uniques pour certaines populations
(Millar <i>et al.</i> 2008)	Acacia saligna subsp. saligna	BGE	9	<ul style="list-style-type: none"> • 3 SSR développés sur <i>A. mangium</i> amplifient l'ADN d'<i>A. saligna</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 SSR de ceux développés produisent des locus interprétés comme unique.
(Assoumane <i>et al.</i> 2009)	Acacia Sénégal	BGE	11	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Acacia laeta</i>, • Hybride <i>A. senegal</i> x <i>Acacia laeta</i> <i>A. senegal</i> var <i>leiorhachis</i> <p>Puissent être utilisés sur les espèces de sous genre <i>Aculeiferum</i>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 10 SSR avec DEHW • 2 SSR avec déséquilibre de liaison • 10 SSR présentent des allèles nuls
(Millar 2009)	Acacia woodmaniorum	BGE	28		
(Nevill <i>et al.</i> , 2010)	Acacia karina	BGE	15	<ul style="list-style-type: none"> • 8 sont polymorphes sur <i>A. Jibberdingensis</i> • 3 polymorphe sur <i>A. stanleyi</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • 4 SSR n'amplifient pas • 2 SSR avec DEHW • 9 SSR polymorphes avec EHW
(Lepais <i>et al.</i> , 2011)	Acacia harpophylla F. Muell. Ex Benth	BGE -NSG	96		<ul style="list-style-type: none"> • 9 SSR polymorphe avec EHW
Somme des SSR	11 espèces		278	21 avec transférabilité limitée (7,53 %)	48 SSR avec EHW (17,26 %)

Dans le même sens 24 microsatellites ont été développés sur *Acacia brevispica* (Otero-Arnaiz *et al.*, 2005), certains d'entre eux ont présenté des allèles nuls. Les systèmes d'accouplement, les modèles de flux de gènes et de médiation du pollen, et les niveaux de contamination génétique ont été étudiés dans un peuplement planté par *Acacia saligna* subsp. *Saligna* grâce à une analyse de paternité à l'aide de marqueurs microsatellites (Millar *et al.*, 2008). Les résultats ont démontré des niveaux élevés d'allofécondation. Les distances moyennes de dispersion du pollen étaient de 37 m avec la majorité des descendances engendrées par les arbres paternels appartiennent tous à un rayon de 50 m de l'arbre-mère. La contamination génétique par le fond naturel de la population d'*Acacia saligna* subsp. *lindleyi* a été détectée dans 14 % de la descendance d'*Acacia saligna* subsp. *Saligna*. Des événements de pollinisation inter-sous-espèces ont eu lieu sur une plage de distances de 5 à 1566 m avec une distance de dispersion moyenne de pollen de 666 m, ceci en raison de la proximité de sources de pollen provenant de la population naturelle de subsp. *Lindleyi* (Millar *et al.* 2008). En 2009, la base de données des *Acacia* s'est enrichie avec 11 marqueurs microsatellites préalablement développés sur *Acacia sénégal* (Assoumane *et al.*, 2009) dans le but de différencier *Acacia Sénégal* d'*Acacia dudgeoni* (Assoumane *et al.*, 2012), deux espèces étroitement apparentées d'*Acacia Sénégal* (*L.*) Willd, partagent plusieurs caractères botaniques, de sorte qu'en se basant sur les traits morphologiques, il n'y a pas une discontinuité claire.

a. Conditions d'utilisation des microsatellites

L'utilisation des microsatellites exige une connaissance préalable du génome pour leur développement, ce qui rend leur utilisation couteuse et laborieuse. Le taux élevé de mutation peut également constituer un obstacle pour leur utilisation, ainsi il faut maîtriser 1) l'analyse des gels, 2) l'observation ou absence des allèles nuls, 3) l'homéoplasie et 4) l'utilisation d'amorces hétérologues au cours de l'amplification des espèces en croisement. Au cours de la réalisation d'un gel, une échelle allélique connue doit être utilisée pour que les comparaisons transversales des profils puissent être faites avec exactitude lors de l'analyse. Un autre problème est parfois rencontré est la production des bandes échos «stutter bands», qui peuvent masquer ou réduire le nombre des

hétérozygotes. Typiquement, une vraie bande (allèle), son contraste sera plus foncé par rapport à une bande écho.

L'utilisation des amores microsatellites des espèces en croisement devrait être faite avec prudence. La probabilité d'allèles nuls (la non-amplification d'un ou plusieurs allèles) doit être soigneusement analysée (Callen *et al.*, 1993 ; Pemberton *et al.*, 1995), car une simple mutation dans la région flanquante des microsatellites (lieu d'hybridation des amores spécifiques), peut inhiber ou complètement empêcher son hybridation, ce qui en résulte une réduction ou absence du produit PCR.

Le développement des microsatellites, c'est-à-dire la définition des amores bordantes spécifiques, est un travail assez lourd, requérant une grande technicité et un coût élevé. Il consiste en premier temps à un enrichissement d'une banque génomique en motifs répétés chez l'espèce à étudier, suivie par le clonage et le séquençage de nombreux fragments, la conception des amores sens et anti-sens spécifiques des régions flanquantes du site SSR, et enfin la mise au point des conditions d'amplification par PCR. D'autres méthodes ont été utilisées pour minimiser les coûts dépendus pour cette technique reposent sur l'utilisation des SSR préalablement développés chez des espèces phylogénétiquement proches, et la recherche des motifs microsatellites répétés dans les bases de données publiques telles que GenBank.

b. Analyse des microsatellites développés chez les *Acacia*ae

La liste des études utilisant les microsatellites chez les espèces d'*Acacia*ae est ci-devant citée au tableau 20. Il s'agit de 11 études réalisées sur 12 espèces qui ont donné naissances à 278 SSR génomiques, un nombre qui reste très faible pour construire une carte génétique avec des microsatellites. Onze de ces études ont fait appel à la méthode de banques génomiques enrichies en microsatellites, dont 10 se basent sur la technique de séquençage de Sanger et une seule a utilisé la technique de nouvelle génération de séquençage (NGS). De plus, la plupart de ces études présentent des allèles nuls, une déviation de l'équilibre de Hardy-Weinberg, et un déséquilibre de liaison et seulement 48 SSR sont polymorphes, et ils ségrègent avec des ratios équilibrés (EHW) ce qui

représente 17,26 % de la totalité des SSR développés. Ceci peut être expliqué par la complexité du génome des *Acaciae* avec des cas de polyploidie, mode de reproduction, et type de polliniseurs. Dans les cas où les produits PCR sont multi alléliques, on peut supposer que les amorces ont pu s'hybrider à plusieurs endroits du génome, multi locus. Le tableau 20 nous permet de conclure aussi que la majorité des microsatellites développés ne sont pas ou difficilement transférables, nous avons noté 7,53 % des SSR avec possibilité d'amplifier l'ADN des autres espèces, mais qui reste dans le même sous genre ou section. Ceci peut être expliqué par la complexité de l'origine des *Acaciae* avec leur phylogénie qui reste toujours mal connue, et par suite les espèces supposées phylogénétiquement proches peuvent appartenir à des groupes différents. Dans ce cas, on est ouvert à l'hypothèse que les séquences flanquantes des SSR et qui correspondent aux sites d'hybridation des amorces développées aient subi des mutations par délétions ou addition de certaines bases, et par suite une divergence entre espèces.

i. Transfert entre espèces phylogénétiquement proches

C'est une technique qui se base sur l'application des microsatellites développés sur d'autres espèces, mais qui restent proches phylogénétiquement de l'espèce à étudier. Dans ce cas, on minimise le coût de construction d'une banque génomique spécifique ou on n'aura pas besoin de disposer de données de séquences. Cette stratégie a été employée pour l'étude de la diversité génétique chez *Acacia saligna* subsp. *Saligna* en appliquant des microsatellites développés sur *Acacia mangium* (Millar *et al.* 2008), de même les microsatellites isolés d'*Acacia Sénégal* ont prouvé leur amplification de l'ADN d'autres espèces tel qu'*'Acacia latta*, et l'*hybride issu d'A. Sénégal x Acacia latta A. Sénégal var leiorhachis* appartenant au même sous-genre *Aculeiferum* (Assoumane *et al.* 2009). Par ailleurs, cette stratégie reste restreinte, car le passage à des espèces d'autre genre de même famille montre toujours un succès réduit ou parfois nul dans l'acquisition d'amplification (Butcher *et al.* 2000) des microsatellites et de leur polymorphisme. Il est important de mentionner que l'absence de produits ne signifie absolument pas l'absence de site microsatellites, il se peut que ce dernier existe, mais ce sont ses régions flanquantes qui ont subi des modifications aboutissant à la non-hybridation des amorces.

ii. Construction de banques génomiques enrichies en microsatellites

Le développement de banque génomique enrichie en microsatellites pour l'espèce étudiée reste l'approche la plus crédible en termes de nombre de locus informatifs spécifiques isolés, malgré son coût élevé et l'instrumentation qu'il demande. Il consiste au développement d'une banque enrichie en motifs répétés choisis par le développeur. Cette méthode a été adoptée pour la majorité des SSR isolés des *Acaciae* (Butcher *et al.* 2000 ; Wardill *et al.* 2004 ; Otero-Arnaiz *et al.* 2005 ; Ruiz-Guajardo *et al.* 2007 ; Fredua-Agyeman *et al.* 2008 ; Millar *et al.* 2008 ; Assoumane *et al.* 2009 ; Millar 2009 ; Nevill *et al.* 2010).

La première étape concerne l'extraction d'ADN génomique de l'espèce étudiée en une grande quantité avec une bonne qualité. En effet, c'est une étape cruciale, car, de la qualité de l'ADN génomique de départ, dépendent toutes les étapes postérieures. On peut utiliser l'ADN extrait sur un mélange de feuilles de plusieurs individus, ceci afin de discerner un large éventail des variations des motifs de microsatellites.

La deuxième étape se focalise sur l'enrichissement d'une banque génomique en motifs répétés. Plusieurs techniques ont été inventées, dont le principe de base (Fig.33) est que : l'ADN génomique est digéré par une enzyme de restriction et ligaturer à un adaptateur, amplifié par PCR, puis dénaturé. Ces fragments simples brins sont ensuite hybridés à des oligonucléotides formés de motifs de microsatellites, à titre d'exemple des $(TG)_{12}$, $(AG)_{12}$, $(ACTC)_6$ (généralement liés à une membrane ou à une colonne). Suite à un lavage les fragments d'ADN qui ne renferment pas de motif SSR ne s'hybridant pas, et par suite ils sont éliminés avec la solution de lavage. Les fragments élus supposés contenir des microsatellites sont ensuite insérés dans des vecteurs de clonage qui servent de véhicules pour une transformation bactérienne qui permettra une duplication des fragments insérés. Les colonies positives sont sélectionnées à la base de la coloration bleue/blanche. Une deuxième hybridation est faite avec des sondes d'oligonucléotides de motifs répétés pour construire des banques séparées de di- tri -et tétranucléotides.

L'étape suivante est le séquençage des inserts après leurs amplifications par PCR et sélection des fragments supérieure à 400 Pb préalablement testés sur gel d'agarose (Fig.34). Une fois les séquences sont obtenues, elles sont soumises à une analyse bio-informatique pour dessiner des amores PCR oligonucléotidiques.

iii. Recherche des microsatellites dans les banques d'EST publiées

Vu les contraintes techniques et matérielles pour le développement des microsatellites, leur utilisation est souvent restée limitée à des applications sur les cultures à grande importance commercial (Selkoe *et al.*, 2006). Mais, avec le progrès des études génomiques, une nouvelle source alternative de l'isolement des microsatellites a été utilisée. C'est l'identification de microsatellites à partir des Étiquettes de Séquence exprimées (EST) (Expressed Sequence Tagged).

La base de données EST créée à l'aide du séquençage à haut débit du transcriptome, a offert la possibilité de détecter des répétitions microsatellites dans les ARNm et leurs transcrits (Aguilar-Espinoza *et al.*, 2012). Les marqueurs SSR transcriptomiques ont des avantages intrinsèques de tous les microsatellites génomiques, car ils fournissent une méthode économique pour étudier un large éventail d'espèces en raison de leur potentiel de transférabilité inter spécifique et la disponibilité au public des bases de données EST. Cependant, ces microsatellites sont évidemment limités à des espèces pour lesquelles ce type de base de données existe (Scott *et al.*, 2000).

À ce jour, cette approche est largement optée pour plusieurs espèces *Mereatrix meretrix*, *Laminaria digitata* dont les SSR développés ont été transférables à une autre espèce non congénère *Saccharina japonica*, *Radis* (*Raphanus sativus L.*), l'arbre de Pivoine, *Mesodesma donacium*, variété de Maniocs, les *Eucalyptus*, *Gerbera* (*Gerbera hybrida*), *Castanopsis sieboldii var. sieboldii*, l'arachide (*Arachis hypogaea L.*), et hévéa (*Hevea brasiliensis*) (Feng *et al.*, 2009 ; Liang *et al.*, 2009 ; Ueno *et al.*, 2009 ; Gong *et al.*, 2010 ; Faria *et al.*, 2011 ; Sraphet *et al.*, 2011 ; Aguilar-Espinoza *et al.* 2012 ; Guo *et al.*, 2012 ; Jiang *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2012 ; Lu *et al.*, 2012), la liste reste très longue.

Une multitude de programmes ont été développés pour la détection des répétitions microsatellites à partir des bases de données informatisées, et d'autres spécialisées pour la conception des amorces spécifiques pour ces locus. Un ensemble de ces outils sont disponibles sur le site :

http://qcbs.ca/wiki/bioinformatic_tools_to_detect_microsatellites_loci_from_genomic_data

Dans notre étude, nous avons adopté la stratégie des EST (Expressed Sequence Tagged) ; c'est-à-dire les étiquettes des séquences exprimées à partir des données disponibles sur deux espèces d'*Acaciae* : l'hybride *A. mangium x A. Auriculiformis* (Yong *et al.*, 2011) et celle *A. mangium* (Suzuki *et al.*, 2011).

Cette partie a été réalisée à l'Institut de Recherche en Biologie Végétal et Centre de Biodiversité à Montréal.

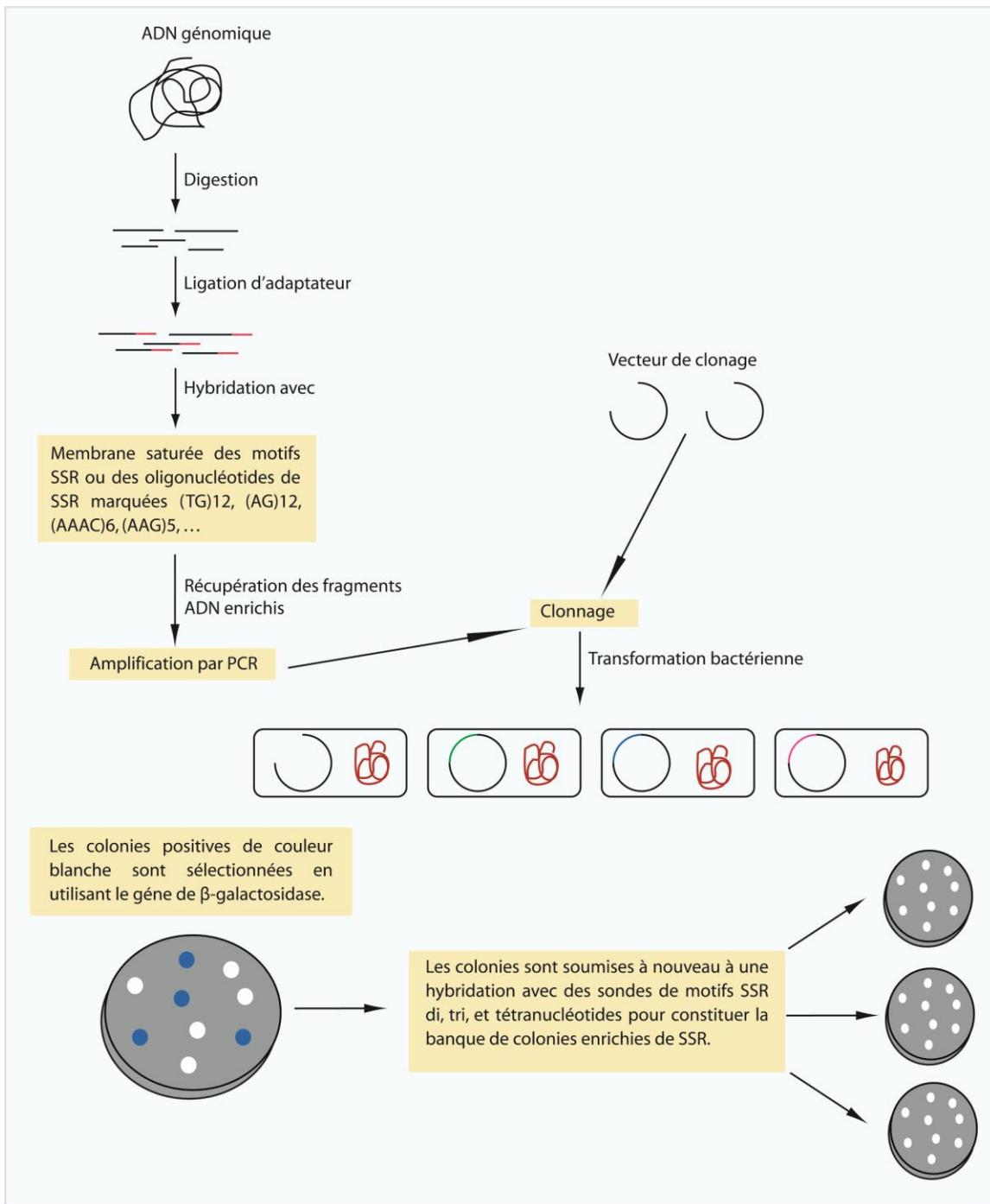


Fig.33. Schéma simplifié du protocole de construction de banque génomique enrichie en SSR

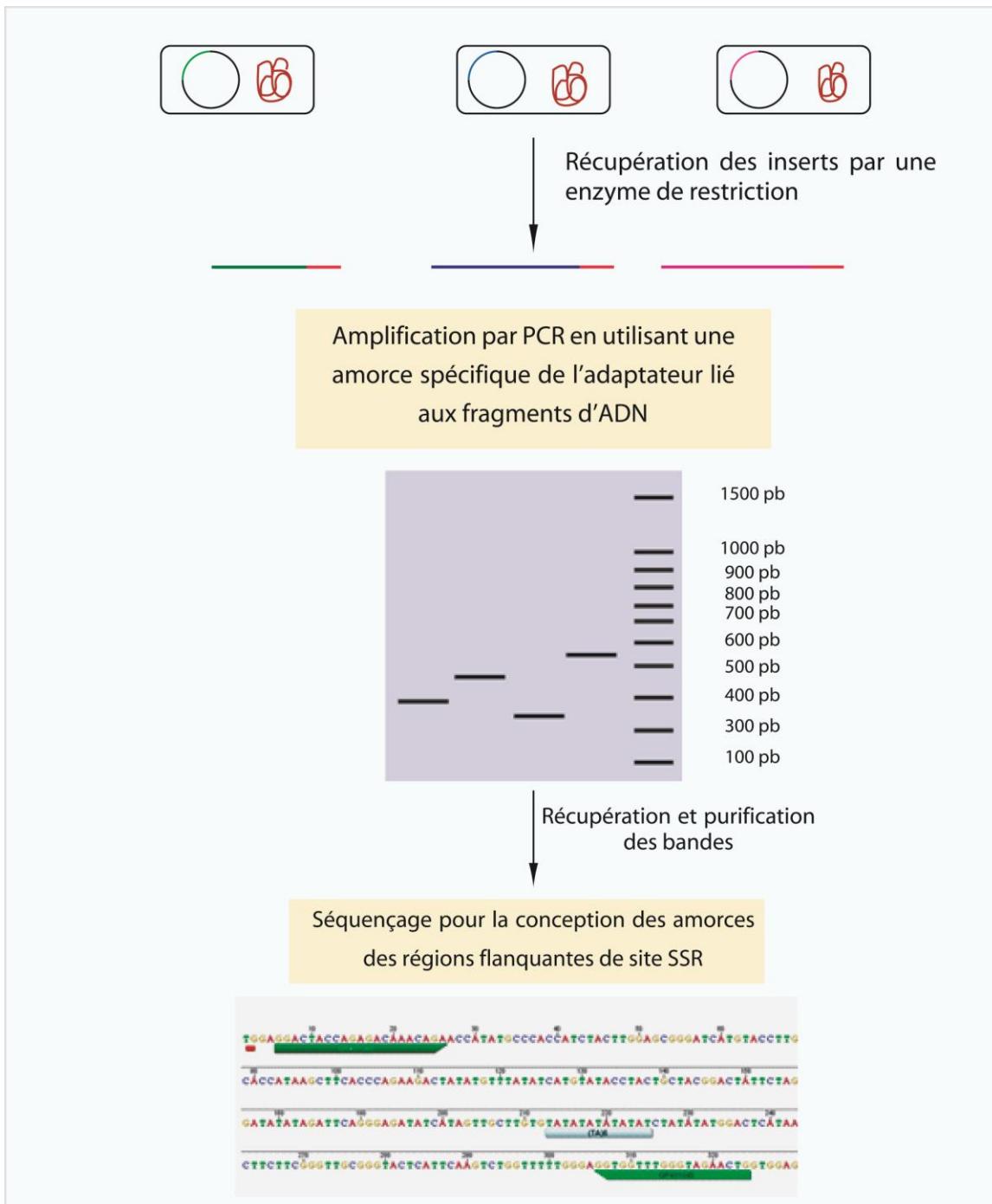


Fig.34. Séquençage et conception des amorces des régions flanquantes des SSR

II. Matériel et méthodes

II.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est réalisée sur des feuilles sèches conservées au congélateur -80 °C, selon le protocole adapté aux espèces riches en polysaccharides avec des modifications (Ky *et al.*, 2000). Les provenances étudiées sont : Tissint, Guelmim, N'Koub, Agdz, Assa et Foum Zguid

Étape 1. Isolation des noyaux

30 mg de feuilles sèches ont été broyés à l'aide d'un broyeur automatique (Tissulyser) pendant 30'' avec deux répétitions. La poudre obtenue est traitée par l'ajout de 3 ml de tampon d'extraction à pH= 9 (15 mM Tris, 2 mM EDTA, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 2 % β-mercaptoproéthanol, 2 % PVPP, 0.5 % Triton-X100). Ce dernier a été préchauffé au bain marie pendant 1h à 65°C. Le broyat homogénéisé pendant 2h, est centrifugé à 3000 g pendant 20 min. Le culot est récupéré dans 2 ml de tampon de lyse à pH=8 (0.1 M Tris, 0.02 M EDTA, NaCl 1,25 M, MATAB 4 %). Les tubes sont ensuite stockés à -20°C.

Étape 2. Extraction d'ADN

Lors de l'extraction d'ADN proprement dite, les tubes sont incubés à 65 °C pendant 4 heures, puis centrifugés à 3000 g pendant 10 min. Le surnageant (2 ml) récupéré est lavé avec le même volume de Phénol : Chloroforme : Alcool Isoamyl (25:24:1), ensuite centrifugé à 3000 g pendant 10 min à 4 °C. Cette étape est répétée jusqu'à obtention d'un surnageant de couleur claire témoignant d'un lavage satisfaisant. Pour précipiter l'ADN, 1/3 du volume d'acéate de sodium 3M (pH 5,2), et 2/3 du volume d'isopropanol froid sont ajoutés au surnageant qui sera incubé une nuit à -20 °C. Le lendemain les tubes sont centrifugés à 10000 g pendant 10 min. Après récupération, le culot lavé avec 400 µl d'éthanol (70°) est séché pendant 1h à l'air libre. Enfin, il est suspendu dans 60 µl à 100 µl de tampon tris.

II.2. Optimisation des conditions de la PCR

L'optimisation des réactions PCR est réalisée dans des thermocycleurs Eppendorf Mastercycler avec gradient de température, dont les produits sont migrés sur le gel KBplus et lus sous Séquenceur LiCor 4300. Le système LI-COR détecte l'ADN en utilisant l'infrarouge (IR) de fluorescence. L'analyse du gel est faite par le logiciel SagaGT.

Deux marqueurs de taille sont utilisés 700 pb-350 pb IRDye700nm et IRDye800.

Le mix préparé pour la réalisation des réactions en chaîne par polymérase (PCR) est commun à l'ensemble des amorces. Le volume final utilisé est de 10 µL, contenant le tampon PCR 1X (Crimson taq) avec 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,08 µM d'amorce sens allongé (M13), 0,1 µM d'amorce anti-sens, 0,1 µM d'amorce M13 marqué par Fluorescence soit 700 nm ou 800 nm (F-M13), 20 ng d'ADN et 1 U d'ADN Polymérase (Crimson Taq), diméthylsulfoxyde noté aussi DMSO 0,3 %, albumine de sérum bovin ou (ASB) 3 %.

La réaction d'amplification a été réalisée dans le thermocycleur Mastercycler® pro. Les conditions d'amplification appliquées sont les suivantes : 5 min de dénaturation initiale à 94 °C puis de 25 à 30 cycles selon l'amorce, avec 30 s de dénaturation à 94 °C, 40 s d'hybridation à la température optimale pour chaque paire d'amorces et 40 s d'elongation à 72 °C, enfin 10 min de synthèse finale à 72 °C. Pour chacune des PCR, nous avons fait migrer un témoin négatif contenant l'ensemble des composants de la réaction sans l'ADN matrice dans le but d'évaluer s'il n'y a pas eu de contamination.

La taille des allèles (bandes) est lue après migration sur un gel KBplus placé dans le séquenceur LiCor 4300. Dans la mesure de rapidité, les produits de PCR de deux individus ont été groupés dans un même tube, pour l'un des deux, son amorce est marquée avec IRDye 700 nm, et l'autre marquée à IRDye 800 nm utilisés au cours de la PCR. Cette technique nous a permis de migrer les produits des deux amorces au moment d'un même tour d'analyse. Les allèles des deux amorces sont distingués par le fluorochrome qu'elle porte.

Un volume de 9 µl de solution stop (95 % formamide, 10 mM NaOH, 0.05 % Bromophenol blue) est ajouté à 1µl de chacun des deux produits de PCR. L'ensemble est dénaturé pendant 5 min à 95 °C, pour éviter la renaturation des deux brins d'ADN ils sont rapidement placés sur glace (4 °C). Ensuite, nous déposons 0,5 µl de chaque échantillon dans le séquenceur, tous les cinq échantillons nous déposons le marqueur de taille soit de 700 pb-IRDye 700 nm et IRDye 800nm dans le cas des allèles de grande taille, ou de 350 pb-IRDye 700 nm et IRDye 800 nm pour les allèles de petite taille marquée à la fois par 700 nm et 800 nm puisqu'on procède à la lecture de deux amorces à la fois. Les paramètres d'analyse sur le LiCor-4300 sont appropriés aux instructions du constructeur. La lecture des profils de migration consiste premièrement à une calibration du gel par vérification du bon emplacement du marqueur de taille qui constitue une référence pour l'estimation de la taille des allèles. Le logiciel crée des pics à la position d'un allèle, cependant une évaluation visuelle de ces profils

reste nécessaire pour s'assurer que les pics retenus par le logiciel correspondent réellement à un allèle.

II.3. Décomposition de la diversité génétique chez *Acacia tortilis* subsp *raddiana*

La méthode la plus classique de caractérisation de populations est celle des indices de fixation (F) proposée par Wright (1943). F représente la probabilité que deux gènes soient similaires dans une population, sachant qu'ils dérivent d'un même ancêtre commun. Dans le cas d'une population divisée en sous-populations Wright définit trois coefficients F qui sont reliés par la formule suivante :

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST}) \quad \text{D'où} \quad F_{ST} = F_{IT} - F_{IS}/1 - F_{IS}$$

Ainsi, F_{IT} et F_{IS} représentent successivement les corrélations entre deux gamètes qui s'unissent pour produire les individus de la population totale (F_{IT}) et la sous-population (F_{IS}), tandis que F_{ST} correspond à la corrélation entre deux gamètes tirés aléatoirement dans chaque sous-population.

Nei (1973) a proposé une démarche voisine de F-statistique qui s'applique aux locus multi-alléliques (Prat *et al.*, 2006). Cette approche consiste à définir la probabilité d'identité de deux allèles pour un locus multi-allélique dans une population par $J = \sum pi^2$, c'est le taux d'homoygotie. Le paramètre de diversité génétique représenté par le taux d'hétérozygotie attendue sous l'hypothèse de panmixie est défini par :

$$H = 1 - \sum pi^2$$

Ainsi, Nei détermine la notion de diversité génétique et prouve que la diversité totale H_T se décompose en une diversité intra-sous-population H_S et une diversité entre sous-population D_{ST} avec :

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

Les hétérozygoties H_T et H_S sont calculées sous l'hypothèse de l'équilibre de Hardy-Weinberg et dépendent strictement des fréquences alléliques observées. Nei définit des

indices F équivalents à ceux de Wright à partir des moyennes d'hétérozygosités calculées sur plusieurs locus et d'une hétérozygotie moyenne totale observée H_0 , comme suit :

$$F_{IT} = 1 - H_0/H_T ; F_{IS} = 1 - H_0/H_S ; F_{ST} \text{ ou } G_{ST} = 1 - H_S/H_T$$

Ces paramètres sont dénommés les statistiques G (G-statistics), par analogie aux statistiques F.

II.4. Analyse de variance moléculaire

L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) étudie la structure génétique en évaluant les variances à l'intérieur et entre populations. Elle a été développée pour des plans d'échantillonnage hiérarchisé. L'information sur la divergence de l'ADN d'haplotype est incorporée dans une analyse de variance, dérivée d'une matrice de distance génétique entre toutes les paires d'haplotypes. L'analyse produit des estimations des composantes de la variance et des analogues de la statistique F, ce qui reflète la corrélation de la diversité haplotype à différents niveaux de subdivision hiérarchique. L'importance des composantes de la variance est testée en utilisant une approche permutations, ce qui élimine l'hypothèse de normalité qui est classique pour l'analyse de la variance, mais inapproprié pour les données moléculaires.

