

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mohamed Khider Biskra

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



N° d'ordre : .....

Série : .....

THÈSE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

OPTION : BIOLOGIE APPLIQUEE MOLECULES BIOACTIVES ET APPLIQUATIONS

Présentée par : ACHOUR HANANE

THÈME

**Étude de la diversité génétique et  
ampélographique de la vigne cultivée et  
spontanée dans la région d'El-Kantara, en  
Algérie.**

Soutenue le : 25/06/2025

Devant le jury composé de :

ZEROUAL Samir	MCA	Président	Université de Biskra
LAIADI Ziane	Professeur	Directeur de la thèse	Université de Biskra
REKIS Abdelkrim	MRA	Examineur	CRSTRA
DEBABECHE Kaouther	MRA	Examineur	CRSTRA

Année universitaire : 2024/2025

## **REMERCIEMENTS**

*Louange à Allah, seigneur de l'univers, le tout puissant et miséricordieux, qui m'a inspirée et comblée de ses bienfaits, je lui en rends grâce.*

### *A mon Rapporteur*

*Je souhaite exprimer à mon encadreur, le professeur LAIADI Ziane, ma profonde gratitude pour son soutien, sa disponibilité, son expertise et son accompagnement tout au long de ce projet*

### *Aux membres du jury,*

*Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur ZEROUAL Samir le Docteur qui a accepté de présider ce jury de mémoire.*

*C'est avec une profonde gratitude que je remercie Madame le Docteur DEBABECHE Kaouther d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Mes remerciements vont également à Monsieur le Docteur REKIS Abdelkrim qui a gentiment accepté d'évaluer ce travail et de faire partie de ce jury de mémoire.*

### *Au laboratoire où j'ai effectué ma thèse,*

*Je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers ceux qui ont rendu possible la réalisation de ce travail, en particulier le professeur MOUSSI Abdelhamid, responsable du laboratoire de recherche en génétique, biotechnologie et valorisation des bio-ressources.*

*Je souhaite exprimer ma profonde gratitude au docteur DANIELE MIGLIARO pour son précieux soutien et je suis reconnaissant pour le temps et l'énergie qu'il a investis dans la réalisation de ce projet. Une mention spéciale est attribuée à Mlle le Docteur YAHIAOUI Wahiba. Je vous exprime ma gratitude pour votre disponibilité en toutes circonstances. C'était fort plaisant de collaborer avec vous.*

### *A mes amis,*

*Ameni, Kenza, Fatima ,,,,,,*

*Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à tous les membres de ma famille, que j'aime plus que tout, particulièrement à mes parents, mon mari et mon enfant. Je tiens à vous remercier tous pour votre amour et votre soutien, qui sont essentiels à ma force et à mon équilibre dans la vie.*

*Je souhaite dédier un espace spécial à mon époux bien-aimé*

*« **GUERFI Abdelhakim** »,*

*Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à mon cher époux, dont le soutien indéfectible et la présence quotidienne ont été une véritable force pour moi. Son enthousiasme contagieux, non seulement envers mes travaux mais aussi envers chaque aspect de la vie, m'a insufflé une énergie nouvelle à chaque étape. Sa confiance en mes capacités et son amour constant ont joué un rôle clé dans l'accomplissement de ce projet.*

## ملخص

إن توصيف الموارد الحيوية الوراثية يمثل فرصة أساسية لحماية التراث الجزائري في مجال زراعة الكروم وجعله قادراً على المنافسة على المستوى الدولي، مع ضمان استدامته في مواجهة التحديات المناخية والاقتصادية.

كان الهدف من هذه الأطروحة هو تحليل وتحديد وتقييم التنوع البيولوجي لكروم العنب الجزائري، وتحديدًا في منطقة القنطرة (المسمات قديما كالسيوس هرقل)، والتي تعتبر ملتقى طبيعي بين الشمال والجنوب. ولتحقيق هذا الهدف، أُجريت دراسة مشتركة للتوصيف الجزيئي باستخدام الميكروستيللايت النووية (SSR) والتحليل الأمبليو غرافي للأوراق. هذا الأسلوب يعد نهجًا استراتيجيًا لتحديد أصناف العنب المحلية وتحسينها، لاسيما لمواجهة التحديات الزراعية والبيئية الحالية. ومع ذلك، فإن فعالية الطريقة الجزيئية تعتمد على جودة الحمض النووي الجينومي المستخلص، والتي يجب أن تكون مثالية.

حيث أُجريت دراسة توصيف تستند إلى تحليل 12 نوع من الميكروستيللايت النووية على 51 صنفًا من منطقة القنطرة. بالإضافة إلى ذلك، وبفضل تحسين بروتوكول استخلاص الحمض النووي الجيني، تم الحصول على نتائج مُرضية من حيث تركيز الحمض النووي (2109.5 ميكروغرام/مل) وعائد الاستخلاص (1,265 ميكروغرام/غرام)، مع انخفاض تكاليف الاستخلاص إلى 54.39 دج لكل عينة. كما كشفت تحاليل التوصيف عن ثراء وتنوع في أصناف العنب المزروعة في المنطقة، حيث تم الكشف عن 18 نمطاً وراثياً منها: أصناف من أصول عالمية من مختلف البلدان، معظمها من حوض البحر الأبيض المتوسط "الدابوقي، الرزقي، تافريلت أو فرانا سوداء، عفوس علي، مسكا الإسكندرية، دانيج، داتيه دي إس تي. فالبيه، وصنف الكاردينال"، و3 أنماط وراثية من أصل جزائري "أمقران، وأحمر بو أحمر، والوالي" و7 أنماط وراثية لا يوجد لها مثيل في قواعد البيانات الدولية ولم يتم الإبلاغ عنها أبداً، والتي قد تمثل أصنافاً جزائرية فريدة من نوعها تخص منطقة القنطرة.

**الكلمات المفتاحية:** الكرمة، استخلاص الحمض النووي، الميكروستيللايت النووية، التوصيف الجزيئي، التحليل الأمبليو غرافي، القنطرة (كالسيوس هرقل).