Dans notre étude les fréquences alléliques, hétérozygotie observée, test de Hardy-Weinberg ainsi que les paramètres génétiques tel que le nombre d'allèles, indice de fixation intra provenance (G_{IS}), et inter provenance (G_{ST}) sont réalisées avec le logiciel GenoDive (Meirmans *et al.*, 2004) : Le test Mantel qui porte sur la corrélation linéaire entre la matrice de distance géographique et la matrice de distance génétique(Mantel *et al.*, 1970), est réalisé avec le programme R package polysat (Clark *et al.*, 2011). Il est communément utilisé pour évaluer la corrélation entre les distances génétiques et les positions géographiques d'espèces ou de population étudiées

II.5. Développement des EST-SSR

Pour le développement des SSR sur la base de données des EST disponibles sur des *Acacia*, nous avons fait appel à l'application *SSRprimer II*, disponible sur le site du centre Australien de la génomique fonctionnelle des plantes (Australian Centre for Plant Functional Genomics. Le programme SSRprimer a été développé par (Robinson *et al.*, 2004), il est écrit

en Perl, et intègre deux applications : SPUTNIK (Abajian 1994) et primer 3 (Rozen *et al.*, 1999).

II.5.1. Le programme SPUTNIK

Les séquences d'entrées qui sont sous format FASTA sont subdivisées en groupes de 10. Chaque groupe est analysé initialement par SPUTNIK qui permet un criblage des sites microsatellites. Il s'agit d'un programme en langage C (Abajian 1994), qui recherche dans les fichiers des séquences d'ADN au format FASTA des motifs répétés de nucléotides de longueur comprise entre 2 et 5 pb. Il en résulte leur position dans la séquence, la longueur, et un score déterminé par la longueur de la répétition et le nombre d'erreurs. Les Insertions et les suppressions ainsi que d'autres aberrations sont tolérées, mais ils affectent le score global. Il ne s'agit pas d'une recherche dans une «bibliothèque» de microsatellites connus, mais d'une analyse des nucléotides des séquences d'entrée. La sortie qui est la somme des séquences filtrées par SPUTNIK contenant des motifs répétés est cheminée pour être analysées par le second programme Primer3.

II.5.2. Programme Primer 3

Primer 3 est un programme informatique qui suggère des amorces de PCR pour une variété d'applications, par exemple pour créer des STS (Sequence Tagged Sites) pour la cartographie d'hybrides ou pour amplifier des séquences pour la découverte de polymorphisme de nucléotide unique SNP. Primer 3 permet aussi de sélectionner des amorces simples pour les réactions de séquençage et peut concevoir des oligonucléotides et des sondes d'hybridation. Pour ce faire, Primer 3 prend en considération de nombreux facteurs: la température d'hybridation Ta, la longueur d'oligonucléotide, la contenance en GC, la stabilité en extrémité 3', estimation de la structure secondaire, la probabilité d'hybridation ou d'amplification des séquences indésirables, la probabilité de formation de dimères d'amorce entre deux copies de la même amorce, et l'exactitude de la séquence source. Dans la conception d'une paire d'amorce, Primer 3 examine la taille du produit et la température d'hybridation, la probabilité de formation de dimères d'amorce entre les séquences des paires d'amorces, la différence entre la température d'hybridation des amorces, et l'emplacement relatif des amorces par rapport à des régions particulières d'intérêt ou à éviter.

Les résultats de Spoutnik et Primer 3 sont combinés et ajoutés à un fichier de résultats. Cet outil a été utilisé pour la découverte de SSR au sein de la base complète de données GenBank (Jewell *et al.*, 2006), et de concevoir des amorces d'amplification par PCR pour plus de 13 millions de SSR. Le serveur de l'arbre taxonomique des SSR (SSR arbre taxonomique) fournit une recherche sur le Web et en naviguant dans des espèces et des taxons, on peut visualiser et télécharger ces amorces.

II.6. Caractéristiques de conception des amorces par Primer3 dans SSRprimer

Les options de Primer 3 sont par défaut, mais des modifications sont apportées pour augmenter la spécificité des amorces (Robinson *et al.* 2004). Une paire d'amorces est conçue à au moins une distance de 10 pb de part et d'autre du site SSR identifié. La taille optimale pour les amorces est 21 bases avec un maximum de 23 bases. La température d'hybridation (Ta) est 55 °C, avec un minimum de 50 °C et un maximum de 70 °C, la contenance en GC est 50 %, avec un minimum de 30 % et un maximum de 70 %. Bien que ces options et autres puissent être modifiés, les auteurs suggèrent le maintien de ces critères pour garantir une amplification robuste de PCR.

II.7. Identité des gènes des EST-SSR sélectionnés

Les séquences EST-SSR identifiées par *PrimerSSR* sont assemblées à l'aide de l'application *novo assemblé* du logiciel Geneious (Kearse *et al.*, 2012). Ceci nous a permis de classer nos EST-SSR en un ensemble de Contig (les séquences homologues) et de patron unique (Singleton = séquence unique). Nous avons également procédé à l'identification du pourcentage d'homologie et de la fonction putative des gènes en comparant nos EST-SSR contre la base de données des protéines BLASTx (non redondante) du Centre National d'Information de la Biotechnologie NCBI à l'aide du logiciel Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) disponible gratuitement sur le site <http://www.blast2go.de>.

I. Résultats et discussion

I.1. Conception des amorces

La disponibilité d'un nombre limité d'EST pour des espèces d'*Acacia* (et aucune base de données pour *Acacia tortilis*) permet d'envisager la difficulté de détecter des motifs répétés dans ces séquences afin de développer des marqueurs microsatellites plus conservés et donc

plus facilement transférables entre espèces. L'application SSRprimer II a permis de faire la détection des SSR à partir des deux lots de séquences codantes issues de l'assemblage de 9110 EST développés sur *Acacia mangium*, et 2459 sur l'hybride *Acacia auriculiformis* x *Acacia mangium*. Au total, 63 séquences contenant des motifs de répétition ont été déterminées.

L'assemblage des ESTs avec Genieous a produit 33 séquences uniques, et 30 séquences regroupées en 13 contigs. Les motifs tri-nucléotides et di-nucléotides étaient les plus abondants avec successivement 20 % et 19 %, suivie par les tétranucléotides 13 % et un pourcentage de 11 % pour les pentanucléotides (fig.35 et 36).

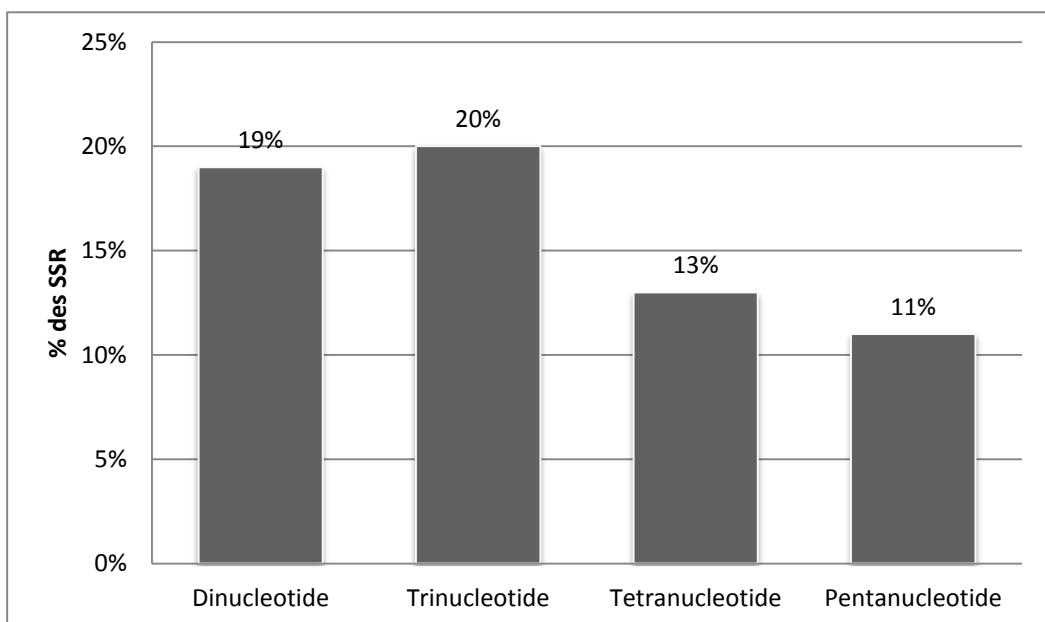


Fig.35. Répartition des motifs répétés détectés par L'application de SSRprimerII

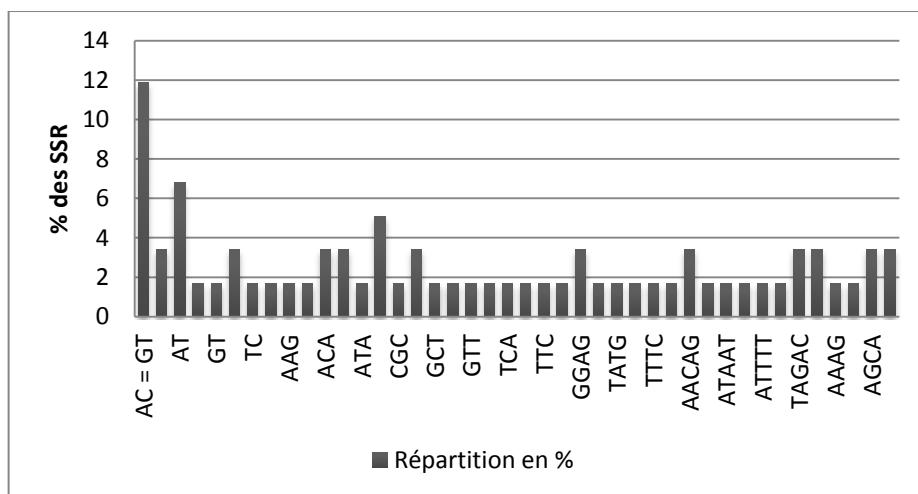


Fig.36. Répartition de l'ensemble des motifs détectés par L'application SSRprimer II

Les types de motif, les plus abondants sont les AC avec 11,86 % et AT avec 6,78 %. En effet, une modification du nombre de répétitions pour des motifs di-, a été détectée ce qui peut décaler le cadre de lecture et crée un changement dans la fonction de la protéine.

Les marqueurs moléculaires basés sur les EST sont beaucoup plus intéressants que les marqueurs microsatellites génomiques pour l'obtention de locus orthologues transférables entre les espèces. Cependant, la mise en évidence du polymorphisme reste faible (Pinto *et al.*, 2004).

I.2. Analyse des données Microsatellites

Chez les diploïdes, les microsatellites sont des marqueurs co-dominants avec locus unique, caractérisés par la présence d'un ou deux allèles par locus par individu (Esselink *et al.*, 2004), dont les homozygotes sont représentés par une seule bande, et les hétérozygotes sont représentés par deux bandes (Akkaya *et al.* 1992). Cependant, chez les polyploïdes l'analyse des bandes SSR est beaucoup plus complexe (Pfeiffer *et al.*, 2011) à cause de l'hérédité polysomique.

La détection à la fois des loci et des allèles multiples par individu rend difficile l'interprétation des profils. Sous l'hypothèse d'un octaploïde, le génome est quatre fois celui d'un diploïde, malgré le nombre pair des chromosomes, ceci ne leur garantit pas une ségrégation normale pendant la méiose (Griffiths *et al.*, 2002). Un croisement entre deux individus qui portent chacun 8 allèles différents engendrera 786 génotypes, les combinaisons ainsi probables pour les allèles sont très élevées. La probabilité d'apparition d'un phénotype homozygote est de 1 : 63. Pour cette raison, les profils des microsatellites sont parfois traités comme des marqueurs dominants (Andrew *et al.*, 2003 ; Esselink *et al.* 2004 ; Andreakis *et al.*, 2009 ; Pfeiffer *et al.* 2011).

I.3. Diversité et différenciation génétique des populations d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana*

Estimé à partir de l'indice de diversité de Nei, la diversité totale est de $H_T= 0,446$ (45 %), la diversité moyenne intra-provenance est de $H_S=0,432$ (43,2 %) et la diversité inter-provenance est de 3 % ($G_{ST}= 0,03$). Ainsi, quatorze parts de la diversité totale se situent au niveau intra-provenance. Ces résultats sont en accord avec ceux traitant la diversité génétique par des iso-enzymes chez la même espèce (Grouzis *et al.*, 2003b) $H=0,492$ et $G_{ST}=0,03$ à

0,11, Olng'Otie (Olng'otie 1991) H=0,49 et Cardosso (Cardoso 1995) H=0,42. Cette diversité est attribuée à l'hérédité polysomique (tétra et ou octa). Par comparaison, les différentes espèces d'acacia présente en moyenne une diversité importante de l'ordre de H=0,44 pour *Acacia tortilis* subsp *tortilis*, H= 0,464 pour *Acacia tortilis* subsp *spiroparpa*, et H=0,316 pour *Acacia tortilis* subsp *heteracantha* (Grouzis *et al.* 2003b).

Les valeurs de log-vraisemblance de G-statistique montrent des différences non significatives (tableau 21), ce qui reflète l'homogénéisation des fréquences alléliques au niveau des populations. Cela peut être expliqué soit par :

- i) La faible capacité discriminante des marqueurs microsatellites développés sur les EST pour différencier les populations.
- ii) Les populations choisies pour notre étude constituent dans un passé proche un seul ensemble, qui à cause des changements climatiques, effet anthropozoïque été fragmenté et qui n'a pas eu le temps nécessaire à évoluer et se diversifier en développant des fréquences alléliques spécifiques ou des allèles caractéristiques.

Par ailleurs le mode de dissémination des gousses principalement par les vents et de reproduction anémophile dans un espace ouvert et continu ne peut que favoriser un tel brassage génique et homogénéiser la répartition du flux allélique. Le résultat est similaire à celui publié par Borgel et al (Grouzis *et al.* 2003a), qui ont rapporté un GST compris entre 0,03 et 0,11 avec une variabilité génétique importante H =0,42 à 0,49.

Tableau 21. Les valeurs de log-vraisemblance G-statistique pour toutes les paires de provenances

G _{ST} et P-valeur	Tissint	Guelmim	Assa	Agdz	N'Koub	Foum Zguid
Tissint		0.301	0.110	0.037	0.012	0.058
Guelmim	40.843		0.638	0.083	0.146	0.124
Assa	58.244	19.113		0.453	0.392	0.459
Agdz	70.262	38.717	23.654		0.455	0.537
N'Koub	84.293	37.732	28.089	27.215		0.101
Foum Zguid	69.561	41.664	23.341	21.071	44.818	

I.4. Distribution géographique de la structure génétique

L'application du test de Mantel a montré l'absence d'une corrélation entre la distance génétique calculée sur la base des fréquences alléliques et la distance géographique avec $r = -0,06$ ($p\text{-value} = 0,556$). Ce qui traduit une continuité de la structure génétique *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* sur le gradient de notre étude et son indépendance de sa répartition spatiale.

I.5. Distribution hiérarchique de la variation génétique

L'analyse moléculaire de l'analyse de variance AMOVA (tableau 22) est réalisée avec logiciel GenoDive, sous le modèle d'allèle infini (IAM). Dans ce modèle à nombre infini d'allèles, chaque nouvelle mutation donne naissance à un nouvel état allélique. Ce modèle ne tient donc pas compte des homoplasies et des mutations réverses. Il suppose également que chaque nouvelle mutation est indépendante des autres et qu'une mutation n'en favorise pas une autre (Nikolic 2009). Nous avons trouvé que 96 % de la variation découle du facteur individu ($P < 0,001$), 4 % de variation inter-provenances pour lesquelles la différence est non significative avec $P = 0,131$, ce qui confirme les résultats de G_{ST} préalablement calculés. Ce constat, converge dans le même sens des résultats obtenus par l'approche morpho-métrique.

L'analyse de la distribution hiérarchique de la variation moléculaire relève une importance relative des composantes arbres, un patron qui reste similaire à celui des analyses de la diversité génétique sur la même espèce par des iso-enzymes, et loin de celui résultant des marqueurs RAPD dans la région de Negev qui a détecté 59,43 % et 40,57 % de variation successivement entre et à l'intérieur des populations (Shrestha *et al.* 2002).

Tableau 22. Analyse de variance moléculaire

	SSD	Degré de liberté	variation	P-valeur
Intra-provenance	798,45	54	96 %	< 0,001
Inter-provenance	105,092	5	0,40 %	0,131

I.6. Variation intra-provenance

L'amplification par PCR des 4 paires d'amorces microsatellites chez les six provenances *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* a produit un total de 12 bandes de taille différentes. Les tailles de ces bandes varient de 138 pb à 356 pb.

Le nombre observé d'allèles est de 9, 11, 12, 11, 10 et 11 respectivement chez Tissint, Guelmim, Assa, Agdz, N'Koub et Foum Zguid

L'allèle GR3097-370 présente une fréquence allélique très faible de l'ordre de 0,002. Il est présent uniquement chez la provenance de N'Koub. Tandis que l'allèle GR3081-222 présente des fréquences importantes allant de 0,875 chez N'Koub à 0,988 chez Tissint. Il est présent chez toutes les provenances tableau 23.

La diversité allélique exprimée par les deux paramètres, le nombre efficace d'allèles (N_e) et la richesse allélique (A), ($N_e = 2,14$; A = 2,02) sont proches entre les six provenances (Tableau 24 et 25). Cependant, nous avons noté une légère différence pour la provenance de Guelmim qui présente une diversité allélique plus faible ($N_e=1,71$; A=1,66) par rapport à Tissint ($N_e=2,14$; A=2,02), N'Koub ($N_e=2$; A=1,79) et Foum Zguid ($N_e=1,93$; A=1,75).

Tableau 23. Fréquences alléliques par locus et par provenance

	Locus GR2038				Locus AH			Locus GR3097						Locus GR3081	
	332	344	350	356	138	148	152	344	350	356	362	366	370	222	227
Tissint	0	0,5	0,2	0,3	0,463	0,412	0,125	0,575	0,25	0,15	0,025	0	0	0,988	0,013
Guelmim	0,075	0,688	0,025	0,212	0,675	0,2	0,125	0,7	0,188	0,062	0,05	0	0	0,95	0,05
Assa	0,15	0,537	0,1	0,212	0,7	0,188	0,113	0,75	0,087	0,05	0,05	0,062	0	0,9	0,1
Agdz	0,375	0,312	0,1	0,212	0,613	0,287	0,1	0,762	0,087	0,062	0,087	0	0	0,938	0,062
N'Koub	0,225	0,388	0	0,388	0,55	0,35	0,1	0,787	0,075	0,025	0,075	0,025	0,013	0,875	0,125
F. Zguid	0,25	0,537	0,113	0,1	0,537	0,338	0,125	0,775	0,013	0,1	0,087	0,025	0	0,975	0,025
Total	0,179	0,494	0,09	0,237	0,59	0,296	0,115	0,725	0,117	0,075	0,062	0,019	0,002	0,938	0,062

Tableau 24. Description de la diversité génétique au sein des provenances étudiées (Ne = nombre efficace d'allèle, A = richesse allélique, Hs =hétérozygotie intra-provenance)

Loci	Ne					A	Hs
	GR2038	AH	GR3097	GR3081	Ne Total		
Tissint	2,63	2,50	2,40	1,02	2,14	2,02	0.463
Guelmim	1,91	1,96	1,88	1,10	1,71	1,66	0.387
Assa	2,73	1,86	1,73	1,22	1,88	1,67	0.430
Agdz	3,41	2,14	1,67	1,13	2,09	1,76	0.444
N'Koub	2,84	2,30	1,58	1,28	2,00	1,79	0.456
Foum Zguid	2,68	2,39	1,62	1,05	1,93	1,75	0.414

Tableau 25. Tableau récapitulatif des paramètres génétiques calculés chez *Acacia tortilis* subsp *raddiana*

(H_0 : hétérozygotie observée, H_s : Hétérozygotie Intra-provenances, Ne_T : nombre d'allèle efficace, A : richesse allélique)

	Ho	Hs	Ne T	A
Tissint	0,22	0,46	2,14	2,02
Guelmim	0,31	0,39	1,71	1,66
Assa	0,34	0,43	1,88	1,67
Agdz	0,32	0,44	2,09	1,76
N'Koub	0,31	0,46	2,00	1,79
Foum Zguid	0,29	0,41	1,93	1,75
Hétérozygotie totale H_T				0,446
Différenciation génétique G_{ST}				0,03

L'exploitation du polymorphisme des quatre paires d'amorces microsatellites révélée au niveau des six provenances (60 arbres) étudiées permet d'identifier 50 haplotypes (génotype multilocus au total (Tableau 26). Les haplotypes se distinguent entre eux par une à deux mutations. Nous avons pu identifier 42 génotypes uniques, et 8 génotypes partagés par la proportion de 2, 2, 2, 2, 2, 2, 3, et 3. Ces résultats montrent le pouvoir discriminant des marqueurs SSR, bien que le nombre d'amorces soit limité à quatre. Ce résultat encourage à bien investir dans cette voie.

Tableau 26. Code barre des 50 haplotypes identifiés dans l'ordre des allèles GR2038.332-GR2038.344-GR2038.350-GR2038.356-AH.138-AH.148-AH.152-GR3097.344-GR3097.350-GR3097.356-GR3097.362-GR3097.366-GR3097.370-GR3081.222-GR3081.227

Echantillon	Haplotype	Echantillon	Haplotype	Echantillon	Haplotype
Assa9	0 1 0 1 0 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0	Tissint4	0 1 0 1 0 1 1 0 0 1 0 0 0 1 0	Agdz4	1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 1 1
Foum Zguid1	0 1 0 1 0 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0	Tissint5	0 1 1 1 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 0	Agdz6	0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 1 0
Agdz3	0 1 0 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 1 1	Tissint6	0 0 0 1 1 0 1 1 0 1 0 0 0 1 0	Agdz7	1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 0
N'Koub7	0 1 0 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 1 1	Tissint7	0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 1 0	Agdz8	0 1 0 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 1 1
N'Koub5	1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 1 1	Tissint8	0 0 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 1 0	Agdz9	1 1 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 0 1 0
N'Koub10	1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 1 1	Tissint10	0 0 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 1 1	Agdz10	1 1 0 1 0 1 0 1 1 0 1 0 0 1 1
Guelmim8	1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 1 0	Guelmim2	0 0 0 1 0 1 1 1 1 0 1 0 0 1 0	N'Koub1	0 0 0 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1
Agdz5	1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 1 0	Guelmim5	0 1 0 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 1 1	N'Koub2	0 1 0 1 0 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1
Guelmim6	0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 1	Guelmim7	0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 1	N'Koub3	0 0 0 1 0 1 1 1 0 1 1 0 0 1 1
Guelmim10	0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 1	Guelmim9	0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 1 0	N'Koub4	0 1 0 1 0 1 1 1 0 0 1 1 0 1 1
Guelmim4	0 1 0 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0	Assa1	0 1 0 1 1 0 1 1 0 1 0 1 0 1 0	N'Koub6	1 1 0 1 1 1 0 1 1 0 0 0 0 1 1
Foum Zguid3	0 1 0 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0	Assa2	0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1	N'Koub8	0 1 0 1 1 1 0 1 1 0 1 0 0 1 1
Foum Zguid8	0 1 0 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0	Assa3	0 0 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 1 1	N'Koub9	0 0 0 1 1 1 1 1 0 0 0 1 1 1 1
Tissint9	0 1 0 1 0 1 1 1 1 0 1 0 0 1 0	Assa4	0 1 0 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0 1 1	Foum Zguid2	0 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1
Agdz2	0 1 0 1 0 1 1 1 1 0 1 0 0 1 0	Assa5	0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 0 1 1 0 1 1	Foum Zguid4	0 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0
Tissint1	0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 0	Assa6	1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1	Foum Zguid5	0 1 0 1 0 1 1 1 0 1 0 0 0 1 0
Guelmim1	0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 0	Assa7	1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 0 1 0 1 1	Foum Zguid6	0 0 1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 0 0 1 1
Guelmim3	0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 0	Assa8	0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 1 1	Foum Zguid7	1 1 0 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 1 0
Tissint2	0 0 0 1 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0	Assa10	0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 1 1	Foum Zguid9	1 1 0 0 0 1 1 1 0 0 1 1 0 1 0
Tissint3	0 1 0 1 0 1 1 0 1 0 0 0 0 1 0	Agdz1	0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 1 1	Foum Zguid10	1 1 0 0 1 1 1 1 0 1 0 1 0 1 0

Les résultats de l'analyse en composante factorielle (AFC), nous a permis de détecter une continuité avec homogénéité des six provenances. L'inertie absorbée successivement par le F1 et F2 est de l'ordre de 56% et 44% (Fig. 37).

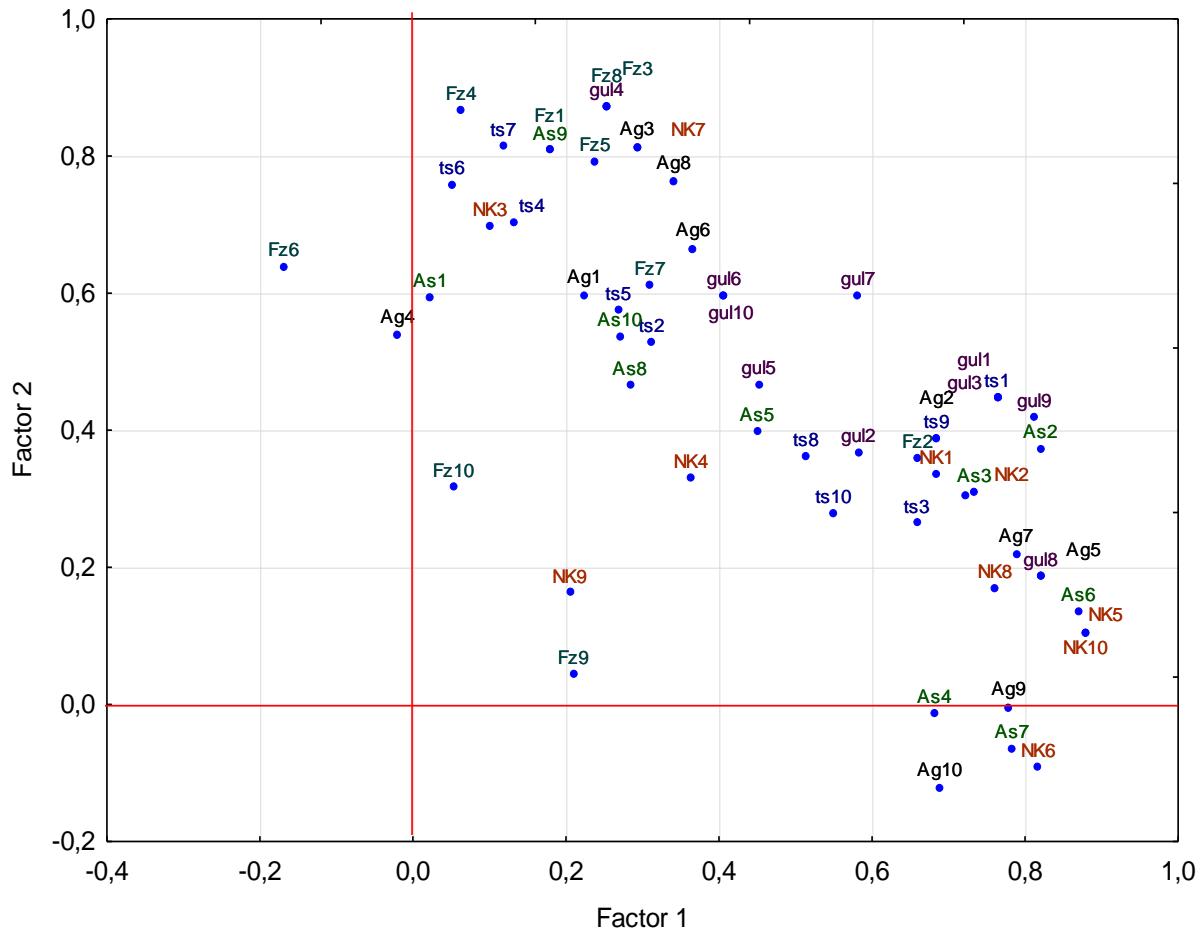


Figure 37. projection des arbres étudiés sur le plan factoriel (1x2).

Malgré l'échantillonnage limité en 60 individus, nous avons remarqué que ce dernier inclut un nombre d'haplotypes intéressants, ce qui renseigne sur l'importance du niveau de la diversité génétique au sein des provenances *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* bien qu'elle soit sujette à une exploitation irrationnelle.