## RÉSUMÉ

La caractérisation des bioressources génétiques représente une opportunité essentielle pour protéger le patrimoine viticole algérien et le rendre compétitif au niveau international tout en assurant sa durabilité face aux défis climatiques et économiques.

L'objectif de cette thèse a été d'analyser, identifier et évaluer la biodiversité de vignoble algérien exactement dans la région d'El-Kantara (*Calceus Herculis*) qui est un point de passage naturel entre le Nord et le Sud. Pour atteindre cet objectif, une étude combinant caractérisation moléculaire par marqueurs moléculaires (microsatellites nucléaires SSR) et analyse ampélographique des feuilles a été réalisée. Cette approche est stratégique pour la sélection et l'amélioration des variétés de vigne, notamment pour répondre aux défis agronomiques et environnementaux actuels. Toutefois, l'efficacité de la méthode moléculaire dépend de la qualité de l'ADN génomique à extraire, qui doit être optimale.

Une étude de caractérisation basée sur l'analyse de 12 microsatellites nucléaires a été menée sur 51 cultivars de la région d'El-Kantara. De plus, grâce à l'optimisation efficace du protocole d'extraction d'ADN génomique, des résultats satisfaisants ont été obtenus en termes de concentration d'ADN (2 109,5 µg/ml) et de rendement d'extraction (1,265 µg/g), avec un coût d'extraction réduit à 54,39 DA par échantillon. Les analyses de caractérisation révèlent par ailleurs une richesse et une diversité de l'héritage viticole de cette région, avec 18 génotypes comprenant des cultivars d'origine internationale provenant de divers pays du bassin méditerranéen, notamment « Dabouki, Rassegui, Taferielt ou Farana noir, Afus Ali, Muscat of Alexandria, Danugue et Dattier de ST. Vallier et la variété Cardinal »), trois génotypes d'origine algérienne (Amokrane, Ahmer Bou Ahmeur et Louali) et sept génotypes sans correspondance dans les bases de données internationales et jamais signalés. Ces derniers pourraient représenter des variétés algériennes uniques et spécifiques à la région d'El-Kantara.

**Mots-clés :** vigne, extraction d'ADN, microsatellites nucléaires, caractérisation moléculaire, analyse ampélographique, El-Kantara (*Calceus Herculis*).

## SUMMARY

The characterisation of genetic bioresources represents a vital opportunity to protect Algeria's viticultural heritage, increase its international competitiveness and ensure its sustainability in the face of climatic and economic challenges.

The aim of this work was to analyse, identify and evaluate the biodiversity of the Algerian vineyard, particularly in the El-Kantara region (*Calceus Herculis*), a natural interface between north and south. To achieve this objective, a combined study of molecular characterisation using nuclear microsatellite markers (SSR) and ampelographic analysis of leaves was carried out. This approach is strategic for the selection and improvement of grapevine varieties, in particular to meet current agronomic and environmental challenges. However, the effectiveness of molecular methods depends on the quality of the extracted genomic DNA, which must be optimal.

A characterisation study based on the analysis of 12 nuclear microsatellites was applied to 51 cultivars from the El-Kantara region. In addition, through the effective optimisation of a genomic DNA extraction protocol, satisfactory results were obtained in terms of DNA concentration (2 109.5 µg/ml) and extraction yield (1.265 µg/g), with a reduced extraction cost of 54.39 DA per sample. While the characterisation analyses reveal the richness and diversity of the vine-growing heritage of this region, 18 genotypes were identified, including: varieties of international origin from various countries, most of them Mediterranean (Dabouki, Rassegui, Taferielt or Farana Noir, Afus Ali, Muscat of Alexandria, Danugue, Dattier de St. Vallier and the variety Cardinal), 3 genotypes of Algerian origin ("Amokrane, Ahmer Bou Ahmeur and Louali") and 7 genotypes with no correspondence in international databases and never reported and which could represent unique Algerian varieties specific to the El-Kantara region.

**Keywords :** grapevine, DNA extraction, nuclear microsatellites, molecular characterisation, ampelographic analysis, El-Kantara (*Calceus Herculis*).

# **Table des matières**

# Table des matières

<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>V</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>VII</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>IX</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
Problématique scientifique de l'étude .....	<b>4</b>
Objectifs de la thèse .....	<b>5</b>
Questions de recherche.....	<b>5</b>

## I. Matériels et méthodes

I.1. Présentation de la région d'étude.....	<b>9</b>
I.2. Matériel biologique.....	<b>10</b>
I.2.1. Description de matériel biologique étudié .....	<b>10</b>
I.2.1.1. L'espèce <i>Vitis vinifera</i> L.....	<b>10</b>
I.2.1.2. Les cépages identifiés en Algérie.....	<b>11</b>
I.2.2. La prospection et le choix des cultivars.....	<b>12</b>
I.3. Méthodes de travail .....	<b>17</b>
I.3.1. Optimisation de protocole d'extraction d'ADN génomique.....	<b>17</b>
I.3.1.1. Préparation de l'échantillon.....	<b>17</b>
I.3.1.2. Protocole d'extraction d'ADN génomique.....	<b>18</b>
I.3.1.3. Vérification la qualité et la quantité d'ADN extrait.....	<b>21</b>
A. Evaluation de l'intégrité d'ADN extrait .....	<b>21</b>
B. Détermination de la quantité et la qualité d'ADN extrait .....	<b>22</b>
I.3.1.4. Coût de méthode d'extraction .....	<b>22</b>
I.3.2. Identification génotypique des cépages étudiés.....	<b>23</b>
I.3.2.1. La structure génétique .....	<b>23</b>