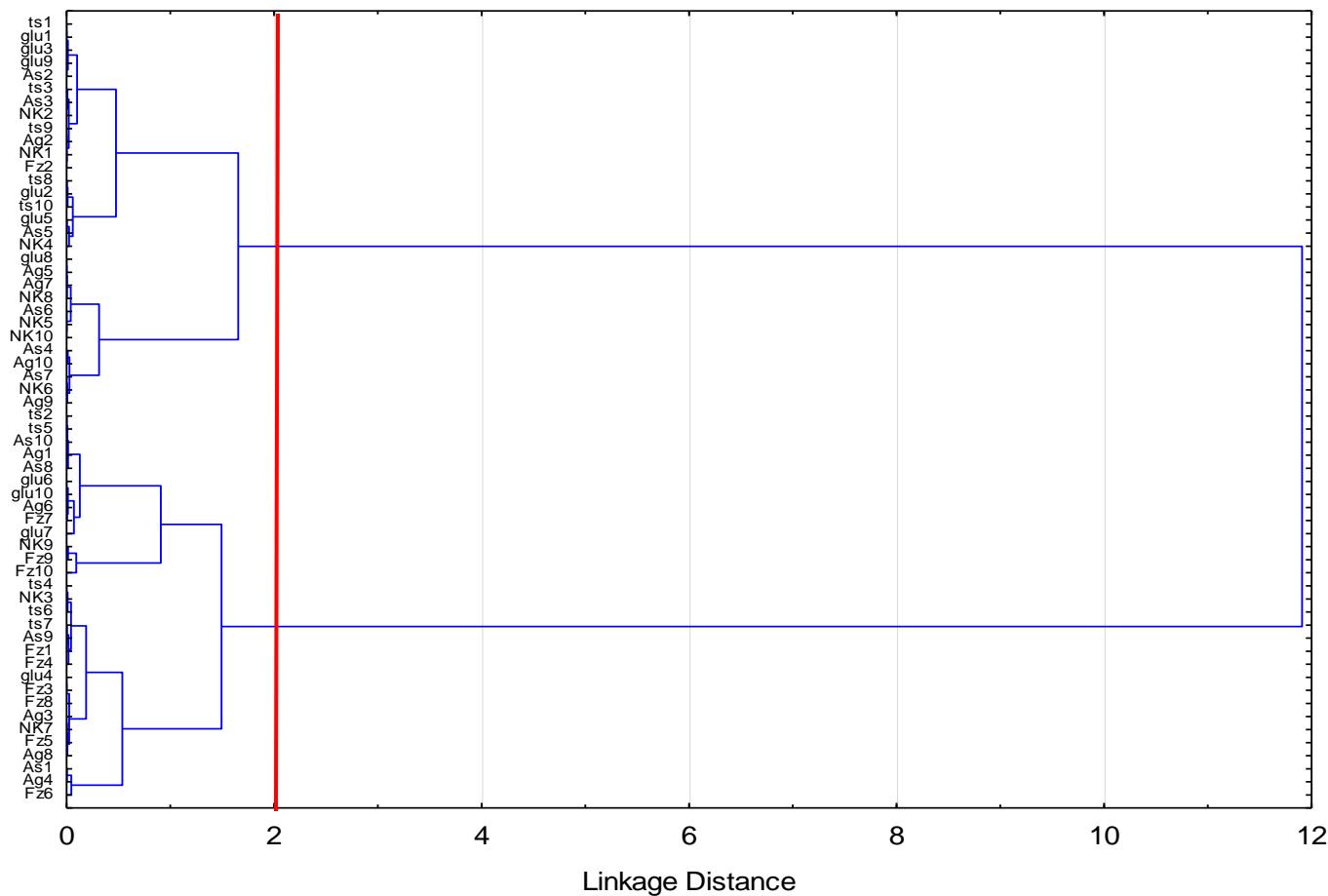


Figure 38. Classification des échantillons arbres *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana* selon les facteurs 1 et 2 identifié par AFC.

Tableau 27. Composition en individus des deux classes identifiées par classification hiérarchique.

Arbres	Classes
Agdz10 ; Agdz2 ; Agdz5 ; Agdz7 ; Agdz9 ; Assa2 ; Assa3 ; Assa4 ; Assa5 ; Assa6 ; Assa7 ; F. Zguid2 ; Guelmim1 ; Guelmim2 ; Guelmim3 ; Guelmim5 ; Guelmim8 ; Guelmim9 ; N'Koub1 ; N'Koub10 ; N'Koub2 ; N'Koub4 ; N'Koub5 ; N'Koub6 ; N'Koub8 ; Tissint1 ; Tissint10 ; Tissint3 ; Tissint8 ; Tissint9	Classe 1
Agdz1 ; Agdz3 ; Agdz4 ; Agdz6 ; Agdz8 ; Assa1 ; Assa10 ; Assa8 ; Assa9 ; F. Zguid1 ; F. Zguid10 ; F. Zguid3 ; F. Zguid4 ; F. Zguid5 ; F. Zguid6 ; F. Zguid7 ; F. Zguid8 ; F. Zguid9 ; Guelmim10 ; Guelmim4 ; Guelmim6 ; Guelmim7 ; N'Koub3 ; N'Koub7 ; N'Koub9 ; Tissint2 ; Tissint4 ; Tissint5 ; Tissint6 ; Tissint7	Classe 2

Globalement, nos résultats montrent que la mise au point de microsatellites à partir de séquences codantes d'*Acacia mangium* et *Acacia auriculiformis* pour les appliquer sur *Acacia tortilis* subsp *raddiana* s'est avérée délicate, ceci peut s'expliquer par leur éloignement phylogénique (Bouchenak-Khelladi *et al.* 2010) et le faible pouvoir des marqueurs SSR-EST pour discriminer les populations proches en leur structure génétique.

Conclusion

L'étude réalisée dans ce chapitre constitue une étape préliminaire pour l'évaluation de la structure génétique d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* dans sa principale aire de répartition au Maroc, en utilisant pour la première fois les marqueurs microsatellites.

Le développement des microsatellites par le programme SSRprimer nous a permis de détecter 63 séquences contenant des motifs de répétition SSR à partir des deux lots de séquences codantes issues de l'assemblage de 9110 EST développés sur *Acacia mangium*, et 2459 sur l'hybride *Acacia auriculiformis* x *Acacia mangium*. Les motifs tri-nucléotides et di-nucléotides étaient les plus abondants avec successivement 20 % et 19 %, suivie par les tétranucléotides 13 % et un pourcentage de 11 % pour les pentanucléotides. Après une sélection basée sur les paires d'amorces qui ont des températures d'hybridations proches, et une contenance en GC supérieures à 50 % on a retenu onze paires d'amorces dont trois se sont révélés polymorphes et reproductibles :

Le Test Mantel a dévoilé une corrélation de l'ordre de $r = -0,06$ ($p\text{-value} = 0,556$) qui exprime une continuité de la structure génétique d'*Acacia tortilis* subsp *raddiana* sur le gradient de notre étude et son indépendance de sa répartition spatiale.

La différenciation inter-provenance est très faible ($G_{ST}=0,03$), ce qui suppose l'homogénéité des structures génétiques et leur distribution aléatoire.

Les 15 allèles identifiés par les quatre paires d'amorces microsatellites ont permis d'identifier 50 haplotypes qui se diffèrent entre eux aux moins par une mutation. Cela corrobore avec les résultats d'AMOVA qui a détecté 96 % de la variation au sein des provenances.

Conclusion générale

Le résultat de la première étude montre que la levée de la dormance tégumentaire pour *Acacia tortilis* subsp *raddiana* nécessite un trempage des graines dans l'acide sulfurique concentré pendant une heure. La scarification mécanique avec le papier-verre a donné également des résultats satisfaisants et reste comparable avec le traitement à l'acide. Par contre, le prétraitement à l'eau bouillante n'est pas suffisamment rentable. Une différence très hautement significative a été démontrée par l'analyse de variance pour le facteur provenance et traitement. Les meilleures moyennes de germination ont été notées pour la provenance de Msied, Foum Zguid et Mcissi avec successivement 97 %, 92 % et 99 %, pour le traitement Acide sulfurique et 99 %, 95 % et 84 % pour le traitement papier verre. Nous avons conclu, également que les provenances qui donnent des taux et des pourcentages de germination importants peuvent ne pas maintenir une cinétique de croissance la meilleure, exemple la provenance de Msied qui a donné un pourcentage de germination important de l'ordre de 97 % pour le traitement chimique, 99 % pour le traitement mécanique, mais une croissance faible représentée par les plus faibles cumule de feuilles, de nœuds et des épines. Pa contre, on trouve que la provenance de Guelmim qui a présenté des taux de germination faibles a développé la meilleure biomasse par rapport à Msied, et Tazarine. La provenance de Mcissi a gardé le même comportement avec la meilleure capacité de germination et de croissance. De ce fait, on peut bien qualifier la provenance Mcissi comme étant la meilleure, suivie par Foum Zguid pour les programmes de sélection afin de boiser les espaces dégradés.

L'analyse des caractères morpho métriques dans leurs différentes formes longueur de la gousse (LP) (cm) ; largeur de la gousse (WB) (mm) ; poids des gousses (WtP) (g) ; le poids des graines par gousse (WtS/P) (g) ; poids des gousses vides (WtEpP) (g) ; nombre de graines par gousse (SN / P) ; le nombre de graines infestées par gousse (InSN/P) ; le poids de 100 graines (100-Wt) (g) et la forme des gousses, a montré que les critères purement morphologiques sont insuffisants pour la sélection des arbres *d'Acacia tortilis* subsp *raddiana*. Les différents traits ne sont pas régulièrement en corrélation avec la qualité des gousses. Les valeurs des coefficients de variation phénotypique importants par rapport aux coefficients de variation génotypique permettent de conclure que la

qualité de la gousse est en grande partie en relation avec les conditions environnementales.

L'étude cytogénétique moyennant différentes techniques de coloration avec et sans fluorescence a montré l'existence de la polyploidie. Deux classes ont été mises en évidence : les tétraploïdes ($2n=4x=52$) et les octaploïde ($2n=8x=104$). Dans un second lieu, la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) avec double étiquetage a été utilisée pour tester à un niveau ponctuel quelques anomalies intrachromosomiques. L'hybridation *in situ* nous a permis de dégager une conclusion sur la perte des rDNA au niveau de cette espèce, qui est un constat i) rare chez les espèces autopolyploïdes reconnues par leur conservation de gènes après dédoublement des chromosomes, ii) se déroule chez les premières générations allopolyplioïdes pour assurer une stabilité des amphiploïdes nouvellement formés.

L'étude de la diversité génétique basée sur les marqueurs moléculaires microsatellites a permis d'approfondir nos connaissances sur le statut génétique des populations naturelles de cette espèce du sud marocain. Les analyses moléculaires réalisées avec des marqueurs génétiques ont permis de caractériser la structure génétique d'*Acacia tortilis subsp raddiana* qui démontre une continuité homogène de sa diversité le long du gradient de notre étude avec une différenciation très faible entre les populations ($G_{ST}=0,03$). Nous avons noté une variation de l'ordre de 96 % qui est apportée par les individus (génotypes), et seulement 4 % de contribution des populations dans la variation totale, cela est illustré par le nombre important d'haplotypes identifiés par les 15 allèles ressortis des 4 paires d'amorces microsatellites étudiés.

Ces résultats apportent des informations de base qui peuvent être exploitées dans la gestion durable de l'espèce sujette de notre étude. Cependant, il ne présente qu'une contribution à l'étude de la structure génétique d'*Acacia tortilis subsp raddiana* au Maroc, qui nécessite une profonde investigation pour la compléter en développant des marqueurs microsatellites spécifiques pour cette espèce, en testant leur ségrégation surtout que sa polyploidie est très élevée pour avoir une idée sur le patron de son évolution en termes de perte ou stabilité de sa diversité d'une génération à l'autre.

Références Bibliographiques

- Abajian, C. (1994). "SPUTNIK." <Http://Espressosoftware.Com/Sputnik/Index.Html>. University Of Washington.
- Abari, A. ; Nasr, M. ; Hodjati, M. ; Bayat, D. And Radmehr, M. (2012). "Maximizing Seed Germination In Two Acacia Species." *Journal Of Forestry Research* **23**(2): 241-244.
- Abdallah, F. And Chaieb, M. (2012a). "The Influence Of Trees On Nutrients, Water, Light Availability And Understorey Vegetation In An Arid Environment." *Applied Vegetation Science*: N/A-N/A.
- Abdallah, F. ; Noumi, Z. ; Ouled-Belgacem, A. ; Michalet, R. ; Touzard, B. And Chaieb, M. (2012b). "The Influence Of Acacia Tortilis (Forssk.) Ssp. Raddiana (Savi) Brenan Presence, Grazing, And Water Availability Along The Growing Season, On The Understory Herbaceous Vegetation In Southern Tunisia." *Journal Of Arid Environments* **76**(0): 105-114.
- Abdallah, F. ; Noumi, Z. ; Touzard, B. ; Belgacem, A. O. ; Neffati, M. And Chaieb, M. (2008). "The Influence Of Acacia Tortilis (Forssk.) Subsp. Raddiana (Savi) And Livestock Grazing On Grass Species Composition, Yield And Soil Nutrients In Arid Environments Of South Tunisia." *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology Of Plants* **203**(2): 116-125.
- Adams, K. L. And Wendel, J. F. (2005). "Polyploidy And Genome Evolution In Plants." *Current Opinion In Plant Biology* **8**(2): 135-141.
- Aguilar-Espinoza, A. ; Guzmán-Riffo, B. ; Haye, P. And Gallardo-Escárate, C. (2012). "Mining Of EST-SSR From 454 Pyrosequencing In The Surf Clam ;Mesodesma Donicum (Lamark, 1818)." *Conservation Genetics Resources*: 1-4.
- Ait Aabd, N. ; El Ayadi, F. ; Msanda, F. And El Mousadik, A. (2011). "Evaluation Of Agromorphological Variability Of Argan Tree Under Different Environmental Conditions In Morocco: Implication For Selection." *International Journal Of Biodiversity And Conservation*, **3**(3), 3(3): 73-82.
- Akkaya, M. S. ; Bhagwat, A. A. And Cregan, P. B. (1992). "Length Polymorphisms Of Simple Sequence Repeat DNA In Soybean." *Genetics* **132**(4): 1131-1139.
- Akram Kiani Abari, M. H. N., Mohammad Hojjati And Dariush Bayat (2011). "Salt Effects On Seed Germination And Seedling Emergence Of Two Acacia Species." *African Journal Of Plant Science* **5**(1): 52-56.,
- Al Faiz, C. (1999). "Selection Of Forage Crops In Morocco In Etienne M. (Ed.) . Dynamics And Sustainability Of Mediterranean Pastoral Systems." Zaragoza : CIHEAM. Cahiers Options Méditerranéennes(39): 91-95.
- Albertini, E. ; Porceddu, A. ; Marconi, G. ; Barcaccia, G. ; Pallottini, L. And Falcinelli, M. (2003). "Microsatellite-AFLP For Genetic Mapping Of Complex Polyploids." *Genome* **46**(5): 824-832.

Aldrich, P. R. ; Hamrick, J. L. ; Chavarriaga, P. And Kochert, G. (1998). "Microsatellite Analysis Of Demographic Genetic Structure In Fragmented Populations Of The Tropical Tree *Sympomia Globulifera*." *Molecular Ecology* **7**(8): 933-944.

Ammondt, S. A. ; Litton, C. M. ; Ellsworth, L. M. And Leary, J. K. (2012). "Restoration Of Native Plant Communities In A Hawaiian Dry Lowland Ecosystem Dominated By The Invasive Grass *Megathyrsus Maximus*." *Applied Vegetation Science*: N/A-N/A.

Andersen, G. L. And Krzywinski, K. (2007a). "Longevity And Growth Of *Acacia Tortilis* ; Insights From 14C Content And Anatomy Of Wood." *BMC Ecol* **7**: 4.

Andersen, G. L. And Krzywinski, K. (2007b). "Mortality, Recruitment And Change Of Desert Tree Populations In A Hyper-Arid Environment." *Plos ONE* **2**(2): E208.

Andreakis, N. ; Kooistra, W. H. C. F. And Procaccini, G. (2009). "High Genetic Diversity And Connectivity In The Polyploid Invasive Seaweed *Asparagopsis Taxiformis* (*Bonnemaisoniales*) In The Mediterranean, Explored With Microsatellite Alleles And Multilocus Genotypes." *Molecular Ecology* **18**(2): 212-226.

Andrew, R. L. ; Miller, J. T. ; Peakall, R. ; Crisp, M. D. And Bayer, R. J. (2003). "Genetic, Cytogenetic And Morphological Patterns In A Mixed Mulga Population: Evidence For Apomixis." *Australian Systematic Botany* **16**(1): 69-80.

Angiolillo, A. ; Mencuccini, M. And Baldoni, L. (1999). "Olive Genetic Diversity Assessed Using Amplified Fragment Length Polymorphisms." *TAG Theoretical And Applied Genetics* **98**(3): 411-421.

Anonyme (2012a). "Chapitre 9. Analyse En Composantes Principales. Apache/Proxad [Apr 20 2012 15:06:04] Server At Foucart.Thierry.Free.Fr Port 80."

Anonyme (2012b). Cours 11 : Homogénéité De La Variance Et Transformations Non Linéaires. Howell, Chapitre 11.9. Statistical Methods For Psychology. PSY 613 Qualitative Research And Analysis In Psychology Series. Http://Web5.Uottawa.Ca/Www5/Dcousineau/Home/Teaching/PSY1004A/1-Notescours/PSY1004_11.Pdf.

Aref, I. M. (2000). "Effects Of Pre-Germination Treatments And Sowing Depths Upon Germination Potential Of Some *Acacia* Species." *Research Bulletin*. **95**: 5-17.

Ashley, M. V. (2010). "Plant Parentage, Pollination, And Dispersal: How DNA Microsatellites Have Altered The Landscape." *Critical Reviews In Plant Sciences* **29**(3): 148-161.

Ashraf, M. And Foolad, M. R. (2005). Pre-Sowing Seed Treatment—A Shotgun Approach To Improve Germination, Plant Growth, And Crop Yield Under Saline And Non-Saline Conditions. *Advances In Agronomy*. L. S. Donald, Academic Press. **Volume 88**: 223-271.

Assoumane, A. ; Mayaki, A. ; Favreau, B. ; Bezançon, G. ; Saadou, M. And Verhaegen, D. (2012). "Differentiation Between Two Sub-Species Of *Acacia Senegal* Complex: ;*Acacia Senegal* (L.) Willd. And *Acacia Dudgeoni Craib* Ex Holland Using

Morphological Traits And Molecular Markers." Genetic Resources And Crop Evolution **59**(1): 39-48.

Assoumane, A. A. ; Vaillant, A. ; Mayaki, A. Z. And Verhaegen, D. (2009). "Isolation And Characterization Of Microsatellite Markers For Acacia Senegal (L.) Willd., A Multipurpose Arid And Semi-Arid Tree." Molecular Ecology Resources **9**(5): 1380-138

Atchison, E. (1948). "Studies In The Leguminosae. II. Cytogeography Of Acacia (Tourn.) L." American Journal Of Botany **35**(10): 651-655.

Aubert , G. (1976). "Les Sols Sodiques En Afrique Du Nord." Http://Horizon.Documentation.Ird.Fr/Exl-Doc/Pleins_Textes/Pleins_Textes_5/B_Fdi_02-03/01402.Pdf.

B. R. Maslin ; Orchard, A. E. And West3, A. J. G. (2003). "Nomenclatural And Classification History Of Acacia (Leguminosae: Mimosoideae), And The Implications Of Generic Subdivision." This Unpublished Paper Was Submitted To The Committee For Spermatophyta In Mid-2003 To Provide Supplementary Information Relevant To The Orchard And Maslin (2003) Proposal To Conserve The Name Acacia With A Conserved Type. This Paper Was Posted To The Worldwidewattle In Late-2003.

Bani-Aameur, F. And Ferradous, A. (2001). "Fruit And Stone Variability In Three Argan (*Argania Spinosa* (L.) Skeels) Populations." Forest Genetics **8**(1): 39–45.

Barathon, J.-J. (1999). "J. Riser - Le Bassin De Tarfaya (Maroc Atlantique, 28° Nord). Paléoenvironnement, Paléoanthropologie, Préhistoire." Géomorphologie : Relief, Processus, Environnement: 285-286.

Barkley, N. ; Roose, M. ; Krueger, R. And Federici, C. (2006). "Assessing Genetic Diversity And Population Structure In A Citrus Germplasm Collection Utilizing Simple Sequence Repeat Markers (Ssrs)." TAG Theoretical And Applied Genetics **112**(8): 1519-1531.

Barnes, M. E. (2001). "Seed Predation, Germination And Seedling Establishment Of *Acacia Erioloba* In Northern Botswana." Journal Of Arid Environments **49**: 541–554.

Baskin, C. C. And Baskin, J. M. (2000a). "Ecology And Evolution Of Specialized Seed Dispersal, Dormancy And Germination Strategies." Plant Species Biology **15**(2): 95-96.

Baskin, J. M. ; Baskin, C. C. And Li, X. (2000b). "Taxonomy, Anatomy And Evolution Of Physical Dormancy In Seeds." Plant Species Biology **15**(2): 139-152.

Benmohammadi, A. ; Benmohammadi, L. ; Ballais, J. L. And Riser, J. (2000). "Analyse Des Interrelations Anthropiques Et Naturelles: Leur Impact Sur La Recrudescence Des Phénomènes D'ensablement Et De Désertification Au Sud-Est Du Maroc (Vallée De Drâa Et Vallée De Ziz). ." Sciences Et Changements. Planétaires / Sécheresse. **11** (4): 297-308.

Bentsink, L. And Koornneef, M. (2008). "Seed Dormancy And Germination." Arabidopsis Book **6**: E0119.

Berger, C. A. And Witkus, E. R. (1950). "Naturally Occurring Polyploidy In The Development Of *Albizzia Julibrissin* Durazz." *Botanical Gazette* **111**(3): 312-313.

Berger, C. A. ; Witkus, E. R. And Mcmahon, R. M. (1958). "Cytotaxonomic Studies In The Leguminosae." *Bulletin Of The Torrey Botanical Club* **85**(6): 405-415.

Bewley, J. D. (1997). "Seed Germination And Dormancy." *Plant Cell* **9**(7): 1055-1066.

Bewley, J. D. And Black, M. (1994). *Seeds: Physiology Of Development And Germination*, Springer.

Bijaber, N. And Ahlafi , Z. (2005). "Projet FORMA : Etudes Détaillées Pour La Cartographie Des Changements Dans Le Cadre De l'Inventaire Forestier National." *GEO OBSERVATEUR* **14**: 13-21.

Birouk, A. And Dattée, Y. (1989). "Organisation De La Variabilité Enzymatique Des Populations Marocaines De Luzerne (*Medicago Sativa L.*): Structures Géniques Et Génotypiques." *Genome* **32**(1): 120-128.

Birouk, A. ; Tazi, M. ; Mellas, H. And Maghnouj, M. M. (1996). "Rapport De Pays Pour La Conference Technique Internationale De La Fao Sur Les Ressources Phytogenetiques." [Http://Www.Pgrfa.Org/Gpa/Mar/Maroc1.Pdf](http://Www.Pgrfa.Org/Gpa/Mar/Maroc1.Pdf).

Bornard, A. (2006). *Les Végétations D'alpage De La Vanoise: Description Agro-Ecologique Et Gestion Pastorale*, Quae Editions.

Bouchenak-Khelladi, Y. ; Maurin, O. ; Hurter, J. And Van Der Bank, M. (2010). "The Evolutionary History And Biogeography Of Mimosoideae (Leguminosae): An Emphasis On African Acacias." *Molecular Phylogenetics And Evolution* **57**(2): 495-508.

Bowden, W. M. (1940). "Diploidy, Polyploidy, And Winter Hardiness Relationships In The Flowering Plants." *American Journal Of Botany* **27**(6): 357-371.

Bowie, M. And Ward, D. (2004). "Water And Nutrient Status Of The Mistletoe *Plicosepalus Acaciae* Parasitic On Isolated Negev Desert Populations Of *Acacia Raddiana* Differing In Level Of Mortality." *Journal Of Arid Environments* **56**(3): 487-508.

Brooker, R. W. And Kikvidze, Z. (2008). "Importance: An Overlooked Concept In Plant Interaction Research." *Journal Of Ecology* **96**(4): 703-708.

Brown, R. C. And Lemmon, B. E. (2001). "The Cytoskeleton And Spatial Control Of Cytokinesis In The Plant Life Cycle." *Protoplasma* **215**(1): 35-49.

Brown, S. ; Hopkins, M. ; Mitchell, S. ; Senior, M. ; Wang, T. ; Duncan, R. ; Gonzalez-Candelas, F. And Kresovich, S. (1996). "Multiple Methods For The Identification Of Polymorphic Simple Sequence Repeats (Ssrs) In Sorghum `;Sorghum Bicolor (L.) Moench]." *TAG Theoretical And Applied Genetics* **93**(1): 190-198.

Bukhari, Y. M. (1997). "Cytoevolution Of Taxa In *Acacia*and *Prosopis* (Mimosaceae)." *Australian Journal Of Botany* **45**(5): 879-891.

Butcher, P. A. ; Decroocq, S. ; Gray, Y. And Moran, G. F. (2000). "Development, Inheritance And Cross-Species Amplification Of Microsatellite Markers From *Acacia Mangium*." TAG Theoretical And Applied Genetics **101**(8): 1282-1290.

Callaway, R. M. And Walker, L. R. (1997). "COMPETITION AND FACILITATION: A SYNTHETIC APPROACH TO INTERACTIONS IN PLANT COMMUNITIES." Ecology **78**(7): 1958-1965.

Callen, D. F. ; Thompson, A. D. ; Shen, Y. ; Phillips, H. A. ; Richards, R. I. ; Mulley, J. C. And Sutherland, G. R. (1993). "Incidence And Origin Of "Null" Alleles In The (AC)N Microsatellite Markers." Am J Hum Genet **52**(5): 922-927.

Campa, C. And O.R.S.T.O.M. (1998). L'acacia Au Sénégal: Actes De La Réunion 3-5 Décembre 1996, Dakar, Sénégal, Editions De l'Orstom.

Cardoso, C. (1995). "Contribution A L'étude De La Diversité Génétique Des Acacias Sahéliens: l'*Acacia Tortilis* Subsp. *Raddiana* Au Sénégal." Thèse Doct., Univ. Paris XI, 230 P.

Cavieres, L. And Sierra-Almeida, A. (2012). Facilitative Interactions Do Not Wane With Warming At High Elevations In The Andes. Oecologia, Springer Berlin / Heidelberg: 1-10.

Centre For Mediterranean Cooperation, I. U. C. N. N. R. U. (2005). A Guide To Medicinal Plants In North Africa, IUCN Centre For Mediterranean Cooperation.

Chen, T. T. (1936). "Observations On Mitosis In Opalinids (Protozoa, Ciliata): I. The Behavior And Individuality Of Chromosomes And Their Significance." Proc Natl Acad Sci U S A **22**(10): 594-602.

Cheng, X. ; Xu, J. ; Xia, S. ; Gu, J. ; Yang, Y. ; Fu, J. ; Qian, X. ; Zhang, S. ; Wu, J. And Liu, K. (2009). "Development And Genetic Mapping Of Microsatellite Markers From Genome Survey Sequences In *Brassica Napus*." TAG Theoretical And Applied Genetics **118**(6): 1121-1131.

Chiveu, C. J. ; Dangasuk, O. G. ; Omunyin, M. E. And Wachira, F. N. (2009). "Quantitative Variation Among Kenyan Populations Of *Acacia Senegal* (L.) Willd. For Gum Production, Seed And Growth Traits." New Forests **38**: 1-14.

Chung, M. Y. And Chung, M. G. (2012). "A Review Of The Use Of Genetic Markers In Orchid Systematics With Emphasis On Allozymes." Biochemical Systematics And Ecology **41**(0): 62-73.

Clark, L. V. And Jasieniuk, M. (2011). "Polysat: An R Package For Polyploid Microsatellite Analysis." Molecular Ecology Resources **11**(3): 562-566.

Clemens, J. ; Jones, P. And Gilbert, N. (1977). "Effect Of Seed Treatments On Germination In *Acacia*." Australian Journal Of Botany **25**(3): 269-276.

Collevatti, R. G. ; Grattapaglia, D. And Hay, J. D. (2001). "Population Genetic Structure Of The Endangered Tropical Tree Species *Caryocar Brasiliense*, Based On Variability At Microsatellite Loci." Molecular Ecology **10**(2): 349-356.

Comai, L. (2005). "The Advantages And Disadvantages Of Being Polyploid." *Nat Rev Genet* **6**(11): 836-846.

Conesa, A. ; Götz, S. ; García-Gómez, J. M. ; Terol, J. ; Talón, M. And Robles, M. (2005). "Blast2GO: A Universal Tool For Annotation, Visualization And Analysis In Functional Genomics Research." *Bioinformatics* **21**(18): 3674-3676.

Conover, W. J. ; Johnson, M. E. And Johnson, M. M. (1981). "A Comparative Study Of Tests For Homogeneity Of Variances, With Applications To The Outer Continental Shelf Bidding Data." *Technometrics* **23**(4): 351-361.

Cooper, D. C. (1936). "Chromosome Numbers In The Leguminosae." *American Journal Of Botany* **23**(3): 231-233.

Cour, L. L. (1941). "Acettc-Orcein: A New Stain-Fixative For Chromosomes." *Biotechnic & Histochemistry* **16**(4): 169-174.

Cruzan, M. B. (1998). "Genetic Markers In Plant Evolutionary Ecology." *Ecology*, **79**(2): 400–412.

D'Hont, A. ; Rao, P. S. ; Feldmann, P. ; Grivet, L. ; Islam-Faridi, N. ; Taylor, P. And Glaszmann, J. C. (1995). "Identification And Characterisation Of Sugarcane Intergeneric Hybrids, < ;i> ;Saccharum Officinarum X < ;i> ;Erianthus Arundinaceus , With Molecular Markers And DNA In Situ Hybridisation." *TAG Theoretical And Applied Genetics* **91**(2): 320-326.

Damme, D. V. ; Bouget, F.-Y. ; Poucke, K. V. ; Inzé, D. And Geelen, D. (2004). "Molecular Dissection Of Plant Cytokinesis And Phragmoplast Structure: A Survey Of GFP-Tagged Proteins." *The Plant Journal* **40**(3): 386-398.

Dangasuk, O. G. And Gudu, S. (2000). "Allozyme Variation In 16 Natural Populations Of Faidherbia Albida (Del.) A. Chev." *Hereditas* **133**(2): 133-145.

Dayanandan, S. ; Dole, J. ; Bawa, K. And Kesseli, R. (1999). "Population Structure Delineated With Microsatellite Markers In Fragmented Populations Of A Tropical Tree, Carapa Guianensis (Meliaceae)." *Molecular Ecology* **8**(10): 1585-1592.

De Robertis, E. D. P. ; De Robertis, E. M. F. ; Lemonde, A. And Delisle, C. (1983). *Biologie Cellulaire Et Moléculaire*, Presses De l'Université Laval.

Derbel, S. ; Noumi, Z. ; Anton, K. And Chaieb, M. (2007). "Life Cycle Of The Coleopter Bruchidius Raddiana And The Seed Predation Of The Acacia Tortilis Subsp. Raddiana In Tunisia." *C. R. Biologies* **330**: 49–54.

Devos, K. M. And Gale, M. D. (1992). "The Use Of Random Amplified Polymorphic DNA Markers In Wheat." *TAG Theoretical And Applied Genetics* **84**(5): 567-572.

Di Vecchi-Staraz, M. ; Laucou, V. ; Bruno, G. ; Lacombe, T. ; Gerber, S. ; Bourse, T. ; Boselli, M. And This, P. (2009). "Low Level Of Pollen-Mediated Gene Flow From Cultivated To Wild Grapevine: Consequences For The Evolution Of The Endangered Subspecies *Vitis Vinifera* L. Subsp. *Silvestris*." *Journal Of Heredity* **100**(1): 66-75.