I.3.2.2. Extraction de l'ADN génomique .....	23
A. Vérification de la quantité et la qualité d'ADN extrait.....	25
I.3.2.3. Caractérisation génétique par la PCR-SSR .....	26
I.3.2.4. Analyse des produits de PCR.....	29
I.3.2.5. Analyse bio-informatique.....	30
I.3.2.5.1. Détermination des synonymes .....	30
I.3.2.5.2. Analyse d'identification (génotypage).....	31
I.3.2.6. Analyse statistique des données génotypiques.....	31
I.3.2.6.1. Diversité génétique.....	31
A. Nombre d'allèles différents (No) et effectifs (Ne) .....	32
B. Hétérozygotie observée (Ho) et hétérozygotie attendue (He).....	32
C. Les indices de la diversité génétique .....	32
I.3.2.7. Analyse phylogénétique.....	34
I.3.3. Caractérisation ampélographique des nouvelles variétés identifiées .....	34
I.3.3.1. Analyse ampélographique .....	34
A. Les paramètres quantitatifs (Ampélogométrie).....	37
B. les paramètres qualitatifs.....	39
I.3.3.2. Analyse statistique des données obtenues.....	41

## **II. Résultats et Discussions**

II.1. Optimisation de protocole d'extraction d'ADN génomique.....	44
II.1.1. Résultats obtenus .....	44
II.1.1.1. L'ADN extrait avant optimisation.....	44
II.1.1.2. L'ADN extrait après optimisation.....	44
II.1.1.3. Evaluation de la qualité et la quantité d'ADN extrait .....	45
II.1.2. Discussions.....	47
II.1.2.1. Discussion analytique .....	47
II.1.2.2. Discussion des résultats.....	51

II.1.2.3. Estimation des coûts.....	52
II.2. Identification génotypique des cépages étudiés .....	52
II.2.1. L'ADN extrait .....	53
II.2.2. Identification génotypique et dénominations des cultivars .....	53
A. Cultivars étrangères.....	59
B. Cultivars algériens traditionnels.....	62
C. Nouveaux génotypes identifiés .....	63
II.2.3. Analyses statistiques.....	65
II.2.3.1. Estimation de la diversité génétique .....	65
A. Le nombre d'allèles différents ( $N_o$ ) et effectif d'allèles ( $N_e$ ) .....	65
B. L'hétérozygotie attendue ( $H_e$ ) et observée ( $H_o$ ).....	66
C. La fréquence de l'allèle nul F (null) .....	67
D. Équilibre de Hardy-Weinberg (HW).....	67
E. L'indice d'information de Shannon (I).....	67
F. Indice de fixation ( $F_{is}$ ).....	68
G. La probabilité d'identité ( $P_I$ ).....	68
H. Loci spécifiques.....	68
II.2.4. Résultats phylogénétiques.....	69
II.2.5. Comment l'histoire a-t-elle influencé la diversité des variétés dans cette région ?.....	72
III.3. Etude ampélographique des nouvelles variétés identifiées.....	75
III.3.1. Etude des critères quantitatifs .....	75
III.3.1.1. Statistiques descriptives et diversité phénotypique des génotypes étudiés.....	75
III.3.1.2. Corrélations entre les variables.....	78
III.3.1.3. ACP des génotypes étudiés .....	79
III.3.2. Etude des critères qualitatifs .....	81

III.3.2.1. Identification des caractères ampélographiques des nouvelles variétés identifiés.....	82
III.3.2.1.1. Forme de limbe (OIV 067).....	83
III.3.2.1.2. Nombre de lobes (OIV068) .....	84
III.3.2.1.3. Forme des dents (OIV 076).....	85
III.3.2.1.4. Longueur de pétiole (OIV093).....	85
III.3.2.1.5. Caractéristiques qualitatives liées au sinus pétiolaire .....	86
A. Forme de la base du sinus pétiolaire (OIV 080).....	86
B. Degré d'ouverture de sinus pétiolaire (OIV 079) .....	87
C. Dents dans le sinus pétiolaire (OIV 081-1).....	87
III.3.2.1.6. Caractéristiques qualitatives liées aux sinus latéraux supérieurs .....	88
A. Etude de degré d'ouverture / chevauchement des sinus latéraux supérieurs.....	88
B. Etude de profondeur des sinus latéraux supérieurs (OIV 094) .....	89
C. Etude la présence ou l'absence des dents dans les sinus latéraux supérieurs.....	89
III.3.2.1.7. Caractéristiques qualitatives liées à la distribution de la pigmentation anthocyannique (OIV 070/ OIV 071).....	90
III.3.2.1.8. Caractéristiques qualitatives liées aux poils couchés / dressés .....	91
A. Etude des poils couchés (OIV 088) /dressés (OIV 089) sur les nervures principales de la face supérieure du limbe .....	91
B. Etude de la densité des poils couchés (OIV 084) /dressés (OIV 085) entre les nervures principales de la face inférieure du limbe.....	91
C. Etude de la densité des poils couchés (OIV 090) /dressés (OIV 091) sur le pétiole...	92
III.3.2.2. Reconnaissance des assemblages des variétés nouvellement identifiés par l'AFC et CAH.....	93
III.3.3. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) et relations parentales entre les cépages	96
 <b>Conclusion</b> .....	 100
<b>Références bibliographiques</b> .....	104
 <b>Annexes</b>	

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01.</b>	Nombre de cépages existant dans l'Algérie selon diverses sources documentaires.....	<b>p12</b>
<b>Tableau 02 .</b>	Liste des cultivars étudiés.....	<b>p15</b>
<b>Tableau 03.</b>	Paramètres optimisés pour le protocole proposé par Piccolo et <i>al.</i> (2012).	<b>p19</b>
<b>Tableau 04.</b>	Amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification par PCR de différentes microsatellites SSR étudiés.....	<b>p27</b>
<b>Tableau 05.</b>	Des informations sur les amorces des loci microsatellites utilisés dans cette étude, y compris le nom du marqueur, la concentration des amorces et la taille de l'allèle obtenue.....	<b>p28</b>
<b>Tableau 06.</b>	Programme d'amplification par PCR des séquences cibles contenant les loci étudiés. ....	<b>p29</b>
<b>Tableau 07.</b>	Exemple de format de fichier d'entrée dans Microsoft Excel.....	<b>p30</b>
<b>Tableau 08.</b>	Tableau récapitulatif des paramètres quantitatifs et qualitatifs étudiés.....	<b>p35</b>
<b>Tableau 09.</b>	Codification des paramètres ampélographiques quantitatifs (longueurs en mm, angles en °).....	<b>p38</b>
<b>Tableau 10.</b>	Codification des paramètres qualitatifs étudiés. ....	<b>p39</b>
<b>Tableau 11.</b>	Concentration moyenne, masse et rendement de l'ADN extrait à l'aide du protocole de Piccolo et <i>al.</i> (2012).....	<b>p46</b>
<b>Tableau 12.</b>	Concentration moyenne, masse et rendement de l'ADN extrait à l'aide du protocole optimisé.....	<b>p46</b>
<b>Tableau 13.</b>	Détermination de la pureté de l'ADN extrait par le protocole optimisé.	<b>p47</b>
<b>Tableau 14.</b>	Liste de cultivars de même synonymes (des géotypes identiques). Les 18 profils SSR différents obtenus à 12 loci SSR. La longueur des allèles est exprimée en paires de bases.....	<b>p55</b>
<b>Tableau 15.</b>	Liste des 18 profils SSR uniques obtenus à 12 loci SSR. La longueur des allèles est exprimée en paires de bases.....	<b>p56</b>
<b>Tableau 16.</b>	Liste des 51 échantillons de vigne regroupés par géotype. Le nom de cultivars, la couleur des baies, le nom de l'espèce originale, le pays d'origine, le numéro d'identification du profil SSR (ID) et le code du catalogue international des variétés de vigne ( <i>VIVC</i> ) sont indiqués.....	<b>p57</b>

<b>Tableau 17.</b>	Comparaison entre les profils microsatellites des accessions algériennes analysées et des cultivars étudiés (Farana noir) dans ce travail avec des autres génotypes de vigne publiés.....	<b>p62</b>
<b>Tableau 18.</b>	Analyse statistique de 12 marqueurs SSR évalués dans 51 génotypes de vigne.....	<b>p65</b>
<b>Tableau 19.</b>	Statistiques descriptives des caractéristiques morphologiques des génotypes étudiés : Les valeurs minimales, maximales, moyennes, l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV%).....	<b>p76</b>
<b>Tableau 20.</b>	Paramètres qualitatifs observés sur la feuille adulte de nouvelles variétés locales selon le catalogue d'OIV. ....	<b>p83</b>

## Liste des figures

<b>Figure 01.</b>	Situation géographique d'El-Kantara en Algérie.....	p9
<b>Figure 02.</b>	Les sites géographiques dans la commune d'El-Kantara où les variétés de raisin ont été prélevées. 1-Dachera, 2- El-Ghousse, 3- Bourj El-Ghoula (Greuger) et 4- El-Faidhe.....	p13
<b>Figures 03.</b>	Vignes poussant à différents endroits de l'oasis. <b>A</b> et <b>B</b> : Vignes poussant à l'intérieur d'une ancienne maison traditionnelle d'El-Kantara. <b>C</b> et <b>D</b> : vignes grimpant le long du mur de forêt. <b>E</b> et <b>F</b> : Vignes grimpant les arbres de palmier et de grenadier.....	p14
<b>Figure 04.</b>	Schéma représentatif de procédure d'extraction d'ADN en utilisant DNeasy Plant Kits.....	p25
<b>Figure 05.</b>	Exemples d'électrophorégrammes avec des pics colorés représentant des allèles SSR. Dont les pics orange sont les pics de taille standard..	p29
<b>Figure 06.</b>	Profil électrophorétique de l'ADN énomique obtenu après application du protocole de Piccolo et <i>al.</i> (2012). Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% a été réalisée, suivie d'une coloration BET et d'une visualisation sous lumière UV. Les puits V1, V2, V3, V4, V5 et T représentent les échantillons utilisés.....	p44
<b>Figure 07.</b>	Profil électrophorétique de l'ADN obtenu après application du protocole optimisé. Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% a été réalisée, suivie d'une coloration BET et d'une visualisation sous lumière UV. Les puits V1, V2, V3, T, V3 (échantillon répété), V4 et V5 représentent les échantillons utilisés.....	p45
<b>Figure 08.</b>	Dendrogramme illustrant les relations génétiques entre 18 génotypes pour les 12 locus microsatellites. Arbre obtenu à l'aide de l'algorithme NJ.....	p69
<b>Figure 09.</b>	Le pont romain ( <i>Calceus Herculis</i> ).....	p73
<b>Figure 10.</b>	Monument historique inscrit d'El-Kantara, qui est un texte funéraire concernant une famille syrienne de soldats Baras (Lassère, 1965).....	p74
<b>Figure 11.</b>	Matrice de corrélation de 17 caractères ampérométriques parmi les nouvelles variétés de vigne d'El-Kantara (Algérie).....	p79

<b>Figure 12.</b>	Diagramme de dispersion bidimensionnel des deux premières composantes principales (PC1 et PC2) montrant la distribution des nouveaux génotypes de vigne sur la base de 17 caractéristiques ampérométriques des feuilles.....	p81
<b>Figure 13.</b>	Forme de limbe des échantillons étudiés.....	p84
<b>Figure 14.</b>	Le nombre de lobe des génotypes étudiés. ....	p84
<b>Figure 15.</b>	La forme des dents de la feuille adulte des nouvelles variétés identifiées.....	p85
<b>Figure 16.</b>	Longueur du pétiole par rapport à la longueur de la nervure médiane. a = Longueur du pétiole, b = Longueur de la nervure médiane N1 (a un peu court que b = notation 3). (OIV, 2009).....	p86
<b>Figure 17.</b>	Forme de la base du sinus pétiolaire des différents cultivars étudiés....	p87
<b>Figure 18.</b>	Feuille adulte : Degré d'ouverture / chevauchement du sinus pétiolaire ( <a href="https://www.plantgrape.fr/fr">https://www.plantgrape.fr/fr</a> ).....	p87
<b>Figure 19.</b>	Degré d'ouverture / chevauchement des sinus latéraux supérieurs des différents cultivars étudiés.....	p88
<b>Figure 20.</b>	Les différentes profondeurs des sinus latéraux supérieurs (OIV 094) dans la feuille adulte ( <a href="https://www.plantgrape.fr/fr">https://www.plantgrape.fr/fr</a> ).....	p89
<b>Figure 21.</b>	Schéma représente les nervures principales de la feuille adulte de la vigne (OIV, 2009).....	P90
<b>Figure 22.</b>	Schéma représente la densité des poils couchés (A) / dressés (B) sur les nervures principales ( <a href="https://www.plantgrape.fr/fr">https://www.plantgrape.fr/fr</a> ).....	p91
<b>Figure 23.</b>	Schéma représente la densité des poils couchés (A) / dressés (B) entre les nervures principales sur la face inférieure du limbe .....	p92
<b>Figure 24.</b>	Représentation graphique des cépages nouvellement identifiés en AFC.....	P94
<b>Figure 25.</b>	Classification ascendante hiérarchique sur les 3 premiers axes de l'AFC.....	P95
<b>Figure 26.</b>	Dendrogramme décrivant les relations phénotypiques entre les nouveaux génotypes de vigne à l'aide de la méthode de regroupement UPGMA et des distances euclidiennes.....	p97