Dib, C. ; Faure, S. ; Fizames, C. ; Samson, D. ; Drouot, N. ; Vignal, A. ; Millasseau, P. ; Marc, S. ; Kazan, J. ; Seboun, E. ; Lathrop, M. ; Gyapay, G. ; Morissette, J. And Weissenbach, J. (1996). "A Comprehensive Genetic Map Of The Human Genome Based On 5,264 Microsatellites." *Nature* **380**(6570): 152-154.

Dommergues, Y. R. (1995). "Nitrogen Fixation By Trees In Relation To Soil Nitrogen Economy." *Nutrient Cycling In Agroecosystems* **42**(1): 215-230.

Ducouso, D. And Thoen, D. (1991). "Les Types Mycorhyziens Des Acacieae. In. Physiologie Des Arbres Et Arbustes En Zones Arides Et Semi-Arides: Séminaire, Paris-Nancy, 20 Mars-6 Avril 1990." 175-182.

El Ayadi, F. ; Ait Aabd, N. ; El Finti, A. ; Msanda, F. ; Baniaameur, F. And El Mousadik, A. (2011). "Genetic Variability Of Wild Provenances Of *Acacia Tortilis* Ssp. *Raddiana* (Savi) Brenan In South Of Morocco." *Asian Journal Of Plant Sciences*, **10** (1): 43-51.

El Ayadi, F. ; Msanda, F. ; Baniaameur, F. And El Mousadik, A. (2012). "Morphological And Shape Pods Variability Of *Acacia Tortilis* Ssp. *Raddiana* (Savi) Brenan In South Of Morocco." *International Journal Of Plant Breeding And Genetics*, **6** (4): 151-167.

El Ferchichi Ouarda, H. ; Walker, D. ; Khouja, M. And Correal, E. (2009). "Diversity Analysis Of *Acacia Tortilis* (Forsk.) Hayne Ssp. *Raddiana* (Savi) Brenan (Mimosaceae) Using Phenotypic Traits, Chromosome Counting And DNA Content Approaches." *Genetic Resources And Crop Evolution* **56**(7): 1001-1010.

Engel, V. L. And Parrotta, J. A. (2001). "An Evaluation Of Direct Seeding For Reforestation Of Degraded Lands In Central São Paulo State, Brazil." *Forest Ecology And Management* **152**(1-3): 169-181.

Ernst, W. H. O. ; Tolsma, D. J. And Decelle, J. E. (1989). "Predation Of Seeds Of *Acacia Tortilis* By Insects." Blackwell Publishing On Behalf Of Nordic Society Oikos **54**(3): 294-300.

Esselink, G. D. ; Nybom, H. And Vosman, B. (2004). "Assignment Of Allelic Configuration In Polyploids Using The MAC-PR (Microsatellite DNA Allele Counting—Peak Ratios) Method." *TAG Theoretical And Applied Genetics* **109**(2): 402-408.

Excoffier, L. ; Smouse, P. E. And Quattro, J. M. (1992). "Analysis Of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application To Human Mitochondrial DNA Restriction Data." *Genetics* **131**(2): 479-491.

FAO (1983). "Manuel Sur La Taxonomie Des Espèces D'acacias." Archives De Documents De La FAO. [Http://Www.Fao.Org/DOCREP/006/Q2934F/Q2934F00.HTM](http://Www.Fao.Org/DOCREP/006/Q2934F/Q2934F00.HTM): 60.

Faria, D. ; Mamani, E. ; Pappas, G. And Grattapaglia, D. (2011). "Genotyping Systems For Eucalyptus Based On Tetra-, Penta-, And Hexanucleotide Repeat EST Microsatellites And Their Use For Individual Fingerprinting And Assignment Tests." *Tree Genetics & Genomes* **7**(1): 63-77.

Feldman, M. ; Liu, B. ; Segal, G. ; Abbo, S. ; Levy, A. A. And Vega, J. M. (1997). "Rapid Elimination Of Low-Copy DNA Sequences In Polyploid Wheat: A Possible Mechanism For Differentiation Of Homoeologous Chromosomes." *Genetics* **147**(3): 1381-1387.

Feng, S. ; Li, W. ; Huang, H. ; Wang, J. And Wu, Y. (2009). "Development, Characterization And Cross-Species/Genera Transferability Of EST-SSR Markers For Rubber Tree (&Lt ;I&Gt ;*Hevea Brasiliensis*)." *Molecular Breeding* **23**(1): 85-97.

Fennane, M. ; Ibn Tattou, M. ; Mathez, J. ; Ouyahya, A. And Oualidi, J. (2007). *Flore Pratique Du Maroc*.

Finch-Savage, W. E. And Leubner-Metzger, G. (2006). "Seed Dormancy And The Control Of Germination." *New Phytol* **171**(3): 501-523.

Flight, P. A. And Rand, D. M. (2012). "Genetic Variation In The Acorn Barnacle From Allozymes To Population Genomics." *Integrative And Comparative Biology*.

Fox, C. W. ; Wallin, W. G. ; Bush, M. L. ; Czesak, M. E. And Messina, F. J. (2012). "Effects Of Seed Beetles On The Performance Of Desert Legumes Depend On Host Species, Plant Stage, And Beetle Density." *Journal Of Arid Environments* **80**(0): 10-16.

Fredua-Agyeman, R. ; Adamski, D. ; Liao, R. J. ; Morden, C. And Borthakur, D. (2008). "Development And Characterization Of Microsatellite Markers For Analysis Of Population Differentiation In The Tree Legume *Acacia Koa* (Fabaceae: Mimosoideae) In The Hawaiian Islands." *Genome* **51**(12): 1001-1015.

Fterich, A. ; Mahdhi, M. ; Lafuente, A. ; Pajuelo, E. ; Caviedes, M. A. ; Rodriguez-Llorente, I. D. And Mars, M. (2012a). "Taxonomic And Symbiotic Diversity Of Bacteria Isolated From Nodules Of *Acacia Tortilis* Subsp. *Raddiana* In Arid Soils Of Tunisia." *Canadian Journal Of Microbiology* **58**(6): 738-751.

Fterich, A. ; Mahdhi, M. And Mars, M. (2012b). "Impact Of Grazing On Soil Microbial Communities Along A Chronosequence Of *Acacia Tortilis* Subsp. *Raddiana* In Arid Soils In Tunisia." *European Journal Of Soil Biology* **50**(0): 56-63.

Galas, S. ; Descamps, S. And Martinez, A. M. (2008). *Le Cycle Cellulaire*, De Boeck Université.

Ganesan, A. T. And Swaminathan, M. S. (1958). "Staining The Nucleus In Yeasts." *Biotechnic & Histochemistry* **33**(3): 115-121.

Gates, R. R. (1924). "Polyploidy." *The British Journal Of Experimental Biology* **1**(2): 153-182.

Gazol, A. And Julio Camarero, J. (2012). "The Performance Of Mediterranean Subshrubs Depends More On Microsite Than On Regional Climate Conditions." *Journal Of Vegetation Science*: N/A-N/A.

Gillet, E. M. E. (1999). "Chapter 2 In Which DNA Marker For Which Purpose? Final Compendium Of The Research Project Development, Optimisation And Validation Of Molecular Tools For Assessment Of Biodiversity In Forest Trees In The European

Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools For Biodiversity. .

Glasenapp, J. S. ; Casali, V. W. D. ; Barbosa, P. B. ; Martins, E. R. And Cruz, C. D. (2012). "Allozyme Variation In A Natural Population Of *Stryphnodendron Adstringens* In The Rio Preto State Park, Southeastern Brazil." Brazilian Journal Of Botany **35**(2): 137-144.

Goda, S. (1986). "Germination Of *Acacia Nilotica* (L.Willd) Seeds." Sudan Silva **26**: 25-32.

Goddard, R. H. ; Wick, S. M. ; Silflow, C. D. And Snustad, D. P. (1994). "Microtubule Components Of The Plant Cell Cytoskeleton." Plant Physiol **104**(1): 1-6.

Goergen, E. And Chambers, J. (2012). "Facilitation And Interference Of Seedling Establishment By A Native Legume Before And After Wildfire." Oecologia **168**(1): 199-211.

Gómez-Aparicio, L. (2009). "The Role Of Plant Interactions In The Restoration Of Degraded Ecosystems: A Meta-Analysis Across Life-Forms And Ecosystems." Journal Of Ecology **97**(6): 1202-1214.

Gong, L. And Deng, Z. (2010). "EST-SSR Markers For Gerbera (Gerbera Hybrida)." Molecular Breeding **26**(1): 125-132.

Gornall, R. J. ; Wentworth, J. E. And Bennett, S. T. (2011). "Loss Of Rrna Loci In Autotetraploid *Parnassia Palustris* (Celastraceae)." New Journal Of Botany **1**(1): 33-37.

Griffiths, A. J. F. ; Miller, J. H. ; Suzuki, D. T. ; Lewontin, R. C. ; Gelbart, W. M. ; Sanlaville, C. ; Aragnol, D. And Charmot, D. (2002). Introduction A L'analyse Génétique, De Boeck Université.

Grime, J. P. (1998). "Benefits Of Plant Diversity To Ecosystems: Immediate, Filter And Founder Effects." Journal Of Ecology **86**(6): 902-910.

Griscom, H. P. And Ashton, M. S. (2011). "Restoration Of Dry Tropical Forests In Central America: A Review Of Pattern And Process." Forest Ecology And Management **261**(10): 1564-1579.

Grouzis, M. And Floc'h, É. L. (2003a). Un Arbre Au Désert: *Acacia Raddiana*, Institut De Recherche Pour Le Développement Editions.

Grouzis, M. And Le Floc'h, E. (2003b). "Un Arbre Au Desert *Acacia Raddiana*." IRD Édition.

Guinet, P. And Vassal, J. (1978). "Hypotheses On The Differentiation Of The Major Groups In The Genus *Acacia* (Leguminosae)." Kew Bulletin **32**(3): 509-527.

Guo, D. ; Hou, X. And Wang, J. (2012). Development Of EST-SSR Primers And Genetic Realtionships Revealed In Tree Peony. Biomedical Engineering And Biotechnology (Icbeb), 2012 International Conference On.

Gutierrez, M. ; Vaz Patto, M. ; Huguet, T. ; Cubero, J. ; Moreno, M. And Torres, A. (2005). "Cross-Species Amplification Of *Medicago Truncatula* Microsatellites Across Three Major Pulse Crops." TAG Theoretical And Applied Genetics **110**(7): 1210-1217.

Guterman, Y. (2000). "Environmental Factors And Survival Strategies Of Annual Plant Species In The Negev Desert, Israel." *Plant Species Biology* **15**(2): 113-125.

Hadrys, H. ; Balick, M. And Schierwater, B. (1992). "Applications Of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) In Molecular Ecology." *Molecular Ecology* **1**(1): 55-63.

Hamant, C. ; Lescanne, N. And Vassal, J. (1975). "Sur Quelques Nombres Chromosomiques Nouveaux Dans Le Genre *Acacia*." *Taxon* **24**(5/6): 667-670.

Hamrick, J. L. And Murawski, D. A. (1990). "The Breeding Structure Of Tropical Tree Populations." *Plant Species Biology* **5**(1): 157-165.

Han, T. H. ; Van Eck, H. J. ; De Jeu, M. J. And Jacobsen, E. (1999). "Optimization Of AFLP Fingerprinting Of Organisms With A Large-Sized Genome: A Study On Alstroemeria Spp." *TAG Theoretical And Applied Genetics* **98**(3): 465-471.

HCEFLCD (2012). "Forêts Marocaines." Haut Commissariat Aux Eaux Et Forêts Et A La Lutte Contre La Désertification <Http://Www.Eauxetforets.Gov.Ma/Fr/Text.Aspx?Id=993&Uid=23>.

Hearne, C. M. ; Ghosh, S. And Todd, J. A. (1992). "Microsatellites For Linkage Analysis Of Genetic Traits." *Trends In Genetics* **8**(8): 288-294.

Hegarty, M. J. And Hiscock, S. J. (2008). "Genomic Clues To The Evolutionary Success Of Polyploid Plants." *Current Biology* **18**(10): R435-R444.

Hilhorst, H. W. M. (1995). "A Critical Update On Seed Dormancy. I. Primary Dormancy." *Seed Science Research* **5**(02): 61-73.

Howard, A. And Pelc, S. R. (1951). "Synthesis Of Nucleoprotein In Bean Root Cells." *Nature* **167**(4250): 599-600.

Howard, A. And Pelc, S. R. (1986). "Synthesis Of Desoxyribonucleic Acid In Normal And Irradiated Cells And Its Relation To Chromosome Breakage." *International Journal Of Radiation Biology* **49**(2): 207-218.

Islam-Faridi, M. N. And Mujeeb-Kazi, A. (1995). "Visualization Of < ;i> ;Secale Cereale DNA In Wheat Germ Plasm By Fluorescent In Situ Hybridization." *TAG Theoretical And Applied Genetics* **90**(5): 595-600.

J.Maley (1980). "Les Changements Climatiques De La Fin Du Tertiaire En Afrique: Leur Conséquence Sur L'apparition Du Sahara Et De Sa Végétation." ORSTOM Fonds Documentaire **U STL, Montpellier, France**(29 105 Cote B).

Jaari, S. ; Li, M.-H. And Merila, J. (2009). "A First-Generation Microsatellite-Based Genetic Linkage Map Of The Siberian Jay (*Perisoreus Infaustus*): Insights Into Avian Genome Evolution." *BMC Genomics* **10**(1): 1.

Jacques, D. ; Marchal, M. And Curnel, Y. (2004). "Relative Efficiency Of Alternative Methods To Evaluate Wood Stiffness In The Frame Of Hybrid Larch (*Larix* × *Eurolepis Henry*) Clonal Selection." *Ann. For. Sci.* **61** 35-43

Jenczewski, E. ; Prosperi, J. M. And Ronfort, J. (1999). "Differentiation Between Natural And Cultivated Populations Of *Medicago Sativa* (Leguminosae) From Spain:

Analysis With Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers And Comparison To Allozymes." *Molecular Ecology* **8**(8): 1317-1330.

Jewell, E. ; Robinson, A. ; Savage, D. ; Erwin, T. ; Love, C. G. ; Lim, G. A. ; Li, X. ; Batley, J. ; Spangenberg, G. C. And Edwards, D. (2006). "Ssrprimer And SSR Taxonomy Tree: Biome SSR Discovery." *Nucleic Acids Res* **34**(Web Server Issue): W656-659.

Jiang, L. ; Wang, L. ; Liu, L. ; Zhu, X. ; Zhai, L. And Gong, Y. (2012). "Development And Characterization Of Cdna Library Based Novel EST-SSR Marker In Radish (*Raphanus Sativus L.*)." *Scientia Horticulturae* **140**(0): 164-172.

Jones, C. J. ; Edwards, K. J. ; Castaglione, S. ; Winfield, M. O. ; Sala, F. ; Van De Wiel, C. ; Bredemeijer, G. ; Vosman, B. ; Matthes, M. ; Daly, A. ; Brettschneider, R. ; Bettini, P. ; Buiatti, M. ; Maestri, E. ; Malcevschi, A. ; Marmiroli, N. ; Aert, R. ; Volckaert, G. ; Rueda, J. ; Linacero, R. ; Vazquez, A. And Karp, A. (1997). "Reproducibility Testing Of RAPD, AFLP And SSR Markers In Plants By A Network Of European Laboratories." *Molecular Breeding* **3**(5): 381-390.

Jurado, E. And Westoby, M. (1992). "Germination Biology Of Selected Central Australian Plants." *Australian Journal Of Ecology* **17**(3): 341-348.

Kamm, U. ; Rotach, P. ; Gugerli, F. ; Siroky, M. ; Edwards, P. And Holderegger, R. (2009). "Frequent Long-Distance Gene Flow In A Rare Temperate Forest Tree (*Sorbus Domestica*) At The Landscape Scale." *Heredity (Edinb)* **103**(6): 476-482.

Karp, A. ; Seberg, O. And Buiatti, M. (1996). "Molecular Techniques In The Assessment Of Botanical Diversity." *Annals Of Botany* **78**(2): 143-149.

Karp, G. ; Bouharmont, J. And Wissocq, J. C. (2004). *Biologie Cellulaire Et Moléculaire*, De Boeck Université.

Kashkush, K. ; Feldman, M. And Levy, A. A. (2002). "Gene Loss, Silencing And Activation In A Newly Synthesized Wheat Allotetraploid." *Genetics* **160**(4): 1651-1659

Kearse, M. ; Moir, R. ; Wilson, A. ; Stones-Havas, S. ; Cheung, M. ; Sturrock, S. ; Buxton, S. ; Cooper, A. ; Markowitz, S. ; Duran, C. ; Thierer, T. ; Ashton, B. ; Meintjes, P. And Drummond, A. (2012). "Geneious Basic: An Integrated And Extendable Desktop Software Platform For The Organization And Analysis Of Sequence Data." *Bioinformatics* **28**(12): 1647-1649.

Khandka, D. K. ; Tuna, M. ; Tal, M. ; Nejidat, A. And Golan-Goldhirsh, A. (1997). "Variability In The Pattern Of Random Amplified Polymorphic DNA." *Electrophoresis* **18**(15): 2852-2856.

Khanna, P. (1997). "Nutrient Cycling Under Mixed-Species Tree Systems In Southeast Asia." *Agroforestry Systems* **38**(1): 99-120.

Kijas, J. M. H. ; Fowler, J. C. S. ; Garbett, C. A. And Thomas, M. R. (1994). "Enrichment Of Microsatellites From Citrus Genome Using Biotinylated Oligonucleotide Sequences Bound To Streptavidin-Coated Magnetic Particles." *Biotechniques* **1994** ; **16** : 656-62.

Kikvidze, Z. ; Michalet, R. ; Brooker, R. ; Cavieres, L. ; Lortie, C. ; Pugnaire, F. And Callaway, R. (2011). "Climatic Drivers Of Plant–Plant Interactions And Diversity In Alpine Communities." *Alpine Botany* **121**(1): 63-70.

Klose, S. ; Reichert, B. And Lahmouri, A. (2008). Management Options For A Sustainable Groundwater Use In The Middle Drâa Oases Under The Pressure Of Climatic Changes

Climatic Changes And Water Resources In The Middle East And North Africa. F. Zereini And H. Hötzl, Springer Berlin Heidelberg: 179-195.

Krauss, S. L. And He, T. H. (2006). "Rapid Genetic Identification Of Local Provenance Seed Collection Zones For Ecological Restoration And Biodiversity Conservation." *Journal For Nature Conservation* **14**(3–4): 190-199.

Kunstler, G. ; Chad ; Uf, J. ; Klein, E. K. ; Curt, T. ; Bouchaud, M. And Lepart, J. (2006). "Tree Colonization Of Sub-Mediterranean Grasslands: Effects Of Dispersal Limitation And Shrub Facilitation." *Canadian Journal Of Forest Research* **37**(1): 103-115.

Ky, C. L. ; Barre, P. ; Lorieux, M. ; Trouslot, P. ; Akaffou, S. ; Louarn, J. ; Charrier, A. ; Hamon, S. And Noirot, M. (2000). "Interspecific Genetic Linkage Map, Segregation Distortion And Genetic Conversion In Coffee (*Coffea Sp.*)."*Theoretical And Applied Genetics* **101**(4): 669-676.

Labidi, S. ; Nasr, H. ; Zouaghi, M. And Wallander, H. (2007). "Effects Of Compost Addition On Extra-Radical Growth Of Arbuscular Mycorrhizal Fungi In *Acacia Tortilis* Ssp. *Raddiana* Savanna In A Pre-Saharan Area." *Applied Soil Ecology* **35**(1): 184-192.

Lacey, K. R. ; Jackson, P. K. And Stearns, T. (1999). "Cyclin-Dependent Kinase Control Of Centrosome Duplication." *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **96**(6): 2817-2822.

Leitch, I. J. And Bennett, M. D. (1997). "Polyploidy In Angiosperms." *Trends In Plant Science* **2**(12): 470-476.

Lemes, M. R. ; Gribel, R. ; Proctor, J. And Grattapaglia, D. (2003). "Population Genetic Structure Of Mahogany (*Swietenia Macrophylla* King, Meliaceae) Across The Brazilian Amazon, Based On Variation At Microsatellite Loci: Implications For Conservation." *Molecular Ecology* **12**(11): 2875-2883.

Lepais, O. And Bacles, C. F. (2011). "Comparison Of Random And SSR-Enriched Shotgun Pyrosequencing For Microsatellite Discovery And Single Multiplex PCR Optimization In *Acacia Harpophylla* F. Muell. Ex Benth." *Mol Ecol Resour* **11**(4): 711-724.

Levene, H. (1960). "Robust Tests For The Equality Of Variances," In Contributions To Probability And Statistics, Ed. I. Olkin, Palo Alto, Calif. [Http://Books.Google.Ca/Books](http://Books.Google.Ca/Books)." Stanford University Press: 278-292.

Levin, D. A. (1983). "Polyploidy And Novelty In Flowering Plants." *The American Naturalist* **122**(1): 1-25.

Liang, X. ; Chen, X. ; Hong, Y. ; Liu, H. ; Zhou, G. ; Li, S. And Guo, B. (2009). "Utility Of EST-Derived SSR In Cultivated Peanut (*Arachis Hypogaea L.*) And Arachis Wild Species." *BMC Plant Biol* **9**(1): 1-9.

Liu, B. And Lee, Y. R. (2001). "Kinesin-Related Proteins In Plant Cytokinesis." *Journal Of Plant Growth Regulation* **20**(2): 141-150.

Liu, F. ; Wang, F. And Duan, D. (2012). "EST-SSR Markers Derived From *Laminaria Digitata* And Its Transferable Application In *Saccharina Japonica*." *Journal Of Applied Phycology* **24**(3): 501-505.

Lodish, H. ; Berk, A. ; Matsudaira, P. ; Kaiser, C. A. ; Krieger, M. ; Scott, M. P. ; Zipursky, S. L. ; Darnell, J. ; Constantinescu, S. N. And Masson, P. L. (2005). *Biologie Moléculaire De La Cellule*, De Boeck Supérieur.

Lodish, H. And François, C. (1997). *Biologie Moléculaire De La Cellule*, De Boeck Université.

Loveless, M. D. And Hamrick, J. L. (1984). "Ecological Determinants Of Genetic Structure In Plant Populations." *Annual Review Of Ecology And Systematics* **15**(Article type: Research-Article / Full Publication Date: 1984 / Copyright © 1984 Annual Reviews): 65-95.

Lu, X. ; Wang, H. ; Liu, B. And Xiang, J. (2012). "Three EST-SSR Markers Associated With QTL For The Growth Of The Clam *Meretrix Meretrix* Revealed By Selective Genotyping." *Marine Biotechnology*: 1-10.

Lüllmann-Rauch, R. And Sprumont, P. (2008). *Histologie*, De Boeck Université.

M. Mcgranahanl ; Bell, J. C. ; Moranz, G. F. And Slee', M. (1997). "High Genetic Divergence Between Geographic Regions In The Highly Outcrossing Species *Acacia Aulacocarpa* (Cunn. Ex Benth.)." *Forest Genetics* **4**(1): 1-13.

Ma, K.-H. ; Kim, N.-S. ; Lee, G.-A. ; Lee, S.-Y. ; Lee, J. ; Yi, J. ; Park, Y.-J. ; Kim, T.-S. ; Gwag, J.-G. And Kwon, S.-J. (2009). "Development Of SSR Markers For Studies Of Diversity In The Genus *Fagopyrum*." *TAG Theoretical And Applied Genetics* **119**(7): 1247-1254.

Maestre, F. T. ; Bautista, S. And Cortina, J. (2003). "positive, negative, and net effects in grass–shrub interactions in mediterranean semiarid grasslands." *Ecology* **84**(12): 3186-3197.

Maire, R. (1987). *Flore De l'Afrique Du Nord*, Vol. .

Maley, J. (1980). "Les Changements Climatiques De La Fin Du Tertiaire En Afrique: Leur Conséquence Sur L'apparition Du Sahara Et De Sa Végétation." ORSTOM Fonds Documentaire **USTL, Montpellier, France**(29 105 Cote B).

Mandal, A. K. And Ennos, R. A. (1995). "Mating System Analysis In A Natural Population Of *Acacia Nilotica* Subspecies *Kraussiana*." *Forest Ecology And Management* **79**(3): 235-240.

Mandal, A. K. ; Ennos, R. A. And Fagg, C. W. (1994). "Mating System Analysis In A Natural Population Of *Acacia Nilotica* Subspecies ; *Leiocarpa*." TAG Theoretical And Applied Genetics **89**(7): 931-935.

Mantel, N. And Valand, R. S. (1970). "A Technique Of Nonparametric Multivariate Analysis." Biometrics. International Biometric Society **26**(3): 547-558.

Masamba, C. (1994). "Presowing Seed Treatments On Four African Acacia Species: Appropriate Technology For Use In Forestry For Rural Development." Forest Ecology And Management **64**(2-3): 105-109.

Mbaye, N., A.T. ; Diop, M. ; Guèye, A. T. ; Diallo, C. E. And Sall, P. I. S. (2002). "Etude Du Comportement Germinatif Et Essais De Levée De L'inhibition

Tégumentaire Des Graines De *Zornia Glochidiata* Reichb. Ex DC., Légumineuse Fourragère." Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop., 2002, 55 (1) : 47-52.

Mcneil, M. ; Hermann, S. ; Jackson, P. And Aitken, K. (2011). "Conversion Of AFLP Markers To High-Throughput Markers In A Complex Polyploid, Sugarcane." Molecular Breeding **27**(3): 395-407.

Mehari, A. ; Ericsson, T. And Weih, M. (2005). "Effects Of NaCl On Seedling Growth, Biomass Production And Water Status Of *Acacia Nilotica* And *A. Tortilis*." Journal Of Arid Environments **62**(2): 343-349.

Meirmans, P. G. And Van Tienderen, P. H. (2004). "Genotype And Genodive: Two Programs For The Analysis Of Genetic Diversity Of Asexual Organisms." Molecular Ecology Notes **4**(4): 792-794.

Mhirit, O. And Blerot, P. (1999). Le Grand Livre De La Forêt Marocaine, Mardaga.

Millar, M. (2009). "Characterisation Of Microsatellite DNA Markers For The Rare *Acacia Woodmaniorum* (Leguminosae: Mimosaceae)." Conservation Genetics Resources **1**(1): 441-445.

Millar, M. ; Byrne, M. ; Nuberg, I. And Sedgley, M. (2008). "High Outcrossing And Random Pollen Dispersal In A Planted Stand Of *Acacia Saligna* Subsp. *Saligna* Revealed By Paternity Analysis Using Microsatellites." Tree Genetics & Genomes **4**(3): 367-377.

Miller, M. F. (1995). "Acacia Seed Survival, Seed Germination And Seedling Growth Following Pod Consumption By Large Herbivores And Seed Chewing By Rodents." African Journal Of Ecology **33**(3): 194-210.

Ministère De l'Energie, D. M., De l'Eau Et De l'Environnement- Département De l'Eau (2012). "Les Bassins Hydrauliques Du Maroc. [Http://Www.Water.Gov.Ma/Index.Cfm?Gen=True&Id=13&ID_PAGE=37](http://Www.Water.Gov.Ma/Index.Cfm?Gen=True&Id=13&ID_PAGE=37).

Molecular, P. (1999). "Propidium Iodide Nucleic Acid Stain." Product Information **MP 01304**.

Morgante, M. And Olivieri, A. M. (1993). "PCR-Amplified Microsatellites As Markers In Plant Genetics." The Plant Journal **3**(1): 175-182.

- Morton, B. B. And Forsythe, A. B. (1974). "Robust Tests For The Equality Of Variances." *Journal Of The American Statistical Association* **69**(346): 364-367.
- Msanda, F. (2004). Végétation De l'Anti-Atlas Occidental Et De Sa Retombée Saharienne (Maroc): Essai De Synthèse. Thèse d'Etat. Université Ibn Zohr, Agadir, 121p.
- Munro, N. T. ; Fischer, J. ; Wood, J. And Lindenmayer, D. B. (2009). "Revegetation In Agricultural Areas: The Development Of Structural Complexity And Floristic Diversity." *Ecological Applications* **19**(5): 1197-1210.
- Munzbergova, Z. And Ward, D. (2002). "Acacia Trees As Keystone Species In Negev Desert Ecosystems." *Journal Of Vegetation Science* **13**(2): 227-236.
- Nanson, A. (1970). "Heritability And Genetic Gain In Some Types Of Experiments." *Silvae Genetica* **19**: 113-121.
- Nanson, A. (2004). Génétique Et Amélioration Des Arbres Forestiers, Les Presses Agronomiques De Gembloux.
- Navashin, M. (1925). "Polyploid Mutations In Crepis. Triploid And Pentaploid Mutants Of CREPIS CAPILLARIS." *Genetics* **10**(6): 583-592.
- Nevill, P. ; Anthony, J. And Krauss, S. (2010). "Isolation And Characterization Of Microsatellite Markers For The Banded Ironstone Endemic Acacia Karina (Leguminosae: Mimosaceae) And Cross-Species Amplification With A. Stanleyi And A. Jibberdingensis." *Conservation Genetics Resources* **2**(0): 321-323.
- Ng, C.-H. ; Lee, S.-L. ; Ng, K. ; Muhammad, N. And Ratnam, W. (2009). "Mating System And Seed Variation Of Acacia Hybrid (A. Mangium × A. Auriculiformis)." *Journal Of Genetics* **88**(1): 25-31.
- Ng, C. H. ; Koh, S. C. ; Lee, S. L. ; Ng, K. K. S. ; Mark, A. ; Norwati, M. And Wickneswari, R. (2005). "Isolation Of 15 Polymorphic Microsatellite Loci In Acacia Hybrid (Acacia Mangium×Acacia Auriculiformis)." *Molecular Ecology Notes* **5**(3): 572-575.
- Nikolic, N. (2009). Diversité Génétique Et Taille Efficace Chez Les Populations De Poissons Sauvages : Le Cas Du Saumon Atlantique Un Poisson Migrateur Amphihalin Menacé. Ecole Doctorale Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques, Et Bioingénieries, Toulouse.
- Noumi, Z. And Chaieb, M. (2012). "Dynamics Of Acacia Tortilis (Forssk.) Hayne Subsp. Raddiana (Savi) Brenan In Arid Zones Of Tunisia." *Acta Botanica Gallica* **159**(1): 121-126.
- Noumi, Z. ; Touzard, B. ; Michalet, R. And Chaieb, M. (2010). "The Effects Of Browsing On The Structure Of Acacia Tortilis (Forssk) Hayne Ssp. Raddiana (Savi) Brenan Along A Gradient Of Water Availability In Arid Zones Of Tunisia." *Journal Of Arid Environments* **74**: 625-631.
- Nurse, P. (1990). "Universal Control Mechanism Regulating Onset Of M-Phase." *Nature* **344**(6266): 503-508.