## Liste des abréviations

<b>ACP</b>	(PCA) analyse en composantes principales
<b>BET</b>	Bromure ethidium
<b>β-ME</b>	β-mercaptoéthanol
<b>CGIAR</b>	<i>Consultative Group on International Agricultural Research</i> , soit Groupe consultatif pour la recherche agricole internationale
<b>cpSSR</b>	( <i>chloroplastic simple sequence repeat</i> ) microsatellite chloroplastique
<b>CREA</b>	Council for Agricultural Research and Economics
<b>CTAB</b>	bromure de cetyltriméthylammonium
<b>CV%</b>	coefficient de variation
<b>dNTP</b>	désoxynucléosides triphosphates
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>INRA</b>	Institut national de la recherche agronomique
<b>NJ</b>	Neighbor-Joining algorithm
<b>OIV</b>	l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin
<b>pb</b>	paire de bases
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidone
<b>RNase A</b>	Ribonucléase
<b>SNP</b>	( <i>single nucleotide polymorphism</i> ) polymorphisme nucléotidique unique
<b>SSR</b>	( <i>simple sequence repeat</i> ) courte séquence répétée ou microsatellite
<b>STR</b>	Répétitions en tandem courtes
<b>TAE</b>	tris, acétate, EDTA
<b>V.</b>	genre <i>Vitis</i>
<b>VIVC</b>	<i>Vitis</i> International Variety Catalogue



# Introduction

## **Introduction**

La région du Maghreb méditerranéen est l'une des zones prioritaires à l'échelle mondiale en matière de biologie de la conservation (Mittermeier et *al.*, 2001). Cette priorité découle de sa richesse taxonomique reconnue, de son fort taux d'endémisme végétal, ainsi qu'aux menaces humaines croissantes (Myers et *al.*, 2000) . Elle figure parmi les huit principaux "hotspots" de biodiversité les plus critiques à l'échelle planétaire. Toutefois, au sein de ce hotspot méditerranéen, la région numide, qui s'étend entre l'Algérie et la Tunisie, reste insuffisamment étudiée et n'a pas encore bénéficié de l'attention qu'elle mérite (Véla et Benhouhou, 2007).

L'Algérie bénéficie d'une riche biodiversité en raison de sa situation géographique et de sa diversité pédoclimatique, comprenant les zones côtières, les plaines, les montagnes, les steppes et les zones sahariennes. La biodiversité revêt une importance cruciale pour l'économie de l'Algérie et pour la préservation de l'équilibre écologique de ces régions face aux défis posés par les changements climatiques. (MADR, 2019).

La vigne, *Vitis vinifera* L., occupe une place prépondérante tant sur le plan économique que culturel, notamment dans les régions méditerranéennes où sa culture remonte à plusieurs millénaires (Bouby, et *al.*, 2023). Elle constitue un pilier économique et culturel dans de nombreuses régions méditerranéennes, y compris l'Algérie, où son histoire remonte à plusieurs siècles. La diversité des cépages en Algérie résulte d'un processus historique complexe, façonné par les différentes civilisations qui se sont succédé sur le territoire. Bien avant l'arrivée des Romains, les populations autochtones Berbères, ou Numides, avaient déjà développé une pratique de la viticulture dans les régions du nord de l'Algérie, notamment dans les vallées fertiles (Rahali et *al.*, 2019).

De plus, l'influence des nombreuses conquêtes sur la diversité des vignobles de la région est indéniable : celle des Phéniciens, des Romains, des Espagnols, des musulmans, etc. Néanmoins, les Phéniciens, puis les Romains, ont certainement contribué à modifier la culture de la vigne en Afrique du Nord (El Oualkadi et *al.*, 2011).

Bien que, le vignoble algérien a connu des transformations significatives au cours des dernières décennies. Selon une étude diachronique sur l'occupation du vignoble algérien, la superficie viticole est passée de 56 000 hectares en 1998 à 75 000 hectares en 2017, plaçant l'Algérie au 22<sup>e</sup> rang mondial en termes de superficie viticole (Caïd et *al.*, 2019).

Cependant, selon le rapport en 2019 sur l'état de la biodiversité en Algérie du ministère de l'Agriculture, du Développement rural et de la Pêche, en collaboration avec l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la dégradation continue du

patrimoine végétal en Algérie, notamment la perte de biodiversité, est un sujet préoccupant. Le rapport indique en effet que plus de 95 % des variétés recensées en Algérie ont disparu (MAP, 2019).

L'insuffisance des mesures de protection et de conservation systématiques au niveau national a conduit à un déclin rapide des variétés locales, augmentant ainsi le risque d'érosion génétique pour cette espèce (*Vitis vinifera* L.) et limitant les possibilités de recherche approfondie. Malgré de nombreuses études moléculaires réalisées à travers le monde sur les cultivars de vigne, les variétés algériennes sont peu explorées et insuffisamment documentées.