Oballa, P. O. And Oln'otie, P. A. S. (1993). "Chromosome Numbers In Two African Acacia Species." *Kew Bulletin* **49**(1): 107-113.

Ohnishi, S. ; Miyoshi, T. And Shirai, S. (2010). "Low Temperature Stress At Different Flower Developmental Stages Affects Pollen Development, Pollination, And Pod Set In Soybean." *Environmental And Experimental Botany* **69**(1): 56-62.

Oln'otie, P. A. S. (1991). "Acacia Tortilis (Forssk.) Hayne: A Study Of Genetic Diversity And Breeding Systems." Unpublished D. Phil. Thesis, Univ. Of Oxford, 116

Orozco-Almanza, M. A. S. ; De León-García, L. P. ; Grether, R. And García-Moya, E. (2003). "Germination Of Four Species Of The Genus *Mimosa* (Leguminosae) In A Semi-Arid Zone Of Central Mexico." *Journal Of Arid Environments* **55**(1): 75-92.

Ortega-Pieck, A. ; López-Barrera, F. ; Ramírez-Marcial, N. And García-Franco, J. G. (2011). "Early Seedling Establishment Of Two Tropical Montane Cloud Forest Tree Species: The Role Of Native And Exotic Grasses." *Forest Ecology And Management* **261**(7): 1336-1343.

Otegui, M. S. ; Mastronarde, D. N. ; Kang, B. H. ; Bednarek, S. Y. And Staehelin, L. A. (2001). "Three-Dimensional Analysis Of Syncytial-Type Cell Plates During Endosperm Cellularization Visualized By High Resolution Electron Tomography." *The Plant Cell Online* **13**(9): 2033-2051.

Otegui, M. S. And Staehelin, L. A. (2000). "Cytokinesis In Flowering Plants: More Than One Way To Divide A Cell." *Current Opinion In Plant Biology* **3**(6): 493-502.

Otero-Arnaiz, A. ; Schnabel, A. ; Glenn, T. C. ; Schable, N. A. ; Hagen, C. And Ndong, L. (2005). "Isolation And Characterization Of Microsatellite Markers In The East African Tree, *Acacia Brevispica* (Fabaceae: Mimosoideae)." *Molecular Ecology Notes* **5**(2): 366-368.

Ottewell, K. ; Bickerton, D. And Lowe, A. (2011). "Can A Seed Bank Provide Demographic And Genetic Rescue In A Declining Population Of The Endangered Shrub ;*Acacia Pinguifolia* ?" *Conservation Genetics* **12**(3): 669-678.

Padilla, F. M. And Pugnaire, F. I. (2006). "The Role Of Nurse Plants In The Restoration Of Degraded Environments." *Frontiers In Ecology And The Environment* **4**(4): 196-202

Pammi, S. ; Schertz, K. ; Xu, G. ; Hart, G. And Mullet, J. E. (1994). "Random-Amplified-Polymorphic DNA Markers In Sorghum." *TAG Theoretical And Applied Genetics* **89**(1): 80-88.

Parisod, C. ; Holderegger, R. And Brochmann, C. (2010). "Evolutionary Consequences Of Autopolyploidy." *New Phytologist* **186**(1): 5-17.

Parrotta, J. A. ; Turnbull, J. W. And Jones, N. (1997). "Catalyzing Native Forest Regeneration On Degraded Tropical Lands." *Forest Ecology And Management* **99**(1-2): 1-7.

Pedley, L. (1986). "Derivation And Dispersal Of Acacia (Leguminosae), With Particular Reference To Australia, And The Recognition Of Senegalia And Racosperma." *Botanical Journal Of The Linnean Society* **92**(3): 219-254.

Pemberton, J. M. ; Slate, J. ; Bancroft, D. R. And Barrett, J. A. (1995). "Nonamplifying Alleles At Microsatellite Loci: A Caution For Parentage And Population Studies." *Molecular Ecology* **4**(2): 249-252.

Pennington, R. T. (2012). "Recent Work Of The LEGUME PHYLOGENETIC WORKING GROUP (LPWG)." *Newsletter The Bean Bag*(58).

Pfeiffer, T. ; Roschanski, A. M. ; Pannell, J. R. ; Korbecka, G. And Schnittler, M. (2011). "Characterization Of Microsatellite Loci And Reliable Genotyping In A Polyploid Plant, *Mercurialis Perennis* (Euphorbiaceae)." *Journal Of Heredity* **102**(4): 479-488.

Pinto, L. R. ; Oliveira, K. M. ; Ulian, E. C. ; Garcia, A. A. F. And De Souza, A. P. (2004). "Survey In The Sugarcane Expressed Sequence Tag Database (SUCEST) For Simple Sequence Repeats." *Genome* **47**(5): 795-804.

Playford, J. ; Bell, J. And Moran, G. (1993). "A Major Disjunction In Genetic Diversity Over The Geographic Range Of <I>Acacia Melanoxyylon</I> R.Br." *Australian Journal Of Botany* **41**(3): 355-368.

Pometti, C. ; Bessega, C. ; Vilardi, J. And Saidman, B. (2012). "Landscape Genetic Structure Of Natural Populations Of &Lt ;I&Gt ;*Acacia Caven* In Argentina." *Tree Genetics & Genomes*: 1-14.

Powell, W. ; Machray, G. C. And Provan, J. (1996a). "Polymorphism Revealed By Simple Sequence Repeats." *Trends In Plant Science* **1**(7): 215-222.

Powell, W. ; Morgante, M. ; Andre, C. ; Hanafey, M. ; Vogel, J. ; Tingey, S. And Rafalski, A. (1996b). "The Comparison Of RFLP, RAPD, AFLP And SSR (Microsatellite) Markers For Germplasm Analysis." *Molecular Breeding* **2**(3): 225-238.

Prat, D. ; Rampant, P. F. And Prado, E. (2006). Analyse Du Génome Et Gestion Des Ressources Génétiques Forestières, INRA, Institut National De La Recherche Agronomique.

Raghavan, V. (2002). "Induction Of Vivipary In *Arabidopsis* By Silique Culture: Implications For Seed Dormancy And Germination." *Am J Bot* **89**(5): 766-776.

Raina, S. N. ; Parida, A. ; Koul, K. K. ; Salimath, S. S. ; Bisht, M. S. ; Raja, V. And Khoshoo, T. N. (1994). "Associated Chromosomal DNA Changes In Polyploids." *Genome* **37**(4): 560-564.

Ramsey, J. And Schemske, D. W. (1998). "Pathways, Mechanisms, And Rates Of Polyploid Formation In Flowering Plants." *Annual Review Of Ecology And Systematics* **29**(ArticleType: Research-Article / Full Publication Date: 1998 / Copyright © 1998 Annual Reviews): 467-501.

Rand, D. M. (1996). "Neutrality Tests Of Molecular Markers And The Connection Between DNA Polymorphism, Demography, And Conservation Biology." *Conservation Biology* **10**(2): 665-671.

Randolph, L. F. (1932). "Some Effects Of High Temperature On Pol Yploid Y And Other Variations In Maize." *Proc Natl Acad Sci U S A* **18**(3): 222–229.

Raven, P. H. ; Evert, R. F. ; Eichhorn, S. E. ; Bouharmont, J. And Evrard, C. M. (2003). *Biologie Végétale*, De Boeck Université.

Raven, P. H. ; Johnson, G. B. ; Mason, K. A. ; Losos, J. B. ; Singer, S. S. ; Bouharmont, J. ; Masson, P. L. And Van Hove, C. (2011). *Biologie*, De Boeck Supérieur.

Richardson, P. J. ; Lundholm, J. T. And Larson, D. W. (2010). "Natural Analogues Of Degraded Ecosystems Enhance Conservation And Reconstruction In Extreme Environments." *Ecological Applications* **20**(3): 728-740.

Ricklefs, R. E. ; Miller, G. L. ; Baguette, M. ; Baguette, V. ; Mahy, G. ; D'Amico, F. And Bugnicourt, M. (2005). *Écologie*, De Boeck Supérieur.

Riverst, D. ; Rolo, V. ; Lopez-Diaz, L. And Moreno, G. (2011). Shrub Encroachment In Mediterranean Silvopastoral Systems: Retama Sphaerocarpa And Cistus Ladanifer Induce Contrasting Effects On Pasture And Quercus Ilex Production. Oxford, ROYAUME-UNI, Elsevier. **141**: 8.

Robinson, A. J. ; Love, C. G. ; Batley, J. ; Barker, G. And Edwards, D. (2004). "Simple Sequence Repeat Marker Loci Discovery Using SSR Primer." *Bioinformatics* **20**(9): 1475-1476.

Rodrigues, A. P. D. C. ; Kohl, M. C. ; Pedrinho, D. R. ; Arias, E. R. A. And Favero, S. (2008). "Treatments To Overcome Dormancy Of Acacia Mangium Seeds." *Acta Scientiarum - Agronomy* **30**(2): 279-283.

Roodt, V. (1998). *Trees & Shrubs Of The Okavango Delta: Medicinal Uses And Nutritional Value*, Shell.

Roose, E. ; Sabir, M. And Laouina, A. (2011). *Gestion Durable Des Eaux Et Des Sols Au Maroc: Valorisation Des Techniques Traditionnelles Méditerranéennes*, IRD.

Ross, I. ; Misson, L. ; Rambal, S. ; Arneth, A. ; Scott, R. L. ; Carrara, A. ; Cescatti, A. And Genesio, L. (2012). "How Do Variations In The Temporal Distribution Of Rainfall Events Affect Ecosystem Fluxes In Seasonally Water-Limited Northern Hemisphere Shrublands And Forests?" *Biogeosciences* **9**(3): 1007-1024.

Rostami, A. And Shahsavar, A. (2009). "Effects Of Seed Scarification On Seed Germination And Early Growth Of Olive Seedlings." *Journal Of Biological Science* **9**(8): 825-828.

Rozen, S. And Skaletsky, H. (1999). *Primer3 On The WWW For General Users And For Biologist Programmers*. Bioinformatics Methods And Protocols. S. Misener And S. A. Krawetz, Humana Press. **132**: 365-386.

Ruiz-Guajardo, J. C. ; Otero-Arnaiz, A. ; Taylor, T. ; Stone, G. ; Glenn, T. C. ; Schable, N. A. ; Miller, J. T. ; Preuss, S. And Schnabel, A. (2007). "Isolation Of Polymorphic Microsatellite Markers In The Sub-Saharan Tree, *Acacia (Senegalalia) Mellifera* (Fabaceae: Mimosoideae)." *Molecular Ecology Notes* **7**(6): 1138-1140.

Saidi, S. ; Sebbata, O. ; Bencherqi, A. ; Mrabet, R. ; Oukabli, A. ; Safi, N. E. E. ; Hamoutou, M. ; Ouabbou, H. And Alaoui, M. I. A. A. (2007). "RAPPORT NATIONAL SUR L'ÉTAT DES RESSOURCES PHYTOGÉNÉTIQUES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE." Deuxième Rapport National Sur L'état Des Ressources Phytogénétiques Pour L'alimentation Et L'agriculture (RPGAA).

Salvini, D. ; Bruschi, P. ; Fineschi, S. ; Grossoni, P. ; Kjær, E. D. And Vendramin, G. G. (2009). "Natural Hybridisation Between *Quercus Petraea* (Matt.) Liebl. And *Quercus Pubescens* Willd. Within An Italian Stand As Revealed By Microsatellite Fingerprinting." *Plant Biology* **11**(5): 758-765.

Samuels, A. L. ; Giddings, T. H. And Staehelin, L. A. (1995). "Cytokinesis In Tobacco BY-2 And Root Tip Cells: A New Model Of Cell Plate Formation In Higher Plants." *The Journal Of Cell Biology* **130**(6): 1345-1357.

Santoni, S. ; Faivre-Rampant, P. ; Prado, E. And Prat, D. (2000). "Marqueurs Moléculaires Pour L'analyse Des Ressources Génétiques Et L'amélioration Des Plantes." *Cahiers D'études Et De Recherches Francophones / Agricultures* **4**: 311-27.

Schlichting, C. D. (1986). "The Evolution Of Phenotypic Plasticity In Plants." *Annual Review Of Ecology And Systematics* **17**(ArticleType: Research-Article / Full Publication Date: 1986 / Copyright © 1986 Annual Reviews): 667-693.

Schreiber, J. (1951). "A Schedule For The Study Of Somatic Chromosomes In *Bromus*." *Biotechnic & Histochemistry* **26**(4): 247-250.

Scott, K. D. ; Eggler, P. ; Seaton, G. ; Rossetto, M. ; Ablett, E. M. ; Lee, L. S. And Henry, R. J. (2000). "Analysis Of Ssrs Derived From Grape Ests." *TAG Theoretical And Applied Genetics* **100**(5): 723-726.

Selkoe, K. A. And Toonen, R. J. (2006). "Microsatellites For Ecologists: A Practical Guide To Using And Evaluating Microsatellite Markers." *Ecology Letters* **9**(5): 615-62

Sharma, R. K. ; Bhardwaj, P. ; Negi, R. ; Mohapatra, T. And Ahuja, P. S. (2009). "Identification, Characterization And Utilization Of Unigene Derived Microsatellite Markers In Tea (*Camellia Sinensis* L.)." *BMC Plant Biol* **9**: 53.

Shetta, N. D. ; Al-Shaharani, T. S. And Abdel-Aal, M. (2011). "Identification And Characterization Of Rhizobium Associated With Woody Legume Trees Grown Under Saudi Arabia Condition." *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci* **10**(3): 410-418.

Shono, K. ; Davies, S. J. And Kheng, C. Y. (2006). "Regeneration Of Native Plant Species In Restored Forests On Degraded Lands In Singapore." *Forest Ecology And Management* **237**(1-3): 574-582.

Shrestha, M. K. ; Golan-Goldhirsh, A. And Ward, D. (2002). "Population Genetic Structure And The Conservation Of Isolated Populations Of *Acacia Raddiana* In The Negev Desert." *Biological Conservation* **108**(1): 119-127.

Sirelkhatem, R. And Gaali, A. E. E. L. (2009). "Phylogenetic Analysis In *Acacia Senegal* Using AFLP Molecular Markers Across The Gum Arabic Belt In Sudan." *African Journal Of Biotechnology* **8**(19): 4817-4823.

Siret, R. (2001). "Etude Du Polymorphisme Génétique De La Vigne Cultivée (*Vitis Vinifera L.*) A L'aide De Marqueurs Microsatellites : Application A La Caractérisation Des Cépages Dans Les Vins." Thèse De Doctorat En Sciences Des Aliments. Université Montpellier I, 130pp.

Slavov, G. T. ; Leonardi, S. ; Burczyk, J. ; Adams, W. T. ; Strauss, S. H. And Difazio, S. P. (2009). "Extensive Pollen Flow In Two Ecologically Contrasting Populations Of *Populus Trichocarpa*." *Molecular Ecology* **18**(2): 357-373.

Soltis, D. E. And Soltis, P. S. (1999). "Polyploidy: Recurrent Formation And Genome Evolution." *Trends In Ecology & Evolution* **14**(9): 348-352.

Soltis, D. E. ; Soltis, P. S. And Tate, J. A. (2004). "Advances In The Study Of Polyploidy Since Plant Speciation." *New Phytologist* **161**(1): 173-191.

Soltis, P. S. (2005). "Ancient And Recent Polyploidy In Angiosperms." *New Phytologist* **166**(1): 5-8.

Soltis, P. S. And Soltis, D. E. (2000). "The Role Of Genetic And Genomic Attributes In The Success Of Polyploids." *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **97**(13): 7051-7057.

Sonobe, S. ; Nakayama, N. ; Shimmen, T. And Sone, Y. (2000). "Intracellular Distribution Of Subcellular Organelles Revealed By Antibody Against Xyloglucan During Cell Cycle In Tobacco BY-2 Cells." *Protoplasma* **213**(3): 218-227.

Sraphet, S. ; Boonchanawiwat, A. ; Thanyasiriwat, T. ; Boonseng, O. ; Tabata, S. ; Sasamoto, S. ; Shirasawa, K. ; Isobe, S. ; Lightfoot, D. ; Tangphatsornruang, S. And Triwitayakorn, K. (2011). "SSR And EST-SSR-Based Genetic Linkage Map Of Cassava (*Manihot Esculenta Crantz*)." *TAG Theoretical And Applied Genetics* **122**(6): 1161-1170.

Statsoft France , V. (2003). "STATISTICA (Logiciel D'analyse De Données)." From [Www.Statsoft.Com](http://www.Statsoft.Com).

Stebbins, G. L., Jr. (1938). "Cytological Characteristics Associated With The Different Growth Habits In The Dicotyledons." *American Journal Of Botany* **25**(3): 189-198.

Sukganah, A.; Liew, W. Y. and Wickneswari, R. "Development of EST-SSR Markers from *Acacia auriculiformis* x *Acacia mangium* Interspecific Hybrid and Their Transferability Across Acacia Species." *Molecular Ecology Resources*.

Suzuki, S. ; Suda, K. ; Sakurai, N. ; Ogata, Y. ; Hattori, T. ; Suzuki, H. ; Shibata, D. And Umezawa, T. (2011). "Analysis Of Expressed Sequence Tags In Developing Secondary Xylem And Shoot Of *Acacia Mangium*." *Journal Of Wood Science* **57**(1): 40-46.

Sy, A. ; Grouzis, M. And Danthu, P. (2001). "Seed Germination Of Seven Sahelian Legume Species." *Journal Of Arid Environments* **49**(4): 875-882.

Symons, S. J. ; Simpson, G. M. And Adkins, S. W. (1987). "Secondary Dormancy In *Avena Fatua*: Effect Of Temperature And After-Ripening." *Physiologia Plantarum* **70**(3): 419-426.

Tadros, M. ; Samarah, N. And Alqudah, A. (2011). "Effect Of Different Pre-Sowing Seed Treatments On The Germination Of *Leucaena Leucocephala* (Lam.) And *Acacia Farnesiana* (L.)." *New Forests* **42**(3): 397-407.

Tal, M. (1977). "Physiology Of Polyploid Plants: DNA, RNA, Protein, And Abscisic Acid In Autotetraploid And Diploid Tomato Under Low And High Salinity." *Botanical Gazette* **138**(2): 119-122.

Tal, M. And Gardi, I. (1976). "Physiology Of Polyploid Plants: Water Balance In Autotetraploid And Diploid Tomato Under Low And High Salinity." *Physiologia Plantarum* **38**(4): 257-261.

Tanaka, A. ; Ohtani, M. ; Suyama, Y. ; Inomata, N. ; Tsumura, Y. ; Middleton, B. ; Tachida, H. And Kusumi, J. (2012). "Population Genetic Structure Of A Widespread Coniferous Tree, *Taxodium Distichum* [L.] Rich. (Cupressaceae), In The Mississippi River Alluvial Valley And Florida." *Tree Genetics & Genomes*: 1-13.

Tanksley, S. (1983). "Molecular Markers In Plant Breeding." *Plant Molecular Biology Reporter* **1**(1): 3-8.

Tautz, D. (1989). "Hypervariability Of Simple Sequences As A General Source For Polymorphic DNA Markers." *Nucleic Acids Research* **17**(16): 6463-6471.

Technical. ; Data And Sheet (1999). "41,6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride (DAPI)." *Polysciences, Inc. Data Sheet #315*.

Teketay, D. (1996). "Germination Ecology Of Twelve Indigenous And Eight Exotic Multipurpose Leguminous Species From Ethiopia." *Forest Ecology And Management* **80**(1-3): 209-223.

Teketay, D. (1998). "Germination Of *Acacia Origena*, *A. Pilispina* And *Pterolobium Stellatum* In Response To Different Pre-Sowing Seed Treatments, Temperature And Light." *Journal Of Arid Environments* **38**: 551-560.

Tjio, J. H. (1948). "THE SOMATIC CHROMOSOMES OF SOME TROPICAL PLANTS." *Hereditas* **34**(1-2): 135-146.

Tjio, J. H. And Levan, A. (1950). "Quadruple Structure Of The Centromere." *Nature* **165**(4192): 368-368.

Tlaskal, J. (1979). "Combined Cycloheximide And 8-Hydroxyquinoline Pretreatment For Study Of Plant Chromosomes." *Biotechnic & Histochemistry* **54**(6): 313-319.

Ueno, S. ; Aoki, K. And Tsumura, Y. (2009). "Generation Of Expressed Sequence Tags And Development Of Microsatellite Markers For *Castanopsis Sieboldii* Var. *Sieboldii* (Fagaceae)." *Annals Of Forest Science* **66**(5): 509-509.

Vallée, C. And Bilodeau, G. (1999). *Les Techniques De Culture En Multicellules*. Cégep Joliette-De Lanaudière. Institut Québécois Du Développement De L'horticulture Ornamentale. Presses De l'Université Laval.

Valster, A. H. ; Pierson, E. S. ; Valenta, R. ; Hepler, P. K. And Emons, A. (1997). "Probing The Plant Actin Cytoskeleton During Cytokinesis And Interphase By Profilin Microinjection." *The Plant Cell Online* **9**(10): 1815-1824.

Venier, P. ; Carrizo-García, C. ; Cabido, M. And Funes, G. (2012a). "Survival And Germination Of Three Hard-Seeded Acacia Species After Simulated Cattle Ingestion: The Importance Of The Seed Coat Structure." *South African Journal Of Botany* **79**(0): 19-24.

Venier, P. ; Funes, G. And Carrizo-García, C. (2012b). "Physical Dormancy And Histological Features Of Seeds Of Five Acacia Species (Fabaceae) From Xerophytic Forests In Central Argentina." *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology Of Plants* **207**(1): 39-46.

Venier, P. ; García, C. C. ; Cabido, M. And Funes, G. (2012c). "Survival And Germination Of Three Hard-Seeded Acacia Species After Simulated Cattle Ingestion: The Importance Of The Seed Coat Structure." *South African Journal Of Botany* **79**: 19–24.

Vesey-Fitzgerald, D. F. (1955). "Vegetation Of The Red Sea Coast South Of Jeddah, Saudi Arabia." *Journal Of Ecology* **43**(2): 477-489.

Via, S. And Lande, R. (1985). "Genotype-Environment Interaction And The Evolution Of Phenotypic Plasticity." *Evolution* **39**(3): 505-522.

Vos, P. ; Hogers, R. ; Bleeker, M. ; Reijans, M. ; Lee, T. V. ; Hornes, M. ; Fritters, A. ; Pot, J. ; Paleman, J. ; Kuiper, M. And Zabeau, M. (1995). "AFLP: A New Technique For DNA Fingerprinting." *Nucleic Acids Research* **23**(21): 4407-4414.

Wagner, J. W. H. (1970). "Biosystematics And Evolutionary Noise." *Taxon* **19**(2): 146-151.

Wang, X. ; Mathieu, A. ; Cournède, P. H. ; Allirand, J. M. ; Jullien, A. ; De Reffye, P. And Zhang, B. G. (2011). "Variability And Regulation Of The Number Of Ovules, Seeds And Pods According To Assimilate Availability In Winter Oilseed Rape (*Brassica Napus L.*)." *Field Crops Research* **122**(1): 60-69.

Wang, Y. ; Qin, Y. ; Du, Z. And Yan, G. (2012). "Genetic Diversity And Differentiation Of The Endangered Tree *Elaeagnus Mollis* Diels (*Elaeagnus L.*) As Revealed By Simple Sequence Repeat (SSR) Markers." *Biochemical Systematics And Ecology* **40**: 25–33.

Wardill, T. J. ; Scott, K. D. ; Graham, G. C. And Zalucki, M. P. (2004). "Isolation And Characterization Of Microsatellite Loci From *Acacia Nilotica* Ssp. *Indica* (Mimosaceae)." *Molecular Ecology Notes* **4**(3): 361-363.

Warren, W. D. ; Steffensen, S. ; Lin, E. ; Coelho, P. ; Loupart, M. L. ; Cobbe, N. ; Lee, J. Y. ; Mckay, M. J. ; Orr-Weaver, T. ; Heck, M. M. S. And Sunkel, C. E. (2000). "The *Drosophila RAD21* Cohesin Persists At The Centromere Region In Mitosis." *Current Biology* **10**(22): 1463-1466.

Weising, K. ; Atkinson, R. G. And Gardner, R. C. (1995). "Genomic Fingerprinting By Microsatellite-Primed PCR: A Critical Evaluation." *Genome Research* **4**(5): 249-255.

Weltzin, J. F. And Coughenour, M. B. (1990). "Savanna Tree Influence On Understory Vegetation And Soil Nutrients In Northwestern Kenya." *Journal Of Vegetation Science* **1**(3): 325-334.

Wilcox, R. R. (1987). "New Designs In Analysis Of Variance." *Annual Review Of Psychology* **38**(1): 29-60.

Williams, J. G. K. ; Kubelik, A. R. ; Livak, K. J. ; Rafalski, J. A. And Tingey, S. V. (1990). "DNA Polymorphisms Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers." *Nucleic Acids Research* **18**(22): 6531-6535.

Wipf, L. (1939). "Chromosome Numbers In Root Nodules And Root Tips Of Certain Leguminosae." *Botanical Gazette* **101**(1): 51-67.

Yakar, N. (1952). "Cytochemical Studies On Pycnotic Root-Tip Cells." *Botanical Gazette* **114**(1): 72-79.

Yong, S. ; Choong, C. ; Cheong, P. ; Pang, S. ; Nor Amalina, R. ; Harikrishna, J. ; Mat-Isa, M. ; Hedley, P. ; Milne, L. ; Vaillancourt, R. And Wickneswari, R. (2011). "Analysis Of Ests Generated From Inner Bark Tissue Of An *Acacia Auriculiformis* X *Acacia Mangium* Hybrid." *Tree Genetics & Genomes* **7**(1): 143-152.

Yu, Z. ; Haage, K. ; Streit, V. ; Gierl, A. And Torres -Ruiz, R. (2009). "A Large Number Of Tetraploid *Arabidopsis Thaliana* Lines, Generated By A Rapid Strategy, Reveal High Stability Of Neo-Tetraploids During Consecutive Generations." *TAG Theoretical And Applied Genetics* **118**(6): 1107-1119.

Zerhari, K. ; Aurag, J. ; Khbaya, B. ; Kharchaf, D. And Filali-Maltouf, A. (2000). "Phenotypic Characteristics Of Rhizobia Isolates Nodulating Acacia Species In The Arid And Saharan Regions Of Morocco." *Letters In Applied Microbiology* **30**(5): 351-357.

Zhang, D. (2002). "Marqueurs Moléculaires: Outils De Choix Pour Le Génotypage Des Plantes." 12ème Colloque Sur Les Recherches Fruitières, Les Apports De La Biologie Moléculaires En Arboriculture Fruitière. Bordeaux.

Zhang, D. ; Cheng, H. ; Wang, H. ; Zhang, H. ; Liu, C. And Yu, D. (2010). "Identification Of Genomic Regions Determining Flower And Pod Numbers Development In Soybean (*Glycine Max L.*)."*Journal Of Genetics And Genomics* **37**(8): 545-556.

Zhang, D. ; Wadsworth, P. And Hepler, P. K. (1993). "Dynamics Of Microfilaments Are Similar, But Distinct From Microtubules During Cytokinesis In Living, Dividing Plant Cells." *Cell Motility And The Cytoskeleton* **24**(3): 151-155.

Zhang, J. ; Wang, Z. ; Wang, B. ; Li, M. And Zhang, W. (2001). "AFLP Analysis On Genetic Structure Of Planted *Acacia Auriculiformis* Population In Heshan." Ying Yong Sheng Tai Xue Bao = The Journal Of Applied Ecology / Zhongguo Sheng Tai Xue Xue Hui, Zhongguo Ke Xue Yuan Shenyang Ying Yong Sheng Tai Yan Jiu Suo Zhu Ban **12**(4): 491-495.

Zhou, M. L. ; Bai, D. Q. ; Tang, Y. ; Zhu, X. M. And Shao, J. R. (2012). "Genetic Diversity Of Four New Species Related To Southwestern Sichuan Buckwheats As Revealed By Karyotype, ISSR And Allozyme Characterization." *Plant Systematics And Evolution* **298**(4): 751-759.

Ziegenhagen, B. And Fladung, M. (2005). "DNA Markers For Identification And Evaluation Of Genetic Resources In Forest Trees: Case Studies In *Abies*, *Picea* And *Populus*. In. *Molecular Marker Systems In Plant Breeding And Crop Improvement.*" *Biotechnology In Agriculture And Forestry* **55**: 478p.

Annexe 1

Asian Journal of Plant Sciences 10 (1): 43-51, 2011
ISSN 1682-3974 / DOI: 10.3923/ajps.2011.43.51
© 2011 Asian Network for Scientific Information

Genetic Variability of Wild Provenances of *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* (Savi) Brenan in South of Morocco

^{1,2}Fatima El Ayadi, ¹Naima Ait Aabd, ¹Aissam El Finti, ¹Fouad Msanda,

²Fouzia Baniaameur and ¹Abdelhamid El Mousadik

¹Laboratory Biotechnology and Valorization of Natural Resources,

Faculty of Science, B.P. 8106, Agadir, Morocco

²Laboratory Research on Genetics Variability, Bioinformatics and Mathematics of the Living,

Faculty of Science, B.P. 8106, Agadir, Morocco

Abstract: In this study, variability in eight pod traits of 300 genotypes (mother-tree) of *A. tortilis* ssp. *raddiana* (Savi) Brenan collected from southern regions of Morocco was assessed. In the analysis of variance, we found that *Acacia raddiana* have significant differences in all traits due to genotype within provenances, but only in pod length, seed weight per pod, seed number per pod, infected seed number per pod and 100-seed weight due to provenances. In general phenotypic coefficient of variation was higher than the genotypic coefficient of variation, indicating the predominant role of environment. High heritability and genotypic gain were recorded for 100-seed weight (92.75 and 17.20%), empty pod weight (53.68 and 21.18%) and pod weight (46.45 and 16.13%), respectively, indicating the additive gene action. Seed weight had positive correlation with seed length, pod weight, seed weight per pod and empty pod weight. On the basis of the Principal Component Analysis (PCA) and the hierarchical cluster analysis, respectively, tow clusters were obtained with highest number of provenances falling under cluster I. The first cluster is composed of the provenances: Agdz, N'koub, Tazarine, Mceissi, Tata and Tissint, the second cluster presented by the provenances: Foum Zguid, Gluemim, Mseid and Assa. Among the clusters formed cluster I presents the best means for the majority of traits studied.