En outre, les cépages allochtones dominent actuellement le paysage viticole national. Cette situation est le résultat de l'introduction de variétés étrangères, principalement européennes, qui ont remplacé les cépages autochtones. Cette tendance a conduit à une diminution de la présence des variétés locales qui sont adaptées aux conditions pédoclimatiques spécifiques de l'Algérie (Bounab, 2020).

La domination des cépages allochtones au détriment des cépages autochtones présente des défis pour la préservation de la biodiversité viticole du pays. Les cépages autochtones sont aujourd'hui en voie de disparition et peu représentés dans le paysage viticole du pays. Ces variétés locales possèdent des caractéristiques uniques, notamment une meilleure résistance aux maladies et une adaptation optimale aux conditions climatiques et pédologiques de l'Algérie. Le remplacement des cépages autochtones par des variétés étrangères pourrait entraîner une perte de cette richesse génétique, compromettant ainsi la durabilité et la résilience du secteur viticole algérien.

L'Algérie, dotée d'un germoplasme stabilisé et performant, fait face à un risque sérieux de perte de ce précieux patrimoine génétique, accentuant ainsi sa dépendance envers les variétés introduites. Cette situation est aggravée par l'abandon progressif des espèces locales, souvent délaissées au profit de cultivars internationaux standardisés, ce qui entraîne une réduction alarmante de la diversité génétique. Par ailleurs, les erreurs d'identification des cultivars et l'emploi de dénominations régionales variées ont limité la connaissance et la valorisation de ce riche potentiel, laissant une large part du patrimoine génétique algérien encore peu explorée (Isnard, 1951 ; Merkouropoulos et *al.*, 2015).

Par ailleurs, les milieux naturels, qui abritent des espèces spontanées, subissent depuis longtemps une dégradation accélérée par des événements historiques et l'exploitation humaine. Les zones riches en biodiversité ont été progressivement défrichées, cultivées ou urbanisées, ce qui a parfois entraîné une destruction irréversible de cette richesse naturelle. Ces dynamiques préoccupantes soulignent l'importance d'adopter des politiques rigoureuses pour la conservation

et la valorisation des ressources génétiques locales, afin de préserver ce patrimoine exceptionnel face aux défis actuels.

L'avènement des outils moléculaires, tels que les marqueurs microsatellites (SSR), a considérablement amélioré l'identification génétique et la caractérisation des cépages. Ces marqueurs permettent de distinguer des variations fines, d'établir des relations phylogénétiques, et d'évaluer la diversité génétique, notamment entre cépages locaux et internationaux (Rahali *et al.*, 2019 ; Khouni *et al.*, 2023). Cependant, leur efficacité repose principalement sur la qualité de l'ADN extrait, un paramètre souvent compromis par les métabolites secondaires abondants dans les tissus de la vigne, comme les polyphénols et les polysaccharides (Migliaro *et al.*, 2013 ; Aboul-Maaty et Oraby, 2019). Ces composés peuvent interférer avec les techniques de PCR et d'autres analyses moléculaires, soulignant la nécessité d'un protocole d'extraction fiable, économique et adapté aux laboratoires disposant de ressources limitées (Wang *et al.*, 2011 ; Öner *et al.*, 2022).

En parallèle, l'analyse morphologique des feuilles, appuyée par les descripteurs ampélographiques standardisés de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV), reste une approche précieuse pour compléter la caractérisation génétique. Les feuilles de vigne, par leur variabilité morphologique influencée par des facteurs génétiques et environnementaux, offrent une source riche d'informations pour distinguer et évaluer les cultivars (Galet, 1979 ; Chitwood *et al.*, 2014).

Cette complémentarité entre l'approche moléculaire et ampélographique est stratégique pour la conservation et l'amélioration des variétés locales, tout en répondant aux défis agronomiques et environnementaux contemporains.

## Problématique scientifique de l'étude

Une compréhension approfondie des ressources génétiques d'une espèce cultivée revêt une importance capitale pour garantir une gestion optimale et durable de son patrimoine génétique. Cette compréhension permet de préserver la biodiversité, d'optimiser l'utilisation des ressources et de répondre aux défis posés par les changements environnementaux et les besoins agronomiques. Les institutions internationales telles que la FAO et le CGIAR insistent sur l'importance de la conservation et de l'utilisation rationnelle de la diversité génétique (Frankel *et al.*, 1995 ; Engels et Visser, 2003). Dans ce cadre, Il est indispensable de disposer d'une documentation détaillée sur la diversité génétique, l'unicité, afin de guider toutes les étapes,

depuis l'acquisition de nouveau matériel génétique (par prospections ou échanges) jusqu'à son utilisation, que ce soit pour la diffusion ou la sélection. La diversité génétique constitue le socle des programmes d'amélioration des cultures et de la résilience face aux changements climatiques (FAO, 2010). Une analyse approfondie de cette diversité permet d'identifier des traits uniques ou rares qui pourraient être cruciaux pour l'adaptation aux conditions climatiques changeantes ou pour répondre à des exigences spécifiques en matière de culture.

La problématique scientifique de cette étude repose sur les défis liés à la caractérisation génétique et morphologique des cultivars de vigne, notamment dans un contexte algérien encore peu exploré. Le patrimoine génétique des variétés locales de *Vitis vinifera* L. est mal documenté, ce qui conduit à des erreurs fréquentes dans leur identification et leur classification.

En Algérie, les variétés de vigne sont souvent mal reconnues et peuvent être désignées sous différentes appellations régionales, ce qui complique leur gestion et leur préservation. De plus, l'extraction de l'ADN génomique de haute qualité, nécessaire pour les analyses moléculaires et la caractérisation des cépages, demeure un défi majeur, en raison de la présence de contaminants comme les métabolites secondaires des feuilles. Les méthodes d'extraction actuelles sont souvent coûteuses, peu accessibles et inadaptées aux laboratoires disposant de ressources limitées.

La réduction de la diversité génétique des cépages, exacerbée par l'abandon de variétés traditionnelles, menace la richesse génétique viticole. Ce phénomène est particulièrement préoccupant pour les cépages locaux, qui présentent un potentiel unique pour l'agriculture durable et la production viticole. Toutefois, leur conservation et valorisation nécessitent des outils efficaces, combinant des approches moléculaires et morphologiques, ainsi que des méthodes d'extraction d'ADN simples, rapides et économiques.