Key words: South of Morocco, *Acacia raddiana*, biometry, morphological diversity, Pods, variation

INTRODUCTION

Acacia is the second largest genus in the family Leguminosae with about 1350 species (Maslin, 2003; Maslin *et al.*, 2003). The current classification of *Acacia* differentiates three subgenera (Ross, 1979; Maslin *et al.*, 2003): *Acacia*, *Heterophyllum* and *Aculeiferum*. *Acacia raddiana* belongs to the *acacia* subgenus. The base chromosome number in the genus *Acacia* is $x = 13$ with polyploidy occurring in several species, (Bukhari, 1997; Blakesley *et al.*, 2002; Khatoon and Ali, 2006). In the south of Morocco who is the most arid region, larger part of the area is an absolute desert with almost no vegetation and one can easily travel for large area without coming across a single plant. In contrast to this harshness, a great number of prehistoric agreement remains provide evidence for rich environmental resources in the past. Many studies of pollen and wood fossils concluded that the vegetation of the coastal strip should be very close to the current while inside grew a steppe of *Acacia raddiana* (Barathon and Riser, 1999). *Acacia tortilis* (Forssk.)

Hayan, member of the flora xero-tropical Africa, was spread abundantly in all African countries, extends eastward to the Arabian Peninsula and Southwest Asia (Al-Mefarrij and Elkhalifa, 2006) during the early and middle Paleocene which may have coincided with a savanna-like environment (Maley, 1980). Based on current information, we admit that this taxon is present in the saharian and sub saharian African countries and in the Middle East (Le Floc'h and Grouzis, 2003). With desertification and ecosystem degradation problems in mediterranean regions (Romdhane *et al.*, 2006) *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. *raddiana* (Savi) Brenan (Family Fabaceae; subfamily Mimosoideae) (Brenan, 1957) remains one of the only wild *Acacia*, which grow spontaneously in arid and Saharian areas which makes it an important reforestation species. It is characterized by a large ecological plasticity, colonizing regions receiving between 50 and 1,000 mm of annual precipitation (El Ferchichiet *et al.*, 2009). It plays an important role for fertility of poor and eroded soils, this is proved by studies on the effect of *Acacia* trees on their physical, chemical,

Corresponding Author: Abdelhamid El Mousadik, Laboratory of Valuation of Biotechnology and Natural Resources,
Faculty of Science, B.P. 8106, Agadir, Morocco

and biological environments in different ecosystems (Hagos and Smit, 2005; Abule *et al.*, 2005; Burke, 2006), the positive influence of *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in terms of soil enrichment in arid ecosystems is conformed especially for to soil organic matter, total N, P and Ca²⁺ (Abdallah *et al.*, 2008). Also, the study on the relationships between the morphological and the environmental variables of *Acacia tortilis*, showed that the last one contribute to the expression of morphological variable expressed by the species (Abdelrahman and Krzywinski, 2008). The savanna of *Acacia raddiana* is under two constraints: tree mortality (Ward and Rohner, 1997; Shrestha *et al.*, 2003) and infestation of seeds. The degree of seed parasitism varied strongly between trees and years (Derbel *et al.*, 2007). In Morocco the species of *A. tortilis* sp. *tortilis* (Forsk.) is represented by subspecies, Illyne, *A. tortilis* ssp. *raddiana* (Savi) Brenan (Mhirit and Blerot, 1999). Regeneration of the trees is made difficult owing to overgrazing, which adds its limiting effects to those of aridity (Bijaber and Ahlafi, 2005) and infestation rate. In this context, the preservation and sustainable management of genetic resources of this millennium species is proved necessary for maintaining the biodiversity of its ecosystem. Morphological variation in seed and pod traits among the natural populations of species is useful in selection programmes for genetic improvement (Bahadur and Hooda, 1995). The morphological variability signifies the adaptation of the species to the environment and it may be genetically determined or environmentally induced (Chiveu *et al.*, 2009).

Limited work has been done on *Acacia raddiana* in south of Morocco, with absolutely no research on its genetic variability basis on morpho-metric traits, however, the variation, if present, have practical implications because reforestation programs collect seed from provenances where genotype presents good quality of traits. In the present study, we have evaluated the relative magnitude of variation in pod traits within and among provenances of *A. tortilis* ssp. *raddiana* (Savi) Brenan in south of Morocco and estimate the genetic parameters under different ecological conditions.

MATERIALS AND METHODS

Presentation of plant material and site of study: Genotypes samples were collected from ten isolated natural provenances Agdz, N'koub, Tazarine, Mceissi, Tata, Tissint, Fourn Zguid, Guelmim, Mseid and Assa (Fig. 1), which were chosen to represent a range of different geographical locations between latitude 28°02' N

Table 1: Description of pod collection sites

Province	Provenance	Altitude (m)	Latitude	Longitude
Zagora	Agdz (1)	834	30°45' N	5°30' W
	N'koub (2)	960	30°50' N	5°44' W
	Tazarine (3)	1100	30°42' N	6°31' W
Errachidia	Fourn Zguid (4)	743	30°13' N	6°51' W
	Mceissi (5)	820	31°13' N	4°48' W
Tata	Tissint (6)	676	29°51' N	7°30' W
	Tata (7)	630	29°43' N	7°57' W
Guelmim	Guelmim (8)	527	28°48' N	9°27' W
Tan Tan	Mseid (9)	249	28°02' N	10°50' W
Assa-Zag	Assa (10)	385	28°42' N	9°14' W

to 31°13' N and longitude between 4°48' W to 10°50' W in south of Morocco (Table 1).

Three hundred trees were identified based on the eight morpho-metric traits of mature pods collected during June 2009, from different sites: pod length (LP) (cm), pod width (WP) (mm), pod weight (WtP) (g), seed weight per pod (WtS/P) (g), empty pod weight (WtEpP) (g), seed number per pod (SN/P), Infected seed number per pod (InSN/P) and 100-seed weight (100-Wt) (g). Each provenance consisted of ten genotypes (mother-tree) and thirty pods per tree with three replications to provide genetic variation.

Seed is considered infected if there is a visibly open hole, still closed, or when it is dark (Fig. 2).

Statistics analysis: A general linear model (ANOVA) analysis was used to determine the effect of site and genotype on all morpho-metric traits. Provenance effects were considered fixed because they were not randomly chosen. Genotypes (mother-trees) were treated as random effects. Factor mother-tree was hierarchical to the factor provenance because the genotypes were not repeated between sites. Data were not transformed, even little of variables had a non-normal distribution. Analysis of variance is relatively robust against departures from normality, of greater concern is heterogenous variance among experimental groups (Glass *et al.*, 1972). All statistical analyses were performed with Statistical V.6.

Analysis of variance was carried out on data following hierarchical model (Nanson, 1970) (Eq. 1):

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + G_{ij} + \varepsilon_{ik} \quad (1)$$

where, Y_{ijk} , μ , P_i , G_{ij} and ε_{ik} represent, respectively, the observed value for an individual, the provenance mean, the effect of provenance, genotype in provenance and the experimental error. The factors P (provenance) and G (genotype) were defined successively fixed and random effect.

Differences between mean values were compared using the Duncan multiple range test (5%).

Table 2: Descriptive statistics of characters measured in 100 genotypes within 10 provenances of *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. *raddiana* (Savi) Brenan [mean character values, degree of freedom (Df), standard deviation (SD), coefficients of variation (%), R² (% intensity effect and the associated F for the significance of the differences)]

Variables	Mean	Provenances				Genotype/Provenance					
		Df	(SD)	CV %	F	R ²	Df	(SD)	CV %	F	R ²
Pod length	13.16	9	3.54	26.88	3.27**	24.64	90	3.54	26.88	22.37***	75.36
Pod width	7.47	9	0.91	12.17	0.47ns	4.54	90	0.91	12.17	62.38***	95.46
Pod weight	1.11	9	0.39	34.70	1.08*	9.77	90	0.39	34.70	27.02***	90.23
Seed weight/pod	0.47	9	0.18	37.91	2.31*	18.77	90	0.18	37.91	18.58***	81.23
Empty pod weight	0.65	9	0.25	39.12	0.75*	7.01	90	0.25	39.12	35.76***	92.99
Seed number/pod	7.68	9	2.14	27.87	3.98***	28.50	90	2.14	27.87	8.58***	71.50
Infected seed number/pod	3.71	9	3.23	87.16	31.68***	76.01	90	3.23	87.16	12.45***	23.99
100-seed weight	6.44	9	1.18	18.39	0.90ns	8.30	90	1.18	18.39	385.06***	91.70

***Significant at $\alpha = 0.001$; **Significant at $\alpha = 0.01$; *Significant at $\alpha = 0.05$; ns: Non-significant.

Table 3: Mean Performance of 10 provenances of *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. *raddiana* (Savi) Brenan for different traits

Variables	Agdz	N'koub	Tazarine	F.Zguid	Mecissi	Tissint	Tata	Gluemim	Mseid	Assa
Pod length	13.07d	13.80bc	13.91bc	11.92d	12.16d	15.68a	14.52ab	12.18d	11.91d	12.42d
Pod width	7.49a	7.35a	7.32a	7.77a	7.68a	7.38a	7.53a	7.27a	7.31a	7.51a
Pod weight	1.01b	1.23a	1.20a	0.97c	1.13ab	1.22a	1.14ab	1.06b	1.05b	1.06b
Seed weight/pod	0.46ab	0.53a	0.51a	0.37c	0.51a	0.50ab	0.49ab	0.41b	0.42b	0.43b
Empty pod weight	0.54c	0.69a	0.68a	0.59ab	0.61ab	0.71a	0.64a	0.64a	0.66a	0.63a
Seed number/pod	7.07cd	8.41a	8.01ab	6.41d	7.99ab	8.43a	7.64abc	7.30abc	7.96ab	7.52abc
Infected seed number/pod	0.37a	0.56a	1.11a	4.15bc	3.61b	6.67d	5.25c	4.56bc	4.09bc	6.70d
100-seed weight	6.93a	6.55a	6.69a	6.23a	6.75a	6.27a	6.66a	6.15a	5.76a	6.38a

Table 4: Spearman correlation among different morph-metrics traits of *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. *raddiana* (Savi) Brenan

	LP (cm)	WP (mm)	WtP (g)	WtS/P (g)	WtEpP (g)	SN/P	InSN/P
WP (mm)	0.155***						
WtP (g)	0.724***	0.175***					
WtS/P (g)	0.613***	0.381***	0.853***				
WtEpP (g)	0.677***	0.159***	0.930***	0.602***			
SN/P	0.668***	0.050	0.699***	0.707***	0.572***		
InSN/P	0.241***	0.010	0.145***	0.010	0.215***	0.278	
Wt100 _{inf} (g)	0.197***	0.471***	0.395***	0.504***	0.251***	0.049	-0.150

***Significant at $\alpha = 0.001$. LP: Pod length; WP: Pod width; WtP: Pod weight; WtS/P: Seeds weight per pod WtEpP: Empty pod weight; SN/P: Seed number per pod; InSN/P: Infected seed number per pod Wt100: 100-seed weight

classification is realized on the number of axes considered attractive in the analysis of PCA.

RESULTS

Analysis of variance: For provenance and genotype, the morphological traits analyzed showed coefficients of variation (CV) ranging from 87.06% for infected seed number per pod to 12.18% for pod width (Table 2).

Effect of individual genotype within provenance was significant for all traits (Table 2) $\alpha = 0.0001$, but provenance was significant only for pod length, pod weight, seed weight/pod, empty pod weight, seed number per pod and infected seed number per pod. Comparison of performance means (Table 3) reveals that the provenances Tissint, Tazarine and N'Koub showed the highest values for genotype traits. Except for infected seed number per pod, the highest mean values were noted within the provenance Tissint (6.67) and Assa (6.70), against provenances Agdz, N'Koub and Tazarine which show low means successively 0.37, 0.56 and 1.11.

Seed weight had positive correlation with seed length, pod weight, seed weight per pod and empty pod

weight. Weight of pods had a positive and high correlation with weight of empty pod ($r = 0.92$). At additionally, positive and significant correlation with weight of seed per pods was shown $r = 0.84$ and length of pods $r = 0.74$ (Table 4).

Comparison of seed infestation among provenances (Table 3), shows that the site of Agdz, N'Koub and Tazarine have the lowest average (0.37, 0.56 and 1.11), while the highly average is noted for the provenance Assa 6.70 followed by Tissint 6.67. Infestations are caused mainly by *Bruchidius* sp. (Fig. 3a) and other insects (Fig. 3b, c).

Provenances classification: Hierarchical cluster analysis leads to identify two major clusters. There are six provenances: Agdz, N'Koub, Tazarine, Mecissi, Tata and Tissint in the first cluster, Foum Zguid, Gluemim, Mseid, and Assa are in the second cluster.

Genetic parameters: Genotypic and phenotypic variation, heritability and genetic gain: Variances of components for diverse traits are presented in Table 5. The magnitude of Phenotypic Coefficient of Variability

Fig. 3: (a-c) Insects infecting the seed of *Acacia tortillis* subsp. *Raddiana*Table 5: Estimation of genetic variables for pods traits in *Acacia tortillis* (Forsk.) Hayne ssp. *raddiana* (Sav) Brenan

Variables	Variance		Coefficient of variance (%)			
	Genotypic	Phenotypic	Genotypic	Phenotypic	Heritability (%)	Genotypic advance (%)
Pod length	4.80	11.54	16.65	25.81	41.61	10.74
Pod width	0.58	0.86	10.18	12.42	67.17	8.34
Pod weight	0.07	0.15	23.66	34.71	46.45	16.13
Seed weight/pod	0.01	0.03	22.57	37.13	36.96	13.72
Empty pod weight	0.03	0.06	28.91	39.47	53.68	21.18
Seed number/pod	0.87	4.32	12.17	27.07	20.19	5.47
Infected seed number/pod	1.58	5.72	33.89	64.48	27.63	17.81
100-seed weight	1.32	1.43	17.86	18.55	92.75	17.20

(PCV) was higher than the corresponding Genotypic Coefficient of Variability (GCV) for all characters. Infected seed number registered highest GCV (33.89%) and PCV (64.48%) followed by empty pod weight GCV (28.91%) and PCV (39.47%). Heritability estimates in broad sense were higher (92.75%) for 100-seed weight pod width (67.17%) and empty pod weight (53.68%). The genotypic advance as per cent of mean was ranged from 5.47% for seed number per pod to 21.18% for empty pod weight.

DISCUSSION

To manage genotype and environment interactions, the best genotype was selected for specific provenance to maximize deployment gains. This would involve identifying different provenances representing homogenous environmental zones within which selections are deployed and used in further breeding. The study of pod morpho-metrics traits of the natural populations is often considered to be useful step in the study of the genetic variability (Kaushik *et al.*, 2007). The proportion of pod walls is considered as a potential selection criterion for seed (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2000).

Variation, provenance performance and classification:
Large significant ($\alpha = 0.0001$) variation recorded for pod

trait due to genotype within provenances in all traits was observed, with variation significant only for pod length, seed weight per pod, seed number per pod and infected seed number per pod among provenances. This result is consistent with the results of isozyme analysis of Senegalese stand and other African distributions, where Nei's genetic diversity is estimated at H_e in the range from 0.42 to 0.49 with a low differentiation between populations (Borgel *et al.*, 2003) and those of the RAPD markers executed on populations of *Acacia raddiana* in the Negev desert (Shrestha *et al.*, 2002), however, contradict El Ferchichi *et al.* (2009), which looking an analysis diversity on four Tunisian populations of *Acacia raddiana* basis on there morphological characters concluded to high levels of variation of *Acacia raddiana* among provenances for the traits pod width, seed weight and seed number. According to these data, *Acacia raddiana* follow the model of *Argania spinosa* defined as generalist species (Bani-Aameur and Ferradous, 2001). The maintenance of this genetic diversity is partly explained by the polyploidy of these species. Variation was greatest for empty pods, weight seed per pod and number of seed infected per pod, which could be important criteria in selecting and classifying seed provenance.

Provenances Agdz, N'koub, Tazarine, Mceissi, Tata and Tissint, present the best means for the majority of

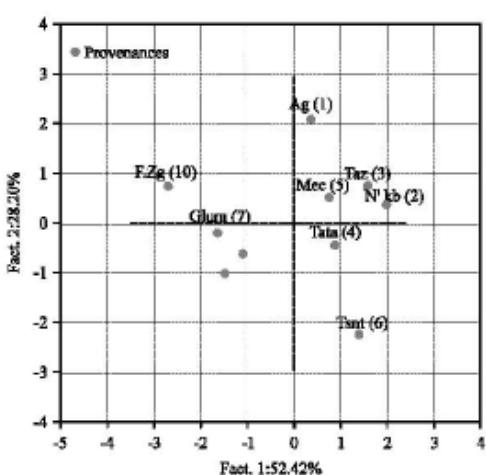


Fig. 4: Principal component analysis of ten *Acacia raddiana* provenances sampled

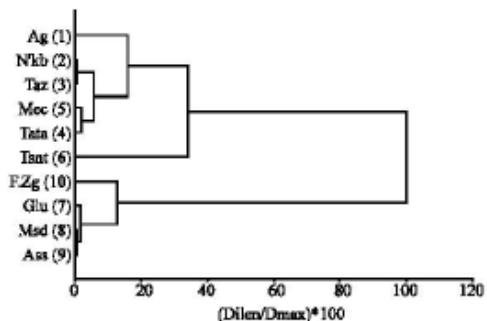


Fig. 5: Dendrogram (hierarchical clustering) of ten provenances of *Acacia raddiana* based on morpho-metrics traits

traits studied, which is strengthened with the results of principal component analysis (Fig. 4) and clearly in the dendrogram (hierarchical clustering) (Fig. 5) of the ten provenances. These sites are located in high altitude with low rainfall offset by the rivers and high temperatures during the summer season, unlike the provenance F. Zguid, where sampling is done on bare soil "Reg" or sand, pods was characterized with small and low seeds filling seed weight = 0.37 g. In Tunisia the best traits were determined in a population characterized by low rainfall and high temperatures (El Ferchichi *et al.*, 2009).

Variation of traits in *Acacia raddiana* pods could be due to the fact that the species grow over a wide range of

rainfall, temperature and soil type. Membrives *et al.* (2003) reported that some morphological characteristics evolve associated with soil texture. Radklad (2007) noticed that in Sudan, Clay plain provenances showed considerable variation in seed weight and seed number of pods of *Acacia senegal*. They had the smallest seed weight but the highest seed number, while the sand provenances had the largest seed weight but lowest seed number. Conversely, *Acacia raddiana* presents significant infestation rate. Seed infestation varied strongly between years for each tree and between trees for each year. Much of infestation already occurs on tree (Wiegand *et al.*, 2000), from the beginning of pods formation (Derbel *et al.*, 2007), where a majority of produced seeds were infested. Thus, the seeds have little chance of germinating; this follows the loss of natural regeneration of *Acacia raddiana*.

Genetic parameters: Genotypic variation is useful when selecting genotypes to improve particular traits (Okono, 2002). Large difference between phenotypic and genotypic coefficient of variation is noted in all traits except for pod width and 100-seed weight, revealed the influence of environment. Best values of heritability were noted for 100-seed weight (92.75%), pod width (67.17%), and empty pod weight (53.68%). The height value of heritability noted for pod width, and weight of empty pod reflected the predominance of heritable variation for this trait. High heritability does not necessarily mean high genetic gain. The utility of heritability estimates is, therefore, increased when they are used to estimate genetic advance (Johnson *et al.*, 1955), which indicates the degree of gain in a character obtained under a particular selection pressure.

Low heritability for weight, seed number and infected seed number per pod can be explained by the loss of weight and seed by abortion and hard infestation of seed. Heritability is important in tree breeding as it provides an index of the relative role of heredity and environment in the expression of various traits (Nanson, 1970). Johnson *et al.* (1955) found that heritability value along with estimates of genotypic gain were more useful than heritability alone in predicting the effect of selection. High heritability estimates associated with high genotypic conventional gain were obtained for the traits: 100-seed weight (92.75 and 17.20%), empty pod weight (53.68 and 21.18%) and pod weight (46.45 and 16.13%).

Genotypic and phenotypic correlation coefficients (Table 6) between traits revealed a positive and high correlation with all traits, except for infected seed number. Correlation coefficient at phenotypic level was higher than correlation coefficients at genotypic level for

Table 6: Genotypic (G) and phenotypic (P) correlation of coefficients among pod traits of *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. *raddiana* (Savi) Brenan. $\alpha=0.001$

Traits	Type	L.P (cm)	WP (mm)	WtP (g)	WtS/P (g)	WtEpP (g)	S/N/P	InS/N/P
L.P (cm)	G	0.191***	0.605***	0.505***	0.567***	0.578***	0.247***	0.247***
	P	0.178***	0.713***	0.596***	0.675***	0.676***	0.325***	0.174***
WP (mm)	G		0.640***	0.525***	0.606***	0.121***	-0.039	0.543***
	P		0.488***	0.397***	0.469***	0.078***	-0.011	0.445***
WtP (g)	G			0.776***	0.879***	0.583***	0.129***	0.551***
	P			0.835***	0.901***	0.678***	0.218***	0.384***
WtS/P (g)	G				0.415***	0.213***	0.072***	0.910***
	P				0.597***	0.697***	0.108***	0.464***
WtEpP (g)	G					0.280***	0.251***	0.942***
	P					0.553***	0.258***	0.267***
S/N/P	G						0.177***	0.696***
	P						0.103***	0.050
InS/N/P	G							-0.156
	P							-0.075

***Significant at $\alpha=0.001$. L.P: Pod length; WP: Pod width; WtP: Pod weight; WtS/P: Seeds weight per pod WtEpP: Empty pod weight; S/N/P: Seed number per pod; InS/N/P: Infected seed number per pod Wt100: 100-seed weight

different traits under study excluding pod width, where there was a slight increase of genotypic correlation coefficients. This clearly reflects genotypic influence for pod width and environmental influence for all the remaining traits.

CONCLUSION

Genetic diversity analysis based on morpho-metric traits of *Acacia raddiana* provenances in Morocco provides basic information for tree improvement and conservation programs. This research can help to identify the better genotypes of *Acacia raddiana* what may be used for further improvement of Acacia. Present study on provenances showed that all morpho-metric characters are influenced by environment (soil quality, temperature and annual rainfall) and genetic factors. We have observed significant variations within provenances in all traits and only in six traits among provenance. The hyper-variability of molecular markers constitutes great advantages for these types of studies. Further research including available ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) and microsatellites marker would hopefully provide additional information. Possibility of *Acacia senegal* (L.) Willd SSR (Assoumane *et al.*, 2009) transferability to *Acacia raddiana* constitutes a strategic tool for this species for which SSRs have not been developed yet. On the other hand, given this possibility, an additional value well be obtaining because of the importance of having common markers between species to be used as bridge markers in genetic mapping (Azpilicueta *et al.*, 2004).

REFERENCES

- Abdallah, F., Z. Noumi, B. Touzard, A.O. Belgacem, M. Neffati and M. Chaieb, 2008. The influence of *Acacia tortilis* (Forsk.) subsp. *raddiana* (Savi) and livestock grazing on grass species composition, yield and soil nutrients in arid environments of South Tunisia. Flora, 203: 116-125.
- Abdelrahman, H.F. and K. Krzywinski, 2008. Environmental effects on morphology of *Acacia tortilis* group in the Red Sea Hills, North-Eastern Sudan and South-Eastern Egypt. For. Ecol. Manage., 255: 254-263.
- Abule, E., G.N. Smit and H.A. Snyman, 2005. The influence of woody plants and livestock grazing on grass species composition, yield and soil nutrients in the Middle Awash Valley of Ethiopia. J. Arid Environ., 60: 343-358.
- Al-Mefarrij, H.A. and K.F. Elkhalifa, 2006. One-year field performance of some *Acacia* and *Prosopis* species in Saudi Arabia. Asian J. Plant Sci., 5: 763-766.
- Assoumane, A.A., A. Vaillant, A.Z. Mayaki and D. Verhaegen, 2009. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Acacia senegal* (L.) Willd., a multipurpose arid and semi-arid tree. Mol. Ecol. Resour., 9: 1380-1383.
- Azpilicueta, M.M., H. Caron, C. Bodenes and L.A. Gallo, 2004. SSR markers for analysing South American Nothofagus species. Silvae Genet., 53: 240-243.
- Bahadur, R. and M.S. Hooda, 1995. Genetic variability and correlation studies for some pod and seed traits in khejri (*Prosopis cineraria* (L.) Druce). Indian J. For., 18: 161-164.
- Bani-Lameur, F. and A. Ferradous, 2001. Fruit and stone variability in three argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) populations. For. Genet., 8: 39-45.
- Barathon, J.J. and J. Riser, 1999. Tarfaya basin (Atlantic Morocco, ~28°N). Paleoenvironment, Paleoanthropology, Prehistoric Landforms Processus Environ., 5: 285-286.
- Baye, T. and H.C. Becker, 2005. Genetic variability and interrelationship of traits in the industrial oil crop *Vernonia galamensis*. Euphytica, 142: 119-129.
- Bijaber, N. and Z. Ahlafi, 2005. Projet FORMA: Detailed design formapping changes as part of national forest inventory. Geo Observateur No. 14. <http://www.crts.gov.ma/Foret/etudesdetailleforet.pdf>.

- Blakesley, D., A. Allen, T.K. Pellny and A.V. Roberts, 2002. Natural and induced polyploidy in *Acacia dealbata* link and *Acacia mangium* Willd. Ann. Bot., 90: 391-398.
- Borgel, A., C. Cardoso, D. Sane and M.H. Chevallier, 2003. Acacia Raddiana Genetics Book: Tree of Desert Acacia Raddiana. IRD Edn., IRD Publication, Paris, ISBN: 2-7099-1522-7, pp: 59-75.
- Brenan, J.P.M., 1957. Notes on mimosoideae: III. Kew Bull., 12: 75-96.
- Bukhari, Y.M., 1997. Cytoevolution of taxa in Acacia and Prosopis (Mimosaceae). Aust. J. Bot., 45: 879-891.
- Burke, A., 2006. Savanna trees in Namibia: Factors controlling their distribution at the arid end of the spectrum. Flora, 201: 189-201.
- Chiveu, C.J., O.G. Dangasuk, M.B. Omunyin and F.N. Wachira, 2009. Quantitative variation among Kenyan populations of *Acacia senegal* (L.) Willd. for gum production, seed and growth traits. New For., 38: 1-14.
- Derbel, S., Z. Noumi, K.W. Anton and M. Chaieb, 2007. Life cycle of the coleopter *Bruchidius raddiana* and the seed predation of the *Acacia tortilis* subsp. *Raddiana* in Tunisia. C.R. Biol., 330: 49-54.
- Diaz, R., R. Zas and J. Fernandez-Lopez, 2007. Genetic variation of *Prunus avium* in susceptibility to cherry leaf spot (*Blumeriella jaapii*) in spatially heterogeneous infected seed orchards. Ann. For. Sci., 64: 21-30.
- El-Ferchichi Guarda, H., D.J. Walker, M.L. Khouja and E. Correal, 2009. Diversity analysis of *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. *raddiana* (Savi) Brenan (Mimosaceae) using phenotypic traits, chromosome counting and DNA content approaches. Genet. Resour. Crop Evolut., 56: 1001-1010.
- Glass, G.V., P.D. Peckham and J.R. Sanders, 1972. Consequences of failure to meet assumptions underlying the fixed effects analyses of variance and covariance. Rev. Educ. Res., 42: 237-288.
- Hagos, M.G. and G.N. Smit, 2005. Soil enrichment by *Acacia mellifera* subsp. *detinens* on nutrient poor sandy soil in a semi-arid Southern Africa Savanna. J. Arid Environ., 61: 47-59.
- Jacques, D., M. Marchal and Y. Cumel, 2004. Relative efficiency of alternative methods to evaluate wood stiffness in the frame of hybrid larch (*Larix × eurolepis* Henry) clonal selection. Ann. For. Sci., 61: 35-43.
- Johnson, H.W., H.F. Robinson and R.E. Comstock, 1955. Estimates of genetic and environmental variability in soybean. Agron. J., 47: 314-318.
- Kaushik, K., S. Kumar, K. Kumar, R.S. Beniwal, N. Kaushik and S. Roy, 2007. Genetic variability and association studies in pod and seed traits of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre in Haryana, India. Genet. Resour. Crop Evol., 54: 1827-1832.
- Khatoon, S. and S.I. Ali, 2006. Chromosome numbers and polyploidy in the Legumes of Pakistan. Pak. J. Bot., 38: 935-945.
- Lagunes-Espinoza, L.C., C. Huyghe and J. Papineau, 2000. Genetic variation for pod wall proportion in *Lupinus albus*. Plant breed., 119: 421-425.
- Le Floc'h, E. and M. Grouzis, 2003. *Acacia raddiana*, A Multipurpose Tree of Arid Regions. Book: Tree of Desert *Acacia raddiana*. IRD Publication, Paris, ISBN : 2-7099-1522-7, pp: 21-58.
- Maley, 1980. Climate change from the late Tertiary in Africa: Their impact on the appearance of the Sahara and its vegetation. USTL, Montpellier, France, ORSTOM Holdings. No. 29105. <http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/29105.pdf>.
- Maslin, B.R., 2003. Proposed name changes in acacia. Australian Plants. <http://asgap.org.au/APOL29/mar03-2.html>.
- Maslin, B.R., J.T. Miller and D.S. Seigler, 2003. Overview of the generic status of Acacia (Leguminosae: Mimosoideae). Aust. Systematic Bot., 16: 1-18.
- Membrives, N., J. Pedrola-Monfort and J. Caujape-Castells, 2003. Correlations between morphological-anatomical leaf characteristics and environmental traits in Southwest African species of *Andricymbium* (Colchicaceae). Bot. Macaronesica, 24: 73-85.
- Mhirrit, O. and P. Blerot, 1999. The Great Book of the Moroccan Forest (Le Grand Livre De La Forêt Marocaine). Editions Mardaga, France, ISBN: 2870096860, pp: 280.
- Nanson, A., 2004. Genetics and Forest Tree Improvement (Genétique et Amélioration des Arbres Forestiers). Presses Agronomiques Gembloux, Belgium, ISBN-10: 2870160704, pp: 712.
- Nanson, A., 1970. Heritability and genetic gain in some types of experiments. Silvae Genet., 19: 113-121.
- Okeno, J.A., 2002. Genotypic variation in morphological traits of barley as affected by nitrogen supply. Dev. Plant Soil Sci., 92: 64-65.
- Raddad, E.Y., 2007. Ecophysiological and genetic variation in seedling traits and in first-year field performance of eight *Acacia senegal* provenances in the Blue Nile, Sudan. N. For., 34: 207-222.
- Romdhane, S.B., H. Nasr, R. Samba-Mbaya, M. Neyra, M.H. Gharbal and P. De Lajudie, 2006. Genetic diversity of *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* rhizobia in Tunisia assessed by 16S and 16S-23S rDNA genes analysis. J. Applied Microbiol., 100: 436-445.