Ainsi, la problématique centrale de cette étude est la nécessité de développer des méthodes adaptées et accessibles pour la caractérisation précise des cultivars de vigne en Algérie, en tenant compte des particularités locales et des contraintes des laboratoires.

## **Objectifs de l'étude**

Dans ce contexte, cette étude vise trois objectifs principaux :

1. Optimiser un protocole d'extraction d'ADN basé sur le CTAB pour obtenir un ADN génomique de haute qualité à partir de feuilles déshydratées, adapté aux ressources limitées des laboratoires algériens.
2. Caractériser la diversité des cultivars locaux de vigne en combinant des descripteurs ampélographiques détaillés et des outils moléculaires (SSR).
3. Rechercher les relations phylogénétiques entre les différentes variétés étudiées.

Cette approche intégrée permettra de mieux comprendre la diversité et les relations génétiques des cépages algériens, tout en posant les bases d'une stratégie nationale de conservation et de valorisation des variétés locales. Les résultats attendus fourniront également des outils pratiques pour les initiatives futures en sélection variétale et pour revitaliser un secteur viticole essentiel au développement durable de l'agriculture algérienne.

## **Questions de recherche**

Dans le cadre de notre étude portant sur le vignoble de *Vitis vinifera* dans la région d'El-Kantara en Algérie, nous avons décidé d'employer des marqueurs moléculaires afin de mener une caractérisation approfondie et d'essayer de déterminer avec précision l'origine géographique des différents cépages étudiés. Les individus qui sont parvenus jusqu'à notre époque grâce à la multiplication végétative constituent des preuves tangibles de l'histoire des périodes pendant lesquelles ils ont été initialement développés. Dans le but de mieux comprendre l'évolution chronologique qui a façonné la diversité des cultivars algériens, nous avons identifié les questions de recherche essentielles suivantes :

1. Quels sont les défis liés à l'extraction de l'ADN génomique de haute qualité des feuilles de vigne et comment les surmonter pour garantir des résultats fiables ?

Cette question aborde les problèmes rencontrés lors de l'extraction de l'ADN, notamment l'interférence des métabolites secondaires, et cherche à développer une méthode d'extraction optimisée, simple et économique.

2. Comment concevoir un protocole d'extraction d'ADN adapté aux conditions des laboratoires à ressources limitées, tout en garantissant un rendement et une qualité optimaux pour les analyses moléculaires ?

Cette question explore la conception d'un protocole simplifié, rapide et peu coûteux, qui permette d'extraire l'ADN génomique de haute qualité sans recourir à des équipements coûteux, tout en assurant des résultats fiables pour les analyses ultérieures.

3. Quelle est la diversité génétique des cultivars de vigne en Algérie et comment ces variétés sont-elles liées aux cépages méditerranéens et internationaux ?

Cette question explore la diversité génétique des cépages algériens (spécifiquement de la région d'El-Kantara) à travers l'analyse des marqueurs microsatellites (SSR) et leur relation avec les cépages voisins. Elle permet de mieux comprendre l'origine et les flux génétiques des variétés locales.

4. Quels descripteurs morphologiques, en particulier des caractéristiques foliaires, sont les plus informatifs pour la différenciation des cultivars de vigne locaux en Algérie ?

Cette question vise à identifier les descripteurs ampélographiques les plus pertinents pour caractériser les variétés locales de vigne en Algérie, avec un focus sur les feuilles, qui présentent une grande variabilité morphologique.

5. Comment combiner efficacement les approches génétiques et morphologiques pour améliorer la caractérisation des cultivars de vigne et leur valorisation dans le cadre de la viticulture algérienne ?

Cette question s'intéresse à l'intégration de différentes approches pour mieux comprendre et préserver la diversité des cultivars locaux, tout en proposant des outils pratiques pour leur sélection et leur amélioration.

Ces questions sont directement liées aux objectifs de l'étude, qui sont de développer une méthode d'extraction optimisée, de caractériser la diversité génétique des cépages algériens et de proposer une approche intégrée pour leur conservation et valorisation.

Afin de répondre aux questions posées, une étape d'optimisation de protocole d'extraction d'ADN a d'abord été réalisée en tenant compte des ressources limitées de notre laboratoire. La diversité et la différenciation moléculaire des cépages mis en évidence ont ensuite été analysées

à l'aide de marqueurs microsatellites nucléaires. Enfin, la caractérisation ampélographique des cultivars choisis a été étudiée et comparé à la diversité moléculaire précédente. La dernière partie a duré deux ans successives, au cours desquelles nous avons suivi le cycle annuel de la vigne (végétatif) afin d'étudier les descripteurs ampélographiques de chaque cépage.