- Ross, J.H., 1979. A conspectus of the African acacia species (Memoirs of the botanical survey of South Africa). Botanical Res. Inst., 44: 155-155.
- Shrestha, M.K., A. Golani-Goldhirsh and D. Ward, 2002. Population genetic structure and the conservation of isolated populations of *Acacia raddiana* in the Negev desert. *Biol. Conservat.*, 108: 119-127.
- Shrestha, M.K., W.D. Stock, D. Ward and A. Golani-Goldhirsh, 2003. Water status of isolated Negev desert populations of *Acacia raddiana* with different mortality levels. *Plant Ecol.*, 168: 297-307.
- Ward, D. and C. Rohner, 1997. Anthropogenic causes of high mortality and low recruitment in three *Acacia* tree species in the Negev desert, Israel. *Biodiversity Conservat.*, 6: 877-893.
- Wiegand, K., F. Jeltsch and D. Ward, 2000. Do spatial effects play a role in the spatial distribution of desert-dwelling *Acacia raddiana*. *J. Vegetat. Sci.*, 11: 473-484.

Annexe 2

International Journal of Plant Breeding and Genetics, 2012
ISSN 1819-3595 / DOI: 10.3923/ijpbg.2012.
© 2012 Academic Journals Inc.

Morphological and Shape Pods Variability of *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* (Savi) Brenan in South of Morocco

^{1,2}Fatima El Ayadi, ¹Fouad Msanda, ²Fouzia Baniaameur and ¹Abdelhamid El Mousadik

¹Laboratory Biotechnology and Valorization of Natural Resources, Faculty of Science, B.P. 8106 Agadir

²Laboratory Research on Genetics Variability, Bioinformatics and Mathematics of the Living, Faculty of Science, B.P. 8106 Agadir

Corresponding Author: Fatima El Ayadi, Laboratory of Valuation of Biotechnology and Natural Resources, Faculty of Science, B.P. 8106 Agadir

ABSTRACT

Acacia raddiana (L.) Willd. is an African leguminous multipurpose tree species belonging to subfamily Mimosoideae, subgenus *Acacia*, highly valued for pods, leaves and gum production. This study estimated the genetic diversity within and among Moroccans populations of the species in the Agdz, N'Koub, Tazarine, Meeissi, Tata, Tissint, Foum Zguid, Gluemim, Msceid and Assa provenances based on 9 quantitative traits which included; Pod Length (LP) (cm), Pod Width (WP) (mm), Pod Weight (WtP) (g), Seed Weight per Pod (WtSP⁻¹) (g), Empty Pod Weight (WtEP) (g), Seed Number per Pod (SNP⁻¹), Infected Seed Number per Pod (INSNP⁻¹) and 100-seed weight (100-Wt) (g) and shapes of pods throughout two seasons. In the both seasons provenances N'Koub, Tazarine and Tissint present the best means for the majority of traits studied, indicating geographical structuring of the genetic variability but it remained much reduced. Analysis of traits in various forms has shown that purely morphological criteria are inadequate for the selection of the *Acacia raddiana* trees which had a range of quantitative characters. The various traits are not regularly correlated with pods quality; they appear strictly in a variety of combinations and relations with environmental conditions. In view of this, any attempt for selection based on morpho-metrics traits of the polymorphic species must fail.

Key words: *Acacia raddiana*, pods, population structure, morphological variability, shapes of pods, selection

INTRODUCTION

The genus *Acacia* (Leguminosae, Mimosoideae) includes over 1350 species (Maslin, 2003). It is distributed in tropical and subtropical regions of the Americas, Australia, Africa and southern Asia (Guinet and Vassal, 1978; Ross, 1981; Luckow, 2005). The current classification of *Acacia* differentiates three subgenera (Ross, 1979): *Acacia*, *Heterophyllum* and *Aculeiferum*. Actually, with the progress of molecular analysis, the analyses of chloroplast genes have been informative in developing a better understanding of phylogenetic relationships of the group. The new data clearly show that the genus as presently defined (i.e., *Acacia* sens. lat.) is not monophyletic. Furthermore, five separate monophyletic groups can be recognised within *Acacia* sens. lat. and it is recommended that these each be recognised as a distinct genus. The five genera (Maslin *et al.*, 2003), *Acacia*,

Senegalia, *Racosperma*, *Acaciella* and a genus yet to be named, comprising species related to *A. coulteri*. Following the decision of the Nomenclature Session of the 17th International Botanical Congress (IBC) (Moore *et al.*, 2010) in Vienna decision the type of *Acacia* changes from the African/Asian species, nomenclaturally, the most significant changes apply to "Acacia" that occur in Africa, Asia and the Americas where less than half will become known as *Vachellia* (corresponding to the former *Acacia* subgenus *Acacia*) (Maslin, 2006). In Morocco, three species of *Acacia* exist in a wild state: *Acacia gummifera*, *Acacia ehrenbergiana* and *Acacia raddiana* (McDonald and Maslin, 2000). The base chromosome number in the genus *Acacia* is $x = 13$ with polyploidy occurring in several species, such as *Acacia nilotica*, *Acacia seyal* and *A. tortilis* (Forsk.) Hayne and *A. raddiana* (Savi) Brenan (Bennett *et al.*, 2000; Bulkari, 1997). Vegetation dominated by *Acacia raddiana* was founded in arid and Saharan areas. It exists in the main channels of the rivers and in rivers terraces with deep sediments where the stones and gravels cover a considerable part of the ground surface. In this very fragile environment, human pressure, altering climatic conditions and the use of wrong technology have provoked a long and dangerous process leading to the manifestation of desert biotopes, even in prior non-desert areas. Increasing populations and socioeconomic changes are responsible for overuse of this environment (Benmohammadi *et al.*, 2000), the destruction of vegetation has been encouraged by drought, especially since 1960. The most dramatic effect is the disappearance of *Acacia raddiana*. Currently, it only exists as a small stand scattered in the beds of rivers (Benmohammadi *et al.*, 2000). The trees of this species are generally very sparse and overused by local people, who have no other fuelwood (Khbayat *et al.*, 1998; Romdhane *et al.*, 2006). When the herbs have disappeared from the areas, local people turn to the foliage of the trees, to make fruits and foliage more accessible they climb trees or even cut the tree down completely. Generally, in the more open conditions created, species have difficulty regenerating because soils become drier and more barren and seedling are subjects to water stress, which lowers their survival rate. One of the most crucial results of cutting tree, deforestation is the increase of opportunity of erosion and landslides which reduce soil fertility and water retention quality (Duponnois and Plenquette, 2003). Combination between desertification and ecosystem degradation problems in Mediterranean regions *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. *raddiana* (Savi) Brenan (Family Fabaceae; subfamily Mimosoideae) (Brenan, 1957), remains one of the only wild *Acacia* which grow spontaneously in arid and Saharan areas which makes it an important reforestation species. It has highly durable seeds, capable of enduring fire and remain viable during medium to long-term storage in the soil. Namely, trees growing at low density in arid and semi-arid pastoral ecosystems have often been found to improve their understory environments, compared to neighboring grasslands, soils under tree crowns (canopies) (Belsky *et al.*, 1993). *Acacia raddiana* it shows remarkable climatic tolerance and ecological adaptability. It is characterized by a large ecological plasticity, colonizing regions receiving between 50 and 1,000 mm of annual precipitation (Ouarda *et al.*, 2009). *Acacia raddiana* forms a natural symbiosis with rhizobium and fix atmospheric nitrogen, it is the best in total N fixed, fixing 1.05 g N plant⁻¹ compared to an average of 0.48 g N plant⁻¹ for the other *Acacia* (Ndoye *et al.*, 1995), it is therefore often survive on land which is low in nitrogen and organic matter where other species fail, these characters allows its to be highly valued for soil fertility and improvement. Similar to other legumes, *Acacia raddiana* plays an significant role for fertility of poor and eroded soils, it form symbiotic associations with soil bacteria to fix atmospheric nitrogen, making them suitable for poor quality soils, this is proved by studies on the effect of *Acacia* trees on their physical, chemical and biological environments in different ecosystems (Belsky *et al.*, 1998; Hagos and Smit, 2005);

Abule *et al.*, 2005; Burke, 2006). The positive influence of *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in terms of soil enrichment in arid ecosystems is confirmed especially for total soil organic matter, total N, P and Ca²⁺. Additionally, *Acacia raddiana* provides a staple browse especially the leaves and pods who serve as feed for sheep goats cattle and camels. Forage is accessible during most of the dry season when other sources are insufficient. Regrettably, populations of *Acacia raddiana* are under two compulsions: tree mortality (Ward and Rohner, 1997; Shrestha *et al.*, 2003) and infestation of seeds. Rate of infestation of the seeds varies greatly between years and trees (Ernst *et al.*, 1989; Derbel *et al.*, 2007). Restoration of stands of *Acacia raddiana* is made difficult due to overgrazing which adds its restrictive effects to those of aridity (Bijaber and Ahlafi, 2005) and infestation rate. Not much effect has been made in Morocco to develop management strategies for plantation and genetic conservation of *Acacia raddiana* despite the fact that it is a source of livelihood for many people in areas where it grows naturally. A coordinated effort to conserve stands of *Acacia raddiana* would be valuable to restore its ecosystems which would lead to effective utilization of the resources to improve productivity and quality of this tree. This would make a contribution to sustainable development in the south of morocco; there is urgent need to conduct genetic diversity assessment of the species throughout its natural habitats in the country. The knowledge of genetic diversity is a prerequisite for development of any strategy for germplasm collection, management and conservation, domestication and improvement of the species genetic resources (Chiveu *et al.*, 2009). Consequently, there is a need for provenance selection to offer indispensable information on the diversity and heritability of important traits (Dangasuk *et al.*, 1997). The morphological variability signifies the adaptation of the species to the environment and it may be genetically determined or environmentally induced. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity among and within the Moroccan provenances of *Acacia raddiana* based on morphological differences in pod traits that are related to the success of species establishment and evaluation of stability of pod forms within provenances.

MATERIALS AND METHODS

A field study was carried out during July 2009 (season 1) and July 2010 (season 2) to study quantitative variation in ten provenances of *A. raddiana* in morocco.

Provenances sampled: Ten isolated natural provenances: Agdz, N'Koub, Tazarine, Mceissi, Tata, Tissint, Foum Zguid, Gloumim, Mscoïd and Assa were collected. They were chosen to represent a range of different geographical locations between latitude 28°02' N to 31°13' N and longitude between 4°48' W to 10°50' W in south of Morocco. Three hundred pods were collected from ten mother trees that were separated from each other by more than 100 m to minimize the risk of sampling closely related individuals.

Location and climate of site under study: Sites under study are situated in one of the driest river basins of the world (Revenga *et al.*, 1998), Drâa valley, where water is a rare and precious resource. The Drâa basin can be roughly divided into three main units, the High Atlas Mountains, the basin of Ouarzazate and the Anti-Atlas (Do Jong *et al.*, 2008). The Drâa river basin is characterized by arid climatic conditions (Hubener *et al.*, 2005). It is dominated by a bimodal distribution of annual precipitation and high rainfall variability (Klose *et al.*, 2008). Precipitation decreases generally from North to South. Annual precipitation north of the Anti-Atlas Mountains is around 200-300 mm. South of the Anti-Atlas annual precipitation rates decline to 100-200 mm

(Schulz *et al.*, 2008), in province of Zagora the average annual rainfall is about 60 mm. Rainfall varies during the year with less rain in the summer months and more rainy days in the winter period. Generally, two precipitation maxima can be distinguished within one year, the first around October to December and the second around February and March. The temperature variations are large and the evaporation rates (2000-3000 mm year⁻¹ on average) regularly exceed rainfall rates.

Quantitative trait measurement in the laboratory: Thirty pods were selected randomly from the one hundred pods collected per tree for measurement of pod length (cm) and width (mm), by use of a vernier caliper and thread. Number of seeds in each pod measured was counted and weighed (g); also, the weight of empty pod was taken (g). Weight of 300 randomly selected seeds per tree for the ten populations was also determined using a weighing balance to the nearest 0.001 g.

Six hundred trees were identified based on the eight morphometric traits of mature pods: pod length (LP) (cm), pod width (WP) (mm), pod weight (WtP) (g), seed weight per pod (WtS P⁻¹) (g), empty pod weight (WtEpP) (g), seed number per pod (SN P⁻¹), Infected seed number per pod (InSN P⁻¹) and 100-seed weight (100-Wt) (g). Each provenance consisted of ten mother-tree and thirty pods per tree with three replications to provide genetic variation.

The observation of pods allows as detecting a high level of morphological polymorphism within provenances. Characteristics of *Acacia* pods varied considerably. It possessed highly coiled pods flat and an uncoiled pod (Lakshmi and Gopakumar, 2009). To be sure, a representative sample of ten pods each of the six provenances studied, illustrates the existence of various shapes of the pods. In this study we did not give importance to the color of the pod since it is generally comparable. In addition, morphological traits related to the shape of the pods were observed. Thus it was determined by six basic shapes: elongated, spiral, wavy, round, arched (Fig. 1). Traditionally, production and fruit quality, including its shape, have been widely exploited as basic criteria for selection in some species such as carob. For experts, these trait help to differentiate the wild-type and Caroubier type cultivar.

Statistical analysis: All statistical analyses were performed with STATISTICA software. Analyses of variance were carried out on data using the GLM procedure. The broad sens heritability (h^2) was assigned for the data of each season according to Nanson (1970) and Jacques *et al.* (2004). The Phenotypic Coefficient of Variance (PCV%) and genotypic coefficient of variance were computed according to (Baye and Becker, 2005; Diaz *et al.*, 2007). Conventional genotypic gain was estimated (Nanson, 2004; Jacques *et al.*, 2004).

The portion of variance attributed to each factor was estimated from expected mean squares in the analysis of variance (Table 1).

Table 1: Expected mean squares for analysis of variance of *Acacia raddiana* pod

Source of variation	Degrees of freedom	Mean squares	Expected mean squares
Season	1	MS _s	$\sigma^2 + 30 \sigma_{s,r-1}^2 + 3000 \sigma_s^2$
Provenance	9	MS _p	$\sigma^2 + 60 \sigma_{p,r-1}^2 + 3000 \sigma_p^2$
Season * Provenance	9	MS _{sp}	$\sigma^2 + 30 \sigma_{s,p-1}^2 + 300 \sigma_{sp}^2$
Tree Provenance ⁻¹	90	MS _{P-1}	$\sigma^2 + 60 \sigma_{p-1}^2$
Season*Tree/ Provenance	90	MS _{s,p-1}	$\sigma^2 + 30 \sigma_{s,p-1}^2$
Season*Tree/ Provenance*	5800	MS _e	σ^2

σ^2 : Error variance, $\sigma_{s,r-1}^2$: Variance of genotype within provenance, σ_p^2 : Variance of provenance, σ_s^2 : Variance of season, *Sampled trees

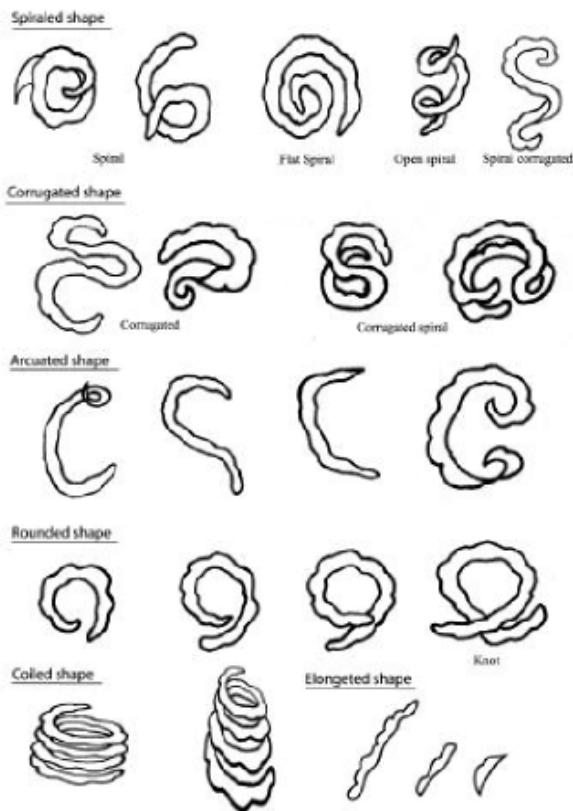


Fig. 1: Typical pod shape of Moroccans *Acacia raddiana*

RESULTS

Descriptive statistics for 9 traits in ten *Acacia raddiana* provenances including the minimum, maximum, mean and their standard deviations for data averaged over the two seasons are summarized in Table 2. In general, all the traits exhibited wide range of variation.

Descriptive statistics of quantitative variables: The mean and coefficient of variation of the various traits observed in the two years of study are presented in Table 2. Large variations appeared for all traits considered, between the provenance and the seasons. Morphological traits of the pod width and weight of 100 seeds were regularly less variable in succession they did not exceed 12 and 20%. The coefficients of variation of number of infected seeds were above 70% for two seasons with values of 87.16 and 73.53% sequentially for the first and the second season, while the width of the pods were lower to 15%. Other morphological traits of the pod studied showed intermediate levels of variability, between 18 and 37%.

Levels of variation are very similar between the two years, the values of means, minimum and maximum show that the conditions of two years were similar, with the exception of the length of

Table 2: Descriptive statistics of characters measured in 100 genotypes within 10 provenances of *Acacia torilis* (Forst.) Hayne esp. *raddiana* (Sav) Drenan

Variables	Season	Mean					Min.					Max.				
(a) The values of means, minimum and maximum																
Pod length	1						13.14					1.36				28.20
	2						13.12					3.60				27.00
Pod width	1						7.40					3.97				11.08
	2						7.33					3.97				11.08
Pod weight	1						1.10					0.14				2.97
	2						1.08					0.25				2.97
Seed weight pod ⁻¹	1						0.44					0.03				1.29
	2						0.42					0.03				1.16
Empty pod weight	1						0.65					0.06				2.26
	2						0.66					0.06				2.04
Seed number pod ⁻¹	1						7.59					1.00				15.00
	2						7.60					1.00				15.00
Infected seed number pod ⁻¹	1						3.78					0.00				13.00
	2						3.85					0.00				13.00
100-seed weight	1						6.56					3.16				11.00
	2						6.68					3.40				11.00
Variables	Mean	df	(SD)	CV %	F	R ²	df	(SD)	CV %	F	R ²	df	(SD)	CV %	F	R ²
(b) Intensity of effects (R²)																
Season 1																
Pod length	18.16	9	3.54	26.88	8.27**	24.64	90	3.54	26.88	22.37***	75.36					
Pod width	7.47	9	0.91	12.17	0.47ns	4.54	90	0.91	12.17	62.38***	95.46					
Pod weight	1.11	9	0.39	31.7	1.08ns	9.77	90	0.39	31.7	27.02***	90.23					
Seed weight Pod ⁻¹	0.47	9	0.18	87.91	2.31ns	18.77	90	0.18	87.91	18.58***	81.28					
Empty pod weight	0.65	9	0.25	39.12	0.75ns	7.01	90	0.25	39.12	35.76***	92.99					
Seed No. Pod ⁻¹	7.68	9	2.14	27.87	8.98***	28.5	90	2.14	27.87	8.58***	71.60					
Infected seed No. Pod ⁻¹	3.71	9	3.23	87.16	31.68***	76.01	90	3.23	87.16	12.45***	23.99					
100-seed weight	6.44	9	1.18	18.39	0.90ns	8.3	90	1.18	18.39	385.06***	91.70					
Season 2																
Pod length	18.12	9	3.44	26.21	8.48***	25.82	90	3.44	26.21	14.05***	74.18					
Pod width	7.33	9	0.94	12.84	1.10ns	9.94	90	0.94	12.84	39.97***	90.06					
Pod weight	1.08	9	0.37	31.18	2.87***	22.32	90	0.37	31.18	16.13***	77.68					
Seed weight Pod ⁻¹	0.42	9	0.16	89.44	2.94***	22.78	90	0.16	89.44	18.94***	77.27					
Empty pod weight	0.65	9	0.25	38.12	3.27***	24.68	90	0.25	38.12	17.49***	75.32					
Seed No. Pod ⁻¹	7.5	9	2.08	27.7	4.90***	82.80	90	2.08	27.7	5.60***	67.11					
Infected seed No. Pod ⁻¹	3.85	9	2.83	73.53	15.46***	60.73	90	2.83	73.53	7.969***	39.27					
100-seed weight	6.68	9	1.36	20.37	2.56ns	20.34	90	1.36	20.37	378.16***	79.66					

*** Significant at $\alpha = 0.001$, ** Significant at $\alpha = 0.01$, * Significant at $\alpha = 0.05$, ns: Non-significant

the pod where the minimum was 1.36 cm in the first season and 3.60 cm in the second (Table 2a). This discard of nearly 50% was not accompanied by significant differences in other morphological characters studied. This means identifying values, maximum and minimum between the two years could be due to the similarity of the conditions of rainfall in the two years.

The interaction of two years showed the same trends of variance that every year presented independently. We demonstrated by the calculation of the index of the intensity of effects (R²) (Table 2b; Fig. 3) that the genotype had exercised more than 30% effect on all of the variance

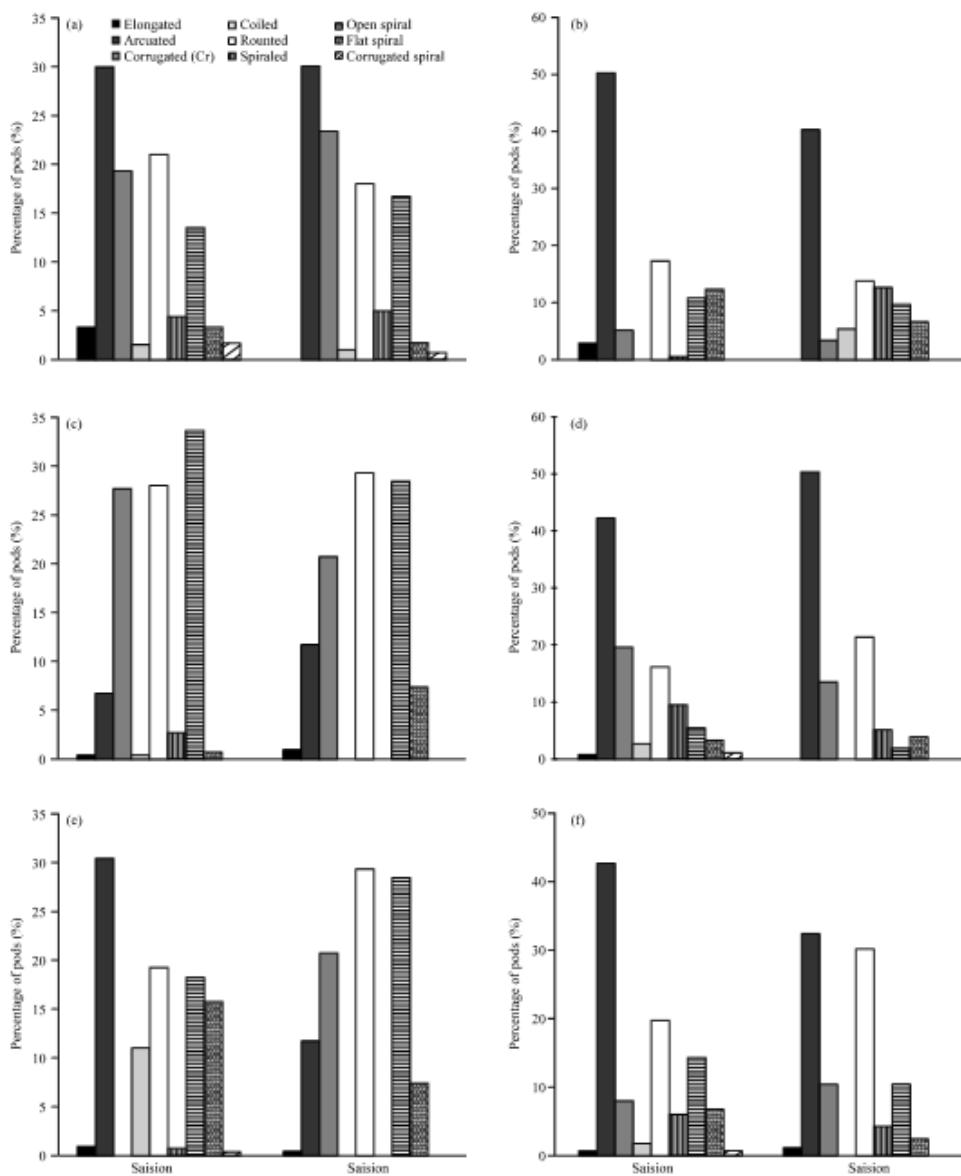


Fig. 2(a-f): Percentage of Pod shapes in provenances, (a) Fom Zguid, (b) Assa, (c) Tissint, (d) Mcéissi, (e) Msceid, (f) Gluemim

observed in the provenance, this intensity increases to over than 40% in its combination with the factor of season for most characters studied. The trait number of seeds infected per pod escapes of this effect; we observed that the effect of the provenance factor on the variance exceeds 39 and

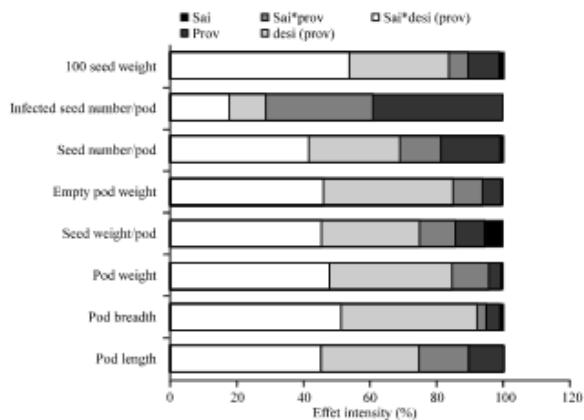


Fig. 3: Effect of factor on variation expression

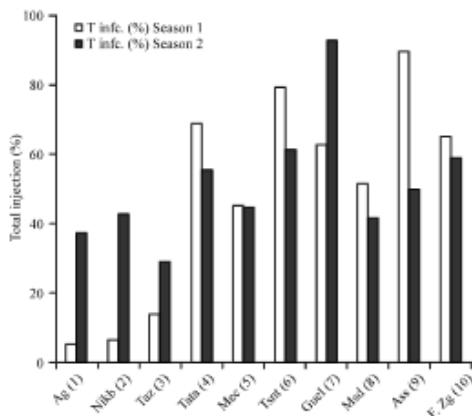


Fig. 4: Infection rate of seeds between the provenances

30% for the effect of the season factor. It should be explained by the rate of infestation of the seeds that varied greatly between genotypes from the same provenance and same genotype between two different years (Fig. 4).

Structure of the phenotypic variation: The relative importance of inter-component provenances, inter and intra-genotype of the phenotypic variance was different depending on the trait in question and showed a similar pattern between the two seasons (Fig. 5).

The variation of morphological traits (LP, WP, WtP, WtS P⁻¹ and WtEpP) was dominated by components: inter and intra-genotype, the rest of their variation was represented by the component inter-provenances (except for WP for which the variation between provenances was almost zero).

The variance in number of infected seed per pods was signed by the inter-provenance and intra-genotype components. The weight of 100 seeds per pod was the trait most strongly marked at the level of genotypes.

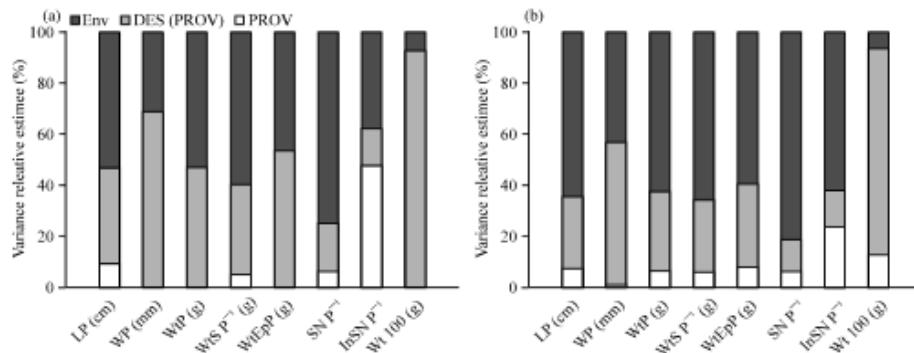


Fig. 5(a-b): Distribution of the phenotypic variance within ten provenances of *Acacia* in (a) season 1 and (b) season 2

The intra-genotype variance (inter-pod) was more important than the other for most traits studied except for the characters WP, InSN P⁻¹ and weight of 100 seeds. It has even become dominant in season 2 for the trait SN P⁻¹, with development of its contribution for the remaining traits. This reflects the importance of intra-genotype variance under the same environmental and microclimatic conditions.

Two groups of traits seem to be distinguished:

- Those closely related to the genotypes (mother tree) (weight of 100 seeds, the width of the pod): they are primarily characteristics of the genotypes themselves
- Those related to the quality of the pod (pod weight, weight of seeds per pod, empty pod weight and number of infected seeds per pod): they were more dependent on the level of the pod and related to the particular conditions of fertilization and infestation that takes place during the phenology, where both phenomena occur with different probabilities within the same genotype. This pattern also seems to relate well illustrated for the number of infected seeds per pod as suggested by the increase in intra-genotype variance in season 2

It is therefore not strictly morpho-metric traits of pods that were related but rather a result of two independent phenomena acting strongly on the quality of the pod.

Inter-provenance variation: Statistically significant differences existed between the ten provenances of *Acacia raddiana* for both seasons (Table 2b). Traits LP, SN P⁻¹ and InSN P⁻¹ were showed significant differences inter provenance and stable between the two years of study: Agdz N'Koub, followed by Tazarine Mecissi, Foum Zguid and Tissint with the most highly means for these traits, except Tissint who presented for the two seasons of high infestation rate compared to other sites.

The characters WtP and WtEpP have changed the status of non-significant difference in the season 1 with a significant difference in season 2, the traits WP and weight of 100 seeds kept a non-significant difference between the provenances consistently for the two years.

Stability of inter-season traits: pod length, number of seeds per pod and seed number of infected pods reflects the relationship between the size of the pod and seed production, despite some

fluctuations in production due to infestations but overall it remains stable within the same provenance. These traits may be characteristics of provenance, but only tests the behavior of genotypes respond to environmental stresses lead to the conclusion marked.

Variation inter-genotype: The *Acacia raddiana* is specie with an allogamy and entomophily reproduction recognized for its polyploidy and our measurements have been performed on non-protected sites, wild, where the maternal effects were strong and was contributed to a significantly inter-genotype variance, hence its importance in relation to the inter-provenance variance. It depended on: the year, the population and the traits considered.

In general, the intra-genotype variability exceeded the inter-genotype for almost all provenances, suggesting that heritability of morphological traits of the pod would be less for most traits involved except 100-seed weight and width of the pod.

For provenance, the variability inter-provenance depended largely on the trait considered, for some it retains the same pattern of variation between the two seasons for other provenances it fluctuates widely, reflecting the contribution of environmental conditions, climate interaction with polyploidy of the specie.

However, two groups of variables can be distinguished:

- LP, WtP, WtS P⁻¹ and WtEpP, WS and InfSN P⁻¹, where the proportion of inter-genotype variance varied considerably between provenances and years. For example Tissint, the proportion for trait LP passes from 70% in season 1 to 18% for year 2 and for the WtEpP 58% in season 1 to 31% in season 2
- The characteristic 100-seed weight generally had an inter-genotype variation greater than 80% and WP exceeded 45%

Estimation of the genetic parameters: To compare the variation among various traits, estimates of variance components (σ^2_p , σ^2_g , σ^2_{gP}), phenotypic (PCV) and Genotypic Coefficient of Variability (GCV), broad sense heritability ($h^2 b$) and Genetic Advance (GA) as a percentage of mean are given in (Table 3). For most traits the genotype-environment interactions (σ^2_{gP}) are larger than the genetic variance (σ^2_g).

In the fist and second season, lowest value of Phenotypic Coefficient of Variability (PCV) was noted for the character pod width, with successively 12.42-12.84% and it decreased to 10.62 in the interaction of the both years. While, highest value was noted for infected seed number per pod with successively 64.48, 65.02, for the first and second season and it decreased to 61.32 in the interaction of the both. For both traits the value decreases in the interaction of two seasons.

The Genotypic Coefficient of Variation (GCV) showed similar trends as (PCV) and ranged between 10.65, 9.18% for pod width and 33.89, 28.23% for infected seed number per pod simultaneously for the first and second seasons. Heritability (h^2) estimates range from 20.19, 13.52% for seed number per pod to 92.75, 92.63% for 100 seed weight. High heritability does not necessarily mean high genetic gain. The utility of heritability estimates is, therefore, increased when they are used to estimate genetic advance (GA) (Johnson *et al.*, 1955) which indicates the degree of gain in a character obtained under a particular selection pressure.

Coefficients of correlation: The coefficients of correlation between traits observed each year are presented in Table 5. Most of the traits related to the size of the pod (pod weight, seed weight of the pod, the weight of empty pod and number of seeds per pod) were positively correlated with the

Table 3: Estimation of genetic parameters for pods traits in *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. *raddiana* (Savi) Brenan

Variables	Season	PCV (%)	GCV (%)	h ² %	GA%	R ^b
Pod length	1	25.81	16.65	41.61	10.74	
	2	25.34	13.95	30.32	7.68	
	1*2	23.22	11.01	22.49	5.22	11.42
Pod width	1	12.42	10.18	67.17	8.04	
	2	12.84	9.66	56.51	7.26	
	1*2	10.62	7.28	47.63	5.06	20.37
Pod weight	1	34.71	23.66	46.45	16.13	
	2	33.24	19.25	33.53	11.16	
	1*2	30.59	15.61	26.15	7.98	14.03
Seed weight pod ⁻¹	1	37.13	22.67	36.96	13.72	
	2	38.42	21.09	30.14	11.58	
	1*2	34.75	16.24	21.84	7.59	10.88
Empty pod weight	1	39.47	28.91	58.08	21.18	
	2	36.79	21.92	35.48	13.05	
	1*2	33.79	18.50	29.98	10.13	16.54
Seed No. pod ⁻¹	1	27.07	12.17	20.10	5.47	
	2	26.96	9.92	13.53	3.65	
	1*2	25.60	7.02	7.51	1.92	5.82
Infected seed No. pod ⁻¹	1	64.48	33.89	27.63	17.81	
	2	65.02	28.23	18.80	12.26	
	1*2	61.32	23.03	14.11	8.66	7.43
100-seed weight	1	18.55	17.86	92.75	17.2	
	2	19.24	18.52	92.63	17.82	
	1*2	14.30	13.36	87.22	12.48	20.82

Table 4: Mean performance for the both season of ten provenances of *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. *raddiana* (Savi) Brenan
(test Duncan $\alpha = 0.001$)

Variables	Agdz	N'Koub	Tazarine	F. Zguid	Mecissi	Tissint	Tata	Gluemim	Mseid	Assa
Season 1										
LNGS (mm)	13.07 ^{ab}	13.80 ^a	13.91 ^{bc}	11.92 ^d	12.16 ^b	15.68 ^a	14.62 ^{ab}	12.18 ^d	11.91 ^d	12.42 ^d
LRGS (mm)	7.49 ^c	7.35 ^a	7.32 ^a	7.77 ^a	7.68 ^a	7.38 ^a	7.53 ^a	7.27 ^a	7.31 ^a	7.51 ^a
PGSp (g)	1.01 ^c	1.23 ^a	1.20 ^a	0.97 ^a	1.13 ^a	1.22 ^a	1.14 ^a	1.06 ^a	1.09 ^a	1.06 ^a
PGR/GS (g)	0.46 ^c	0.53 ^a	0.51 ^a	0.37 ^a	0.51 ^a	0.50 ^a	0.49 ^a	0.41 ^a	0.42 ^a	0.42 ^a
PGS - PGR	0.54 ^c	0.69 ^a	0.68 ^a	0.59 ^a	0.61 ^a	0.71 ^a	0.64 ^a	0.64 ^a	0.66 ^a	0.68 ^a
NGR/GS	7.07 ^{cd}	8.41 ^a	8.01 ^{cd}	6.41 ^d	7.99 ^b	8.43 ^a	7.64 ^{cd}	7.30 ^{cd}	7.96 ^{cd}	7.82 ^{cd}
NGRI/GS	0.37 ^c	0.56 ^a	1.11 ^a	4.15 ^{de}	0.61 ^c	6.67 ^d	5.25 ^e	4.56 ^{de}	4.09 ^{de}	6.70 ^d
P100 Gr	6.93 ^c	6.55 ^a	6.69 ^a	6.23 ^a	6.75 ^a	6.27 ^a	6.66 ^a	6.15 ^a	5.76 ^a	6.38 ^a
Season 2										
LNGS (mm)	13.98 ^{ab}	13.27 ^{abc}	18.47 ^{abc}	13.94 ^{ab}	14.96 ^a	12.88 ^{abc}	13.68 ^{abc}	11.64 ^f	11.55 ^f	11.90 ^b
LRGS (mm)	7.28 ^c	7.44 ^a	7.26 ^a	7.78 ^a	7.15 ^a	7.43 ^a	7.62 ^a	7.23 ^a	6.98 ^a	7.14 ^a
PGSp (g)	1.06 ^{ab}	1.17 ^a	1.09 ^a	1.24 ^a	1.20 ^a	1.00 ^{ab}	1.15 ^{ab}	0.99 ^{ab}	0.99 ^{ab}	0.90 ^a
PGR/GS (g)	0.38 ^c	0.50 ^a	0.45 ^a	0.44 ^a	0.42 ^a	0.34 ^a	0.46 ^a	0.38 ^a	0.38 ^a	0.37 ^a
PGS-PGR	0.67 ^{cd}	0.66 ^{cd}	0.64 ^{cd}	0.79 ^a	0.78 ^a	0.66 ^{cd}	0.68 ^{cd}	0.61 ^{cd}	0.55 ^{cd}	0.55 ^{cd}
NGR/GS	7.52 ^{gh}	7.99 ^a	8.24 ^a	7.08 ^a	7.97 ^a	7.98 ^a	7.59 ^{gh}	6.64 ^{gh}	6.63 ^{gh}	7.33 ^{gh}
NGRI/GS	3.22 ^{gh}	2.98 ^a	2.39 ^a	3.93 ^{gh}	4.88 ^a	7.39 ^a	3.39 ^{gh}	2.75 ^a	3.29 ^{gh}	4.30 ^a
P100 Gr	3.22 ^a	2.98 ^a	2.39 ^a	3.93 ^a	4.88 ^a	7.39 ^a	3.39 ^a	2.75 ^a	3.29 ^a	4.30 ^a

Table 5: Spearman correlation among different morph-metrics traits of *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne sep. *raddiana* (Savi) Brenan

	LP (cm)	WP (mm)	WtP (g)	WtS P ⁻¹ (g)	WtEpP (g)	SN P ⁻¹	InSN P ⁻¹
WP (mm)	0.214***						
WtF (g)	0.766***	0.484***					
WtS P ⁻¹ (g)	0.607***	0.380***	0.894***				
WtRpP (g)	0.730***	0.462***	0.929***	0.593***			
SN P ⁻¹	0.640***	0.022ns	0.649***	0.672***	0.511***		
InSN P ⁻¹	0.240***	0.006ns	0.159***	0.026**	0.220***	0.329***	
Wt100 _{uninf} (g)	0.198***	0.411***	0.385***	0.417***	0.272***	-0.031**	-0.149***

*** Significant at $\alpha = 0.001$; ** Significant at $\alpha = 0.01$; * Significant at $\alpha = 0.05$; ns non-significant

length of the pod. However, it remains independent of the index of the quality of seed production in our study represented by the weight of 100 seeds uninfected. In both seasons, seed production was also positively related to moderately correlated with the width of the pod, weight of the pod and seed weight of the pod with a value of $r = 35$.

The coefficients of correlation were the lowest recorded for the number of infected seed pod which underlines the non-existence of any link between the quality features of the pod and the seeds of infection. Although, the infestation of the pods of *Acacia raddiana* occurs in a very early period of flowering, this does not alter the development of the pod (length, width, weight of the pod) and hence it has no effect on the quality of the pod except for the number of seeds per pod, but it remains very low with an average value of $r = 0.31$.

Shape of pods: In the both seasons and for all the provenances the most abundant shape of pods was, arcuated and round. Maximum of arcuated shape was noted in Tissint and Assa provenances 50.33% and for round shape in Gluemim 30% in the first season and in Tissint 28% in the second season. Tissint make the exception, where we were noted coexistence of the form corrugated, round and spiral corrugated. Complicated shape such as spiral corrugated, corrugated spiral and coiled remained in very low percentages in the both seasons.

Discussion: Many parameters affect growth and health condition of *A. raddiana*. These are physical factors (climate, soils, water balance and topography), biological factors (diseases and pests, especially insect) and traditional constraints (human land use systems). The study of pods morpho-metrics traits of the natural populations is often considered to be useful step in the study of the genetic variability (Kaushik *et al.*, 2007). This would involve identifying different provenances representing homogenous environmental zones within which selections are deployed and used in further breeding. Phenotypic variation is determined by genotype and environment interactions and is assumed to be the expression of genotypic variation when environmental conditions are controlled (Dangasuk *et al.*, 1997; Cony and Trione, 1998; Westoby *et al.*, 2002; Miles and Westoby, 2004).

In this study, pod characteristics in *A. raddiana* indicated variation within and among provenances in which the soil and geographic position was clearly different. The large variance of the population for the characters implied that the selection for these traits can be successful (Alake *et al.*, 2012). Variation of traits in *Acacia raddiana* pods could be due to the fact that the species grow over a wide range of rainfall, temperature and soil type. Membrives *et al.* (2003) reported that some morphological characteristics associated with soil texture. This can be assumed to reflect true genetic variation and adaptation to different edaphic conditions. Raddad (2007)

noticed that in Sudan, clay plain provenances showed considerable variation in seed weight and seed number of pods of *Acacia senegal*. They had the smallest seed weight but the highest seed number, while the sand provenances had the largest seed weight but lowest seed number. The morphological variation found in pods of *Acacia raddiana* (El-Ayadi *et al.*, 2011) also tended to follow this variation, with the altitude, distance from the water source and soil quality. For this, in the both seasons provenances N'Koub, Tazarine and Tissint present the best means for the majority of traits studied (Table 4). Although, the provenance of Msceid is close to the sea, but the quality of the pods was minimal, it was explained by the fact that this source is isolated in the desert, without any protection from strong and hot winds of South and South East of Morocco. Studies have showed good tolerance of the species to salinity, since it is able to germinate in high concentrations of salt (Jaouadi *et al.*, 2010), it was widely grown where drainage was adequate but it does not tolerate poorly drained soils whether they were saline or otherwise.

Variability of a character is measured by range and Genotypic Coefficient of Variation (GCV). Genotypic variation is useful when selecting genotypes to improve particular traits (Okono, 2001). In most of the cases large difference between genotypic and phenotypic coefficient of variations was observed indicating that environment had great influence on the expression of most of the characters, except for pod width and 100-seed weight. For all the characters studied, the factors genotype (Des) and season (Sat) had a great effect on the variation, with the exception of character pod width where the factor provenance (prov) and season play an important role in the variations detected (Fig. 3). Best values of heritability for the both season were noted for 100-seed weight (92.75-92.93%) and pod width (67.17-56.51%). The height value of heritability noted for pod width and weight of empty pod reflected the predominance of heritable variation for this trait. High heritability does not necessarily mean high genetic gain. The utility of heritability estimates is, therefore, increased when they are used to estimate genetic advance (Johnson *et al.*, 1955) which indicates the degree of gain in a character obtained under a particular selection pressure. Low heritability for weight, seed number and infected seed number per pod can be explained by the loss of weight and seed by abortion and hard infestation of seed. Johnson *et al.* (1955) found that heritability value along with estimates of genotypic gain were more useful than heritability alone in predicting the effect of selection. High heritability estimates associated with high genotypic conventional gain were obtained for the traits: 100-seed weight and pod weight for the both season.

Repeatability parameters of yield represented by number of seeds per pod and weight of 100 seeds were estimated (Table 3). It was observed that the response of yield and its basic components were dependent of environmental variation. The height value was noted for 100-seed weight and pod width successively (20.822-20.371%) but the values remain low and could not be useful in the selection of cultivars stable for grain yield.

Each tree develops more than two types of pods. Usually around 30 pods were culled per tree; most of pods (9-15) possess arquated shape with the exception of Tissint provenance with value of 3 arquated pods per tree. Less than 0.3% of pod was smaller (1.36-3.6 cm). Different shapes of pods were collected at the end of the mature tree period. Number of seeds per pod varied in the wide range (1-15 per pod), with a seed-coat color range from various shades of brown. These colors are further varied within pods of the same tree and within provenance. It has to be noted that because *Acacia raddiana* is predominantly open-pollinated tree and are usually non uniform, were one for the reasons for the observed morphological difference in pods shape. But also we found an average of two to three trees with regular shape of pods in each provenance for the both seasons with the exception of the provenance Foum Zguid devoid of regular shape of tree. In the both season the

arquated pods were dominated in the provenance of Assa, Meeissi Gluemim, followed by Msceid and Foum Zguid (Fig. 2). Most identical shape of pods was focused in the center of the crown. While around peripheral, the shape of pods was much more varied. It may be due to easy access by insects to peripheral flowers, they were pollinated by the first flowers found in their way. The flowers in the center had tendency of self-pollination the percentage of diversity of form was due to polyploidy, who compensated the diversity of this specie.

CONCLUSION

In this study, morpho-metric traits were used for characterization of genetic diversity within and among natural populations of *Acacia raddiana* in Morocco. Secondly, all the morpho-metric traits were correlated to pod shape in order to establish any relationship which might exist between them. The information obtained would be used for germplasm conservation, management and selection for domestication and improved tree regeneration. Our study on provenances showed that all morpho-metric characters are influenced by environment (soil quality, temperature and annual rainfall) and genetic factors. We have observed significant variations within tree in provenance, provenances and season in all traits. Intra and inter-provenance variability were of the same order; therefore, it was very difficult to characterize provenances according to their geographic origin. This diversity is explained by the type of pollination and polyploidy in this species which makes very difficult a breeding program based on morphological markers. A detailed morphological analysis of a number of characters in the various forms has shown that purely morphological criteria are inadequate for the selection of the trees which had a range of better trait morpho-metrics. The various traits are not regularly correlated with pods quality; they appear strictly in a variety of combinations and relations with environmental conditions. In view of this, any attempt for selection based on morpho-metrics traits of the polymorphic species must fail.

In order to make *Acacia raddiana* rural in Morocco a commercially practicable business, there is urgent need to accomplish molecular genetic diversity assessment of the species throughout its natural habitats in the country. The hyper-variability of molecular markers constitutes great advantages for these types of studies. Further research including available ISSR (inter simple sequence repeats) and microsatellites marker would hopefully provide additional information.

ABBREVIATION

LP (cm)	= Pod length
WP (mm)	= Pod width
WtP (g)	= Pod weight
WtS P ⁻¹ (g)	= Seeds weight per pod
WtEpP (g)	= Empty pod weight
SN P ⁻¹	= Seed number per pod
InSN P ⁻¹	= Infected seed number per pod
Wt100 (g)	= 100-seed weight
Des	= Genotype
Sat	= Season
Pro	= Provenance

REFERENCES

- Abule, E., G.N. Smit and H.A. Snyman, 2005. The influence of woody plants and livestock grazing on grass species composition, yield and soil nutrients in the Middle Awash Valley of Ethiopia. *J. Arid Environ.*, 60: 343-358.
- Alake, C.O., O.J. Ariyo and O.B. Kehinde, 2012. A quantitative analysis of the genetics of yield and yield components in west African okra, *Abelmoschus esculentus* (A. Chev) Stevles. *Int. J. Plant Breed. Gen.*, 6: 94-104.
- Bayo, T. and H.C. Becker, 2005. Genetic variability and interrelationship of traits in the industrial oil crop *Vernonia galamensis*. *Euphytica*, 142: 119-129.
- Belsky, A.J., S.M. Mwonga and J.M. Duxbury, 1993. Effects of widely spaced trees and livestock grazing on understory environments in tropical savannas. *Agrofor. Syst.*, 24: 1-20.
- Benmohammadi, A., L. Benmohammadi, J.L. Ballais and J. Riser, 2000. Analysis of anthropogenic and natural interrelations: Their impact on sanding up and desertification in southeastern Morocco (Draa and Ziz valleys). *Sci. Changements Planctaires*, 11: 297-308.
- Bennett, M.D., P. Bhandal and I.J. Leitch, 2000. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses-807 new estimates. *Ann. Bot.*, 86: 859-909.
- Bijaber, N. and Z. Ahlafi, 2005. FORMA project: Detailed design for mapping changes as part of National Forest Inventory. *Ceo Observateur*.
- Brenan, J.P.M., 1957. Notes on mimosoidae: III. *Kew Bull.*, 12: 75-96.
- Bukhari, Y.M., 1997. Cytoevolution of taxa in *Acacia* and *Prosopis* (Mimosaceae). *Aust. J. Bot.*, 45: 879-891.
- Burke, A., 2006. Savanna trees in Namibia: Factors controlling their distribution at the arid end of the spectrum. *Flora*, 201: 189-201.
- Chiveu, C.J., O.G. Dangasuk, M.E. Omunyin and F.N. Wachira, 2009. Quantitative variation among Kenyan populations of *Acacia senegal* (L.) Willd. for gum production, seed and growth traits. *New For.*, 38: 1-14.
- Cony, M.A. and S.O. Trione, 1998. Inter-and intraspecific variability in *Prosopis flexuosa* and *P. chilensis*: Seed germination under salt and moisture stress. *J. Arid Environ.*, 40: 307-317.
- Dangasuk, O.G., P. Seurei and S. Gudu, 1997. Genetic variation in seed and seedling traits in 12 African provenances of *Faidherbia Albida* (Del.) A. Chev. At Lodwar, Kenya. *Agrofor. Syst.*, 37: 133-141.
- De Jong, C., S. Cappy, M. Finekh and D. Funk, 2008. A transdisciplinary analysis of water problems in the mountainous karst areas of Morocco. *Eng. Geol.*, 99: 228-238.
- Derbel, S., Z. Noumi, K.W. Anton and M. Chaieb, 2007. Life cycle of the coleopter *Bruchidius raddiana* and the seed predation of the *Acacia tortilis* subsp. *Raddiana* in Tunisia. *Comptes Rendus Biol.* 330: 49-54.
- Diaz, R., R. Zas and J. Fernandez-Lopez, 2007. Genetic variation of *Prunus avium* in susceptibility to cherry leaf spot (*Blumeriella jaapii*) in spatially heterogeneous infected seed orchards. *Ann. For. Sci.*, 64: 21-30.
- Duponnois, R. and C. Plenchette, 2003. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza*, 13: 85-91.
- El-Ayadi, F., N.A. Aabd, A. El-Finti, F. Msanda, F. Baniaameur and A. El-Mousadik, 2011. Genetic variability of wild provenances of *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* (Savi) brenan in South of Morocco. *Asian J. Plant Sci.*, 10: 43-51.
- Ernst, W.H.O., D.J. Tolsma and J.E. Decelle, 1989. Predation of seeds of *Acacia tortilis* by insects. *Oikos*, 54: 294-300.

- Guinet, P. and J. Vassal, 1978. Hypotheses on the differentiation of the major groups in the genus *Acacia* (Leguminosae). *Kew Bull.*, 32: 509-527.
- Hagos, M.G. and G.N. Smit, 2005. Soil enrichment by *Acacia mellifera* subsp. *dentinens* on nutrient poor sandy soil in a semi-arid Southern Africa Savanna. *J. Arid Environ.*, 61: 47-59.
- Hubener, H., M. Schmidt, M. Sogalla and M. Kerschgens, 2005. Simulating evapotranspiration in a semi-arid environment. *Theoretical Applied Climatol.*, 80: 153-167.
- Jacques, D., M. Marchal and Y. Curnel, 2004. Relative efficiency of alternative methods to evaluate wood stiffness in the frame of hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry) clonal selection. *Ann. For. Sci.*, 61: 35-43.
- Jaouadi, W., L. Hamrouni, N. Souayah and M.L. Khouja, 2010. Etude de la germination Des graines d'*Acacia tortilis* sous différentes contraintes abiotiques. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 14: 643-652.
- Johnson, H.W., H.F. Robinson and R.E. Comstock, 1955. Estimates of genetic and environmental variability in soybean. *Agron. J.*, 47: 314-318.
- Kaushik, K., S. Kumar, K. Kumar, R.S. Beniwal, N. Kaushik and S. Roy, 2007. Genetic variability and association studies in pod and seed traits of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre in Haryana, India. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 54: 1827-1832.
- Khbaya, B., M. Neyra, P. Normand, K. Zerhari and A. Filali-Maltouf, 1998. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia that nodulate *Acacia* spp. in Morocco assessed by analysis of rRNA genes. *Applied Environ. Microbiol.*, 64: 4912-4917.
- Klose, S., B. Reichert and A. Lahmouri, 2008. Management Options for a Sustainable Groundwater Use in the Middle Draa Oases under the Pressure of Climatic Changes. In: *Climatic Changes and Water Resources in the Middle East and North Africa*, Zereini, F. and H. Hoetzl (Eds.), Springer, Berlin, pp: 179-195.
- Lakshmi, M.N. and S. Gopakumar, 2009. Morphological keys for four Australian *Acacia* species grown in Kerala, India. *J. Trop. Agric.*, 47: 62-66.
- Luckow, M., 2005. Tribe Mimosaceae. In: *Legumes of the World*, Lewis, G., B. Schrire, B. Mackinder and M. Lock (Eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, pp: 163-183.
- Maslin, B.R., 2003. Proposed name changes in *Acacia* Australian Plants. <http://asgap.org.au/APOL29/mar03-2.html>
- Maslin, B.R., 2006. Generic and infrageneric names in *Acacia* following retypification of the genus. The Science Behind *Acacia*: Current Research and Recent Discoveries, Melbourne, August 25-28, 2006.
- Maslin, B.R., J.T. Miller and D.S. Seigler, 2003. Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Aust. Systematic Bot.*, 16: 1-18.
- McDonald, M.W. and B.R. Maslin, 2000. Taxonomic revision of the salwoods: *Acacia aulacocarpa* Cunn. ex Benth. and its allies (Leguminosae: Mimosoideae: section Juliflorae). *Aust. Syst. Bot.*, 13: 21-78.
- Membrives, N., J. Pedrola-Monfort and J. Caujape-Castells, 2003. Correlations between morphological-anatomical leaf characteristics and environmental traits in Southwest African species of *Androcymbium* (Colchicaceae). *Bot. Macaronesica*, 24: 73-85.
- Moles, A.T. and M. Westoby, 2004. Seedling survival and seed size: A synthesis of the literature. *J. Ecol.*, 92: 372-383.
- Moore, G., G.F. Smith, E. Figueiredo, S. Demissew and G. Lewis *et al.*, 2010. *Acacia*, the 2011 nomenclature section in Melbourne and beyond. *Taxon*, 59: 1188-1195.

- Nanson, A., 1970. Heritability and genetic gain in some types of experiments. *Silvae Genet.*, 19: 113-121.
- Nanson, A., 2004. Genetics and Tree Improvement. Press of Gembloux Agricultural, Belgium, Pages: 153.
- Ndoye, I., M. Gueye, S.K.A. Danso and B. Dreyfus, 1995. Nitrogen fixation in *Faidherbia albida*, *Acacia raddiana*, *Acacia Senegal* and *Acacia seyal* estimated using the ¹⁵N isotope dilution technique. *Plant Soil*, 172: 175-180.
- Okeno, J.A., 2002. Genotypic variation in morphological traits of barley as affected by nitrogen supply. *Dev. Plant Soil Sci.*, 92: 64-65.
- Ouarda, H.E.F., D.J. Walker, M.L. Khouja and E. Correal, 2009. Diversity analysis of *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. *raddiana* (Savi) Brenan (Mimosaceae) using phenotypic traits, chromosome counting and DNA content approaches. *Gent. Resour. Crop Evolut.*, 56: 1001-1010.
- Raddad, E.A.Y., 2007. Ecophysiological and genetic variation in seedling traits and in first-year field performance of eight *Acacia senegal* provenances in the Blue Nile, Sudan. *New For.*, 34: 207-222.
- Revenga, C., S. Murray, J. Abramovitz and A. Hammond, 1998. Watersheds of the World: Ecological Value and Vulnerability. World Resources Institute and World Watch Institute, Washington DC.
- Romdhane, S.B., H. Nasr, R. Samba-Mbaya, M. Neyra, M.H. Ghorbal and P. De Lajudie, 2006. Genetic diversity of *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* rhizobia in Tunisia assessed by 16S and 16S-23S rDNA genes analysis. *J. Applied Microbiol.*, 100: 436-445.
- Ross, J.H., 1979. A Conspectus of the African *Acacia* Species. Botanical Research Institute, South Africa, pp: 21-58.
- Ross, J.H., 1981. An analysis of the African *Acacia* species: their distribution, possible origins and relationships. *Bothalia*, 13: 389-413.
- Schulz, O., H. Busche and A. Benbouziane, 2008. Decadal Precipitation Variances and Reservoir Inflows in the Semi-Arid Upper Draa Basin (South-Eastern Morocco). In: Climatic Changes and Water Resources in the Middle East and in North Africa, Zereini, F. and H. Hoetzl (Eds.). Springer, Wien, pp: 165-178.
- Shrestha, M.K., W.D. Stock, D. Ward and A. Galan-Goldhirsh, 2003. Water status of isolated Negev desert populations of *Acacia raddiana* with different mortality levels. *Plant Ecol.*, 168: 297-307.
- Ward, D. and C. Rohner, 1997. Anthropogenic causes of high mortality and low recruitment in three *Acacia* tree species in the Negev desert, Israel. *Biodiversity Conservat.*, 6: 877-893.
- Westoby, M., D.S. Falster, A.T. Moles, P.A. Vesk and I.J. Wright, 2002. Plant ecological strategies: Some leading dimensions of variation between species. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 33: 125-159.

Annexe 2

Description des amores utilisée

Seq name	Product Size	Tm	%GC	type	Sequence
GR483081	233	55.15	55.0	forward	TCCACGCACTGAAGCAAGAC
		54.61	55.0	reverse	TACCCCTACCAGCACGTGAA
GR482038	260	55.21	55.0	forward	TCGCCACTCAAACCTCAGGGA
		54.62	55.0	reverse	GGCCATAGTTGCCATCCGA
GR483097	288	54.20	43.5	forward	ACCAGAACAGTACAAGCCATTCA
		55.10	60.0	reverse	TGACCCCCAAAGGGAGAAGGG
AH:	140	58.0	45.0	forward	GACAGAGGGAGCATTGTA
HQ110862		60.0	48.0	reverse	CAGACAAGACCAGAGAATGAC