# **I.**

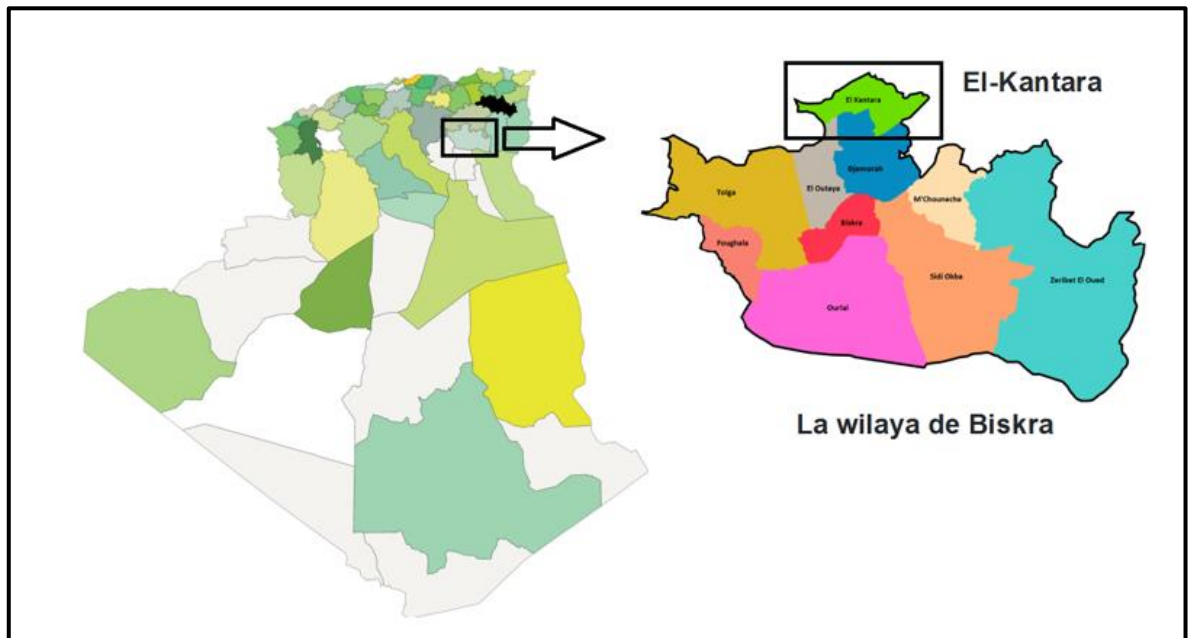
## **Matériels et méthodes**

### I.1. Présentation de la région d'étude

La région examinée dans notre étude, El-Kantara, également connue sous les noms de Kantara ou Gantara qui signifie en arabe le pont, c'est une oasis localisée dans la wilaya de Biskra, à une distance de 50 km au nord de la ville et à ≈60 km à Batna. Sa superficie s'étend sur 238,98 km<sup>2</sup> (la figure 01) (Hamouda et Outtas, 2011).

La commune d'El-Kantara, surnommée la porte du sud ou encore la porte d'or, est une oasis située à 35°15'11,3'' Nord et 05°44'25,5'' Est (Salemkeur et *al.*, 2012). Elle se distingue par une topographie variée, incluant une zone montagneuse au nord d'El Kantara, des terrains intermédiaires, ainsi que des plaines qui se développent progressivement en direction du sud (Achoura et Belhamra, 2010).

Le col d'El-Kantara (il s'appelle aussi la gorge), une étroite faille longitudinale traversant la montagne Metlili, constitue un point de passage naturel entre les chaînes de l'Atlas et l'étendue saharienne. Cette gorge, ouvrant sur le désert, se distingue par ses abondantes palmeraies et symbolise une zone de transition entre deux régions aux caractéristiques climatiques nettement contrastées : le nord tempéré et le sud aride de l'Algérie (Sedira et Mazouz, 2018).



**Figure 01.** Situation géographique d'El-Kantara en Algérie.

(<https://interieur.gov.dz/Monographie/charte.php?lang=fr>)

Le choix de cette région s'est fait en raison de ses particularités climatiques et de sa position géographique. Cette oasis est en effet située sur l'axe le plus important reliant le nord et le sud. Elle se trouve à la croisée des chemins entre les monts des Aurès au nord et le Sahara au sud, ce qui en fait un lieu hautement stratégique et paradoxal à la fois.

Du fait de cette position stratégique, plusieurs civilisations se sont succédé sur ce site : les Phéniciens, les Romains, les Berbères, les Arabes et enfin les colonialistes français. Chacune de ces sociétés a façonné la région à son image et a eu un impact sur le territoire habité, mais aussi sur la biodiversité (Hamouda et Outtas, 2021).

En raison de sa position géographique particulière, la région d'El-Kantara présente un climat semi-aride et instable. Ce climat se caractérise par un hiver froid et été chaud, avec des caractéristiques sahariennes marquées par une saison sèche s'étendant d'avril à octobre (Mechaala et *al.*, 2022).

Une analyse du sol de la région d'El-kanatara révèle une forte teneur en calcaire, associée à une salinité significative, avec un taux de 0,92 g/l (Lahmadi et *al.*, 2013).

Des études géologiques ont révélé que le sol sur les lits des oueds présente généralement une texture équilibrée et une forte teneur en matière organique. En revanche, dans les palmeraies et les périmètres de mise en valeur, les sols présentent une tendance limoneuse et une richesse en éléments nutritifs moindre (Achoura, et Belhamra, 2010).

## I.2. Matériel biologique

### I.2.1. Description du matériel biologique étudié

#### I.2.1.1. L'espèce *Vitis vinifera* L.

La vigne est une plante pérenne qui se manifeste comme une liane, capable de s'adapter à divers environnements et vivant majoritairement en zones intertropicales (Levadoux et *al.*, 1962 ; Galet, 1988). D'après la classification phylogénétique des plantes à fleurs établie par les botanistes du groupe Angiosperm Phylogeny Group (2009) sur la base de l'analyse de séquences d'ADN, elle s'inscrit dans la famille des Vitaceae, qui se situe au sein de la division des Magnoliophyta (aussi appelée Angiospermes), dans le clade des Eudicotylédones supérieures (ou Core eudicots), puis plus précisément dans le clade des Rosidées et finalement dans l'ordre des Vitales (Fodor, 2013).

Cette famille comprend 18 ou 19 genres selon les classifications (Galet, 1988 ; Reynier, 2007 ; Chedid, 2023). Effectivement, on distingue deux sous-genres au sein du genre *Vitis* : *Muscadinia* et *Vitis* (également appelé *Euvitis*). Dont le sous-genre *Vitis* est utilisé en

agriculture car il est le seul à produire des fruits consommables par l'Homme (Galet 1988 ; Lacombe, 2012).

Le sous-genre *Vitis* possède  $2n=38$  chromosomes et comprend environ 80 espèces et se répartissent en trois régions géographiques (Annexe 1) (Lacombe, 2012) :

1) des vignes américaines, originaire d'Amérique du nord et d'Amérique Centrale, parmi lesquelles *V. rupestris*, *V. riparia*, *V. cinerea*, *V. labrusca* et *V. aestivalis* ;

2) les vignes asiatiques notamment l'espèce *Vitis amurensis* qui est utilisée dans les programmes d'amélioration pour sa tolérance au froid (Koleda, 1975) ;

3) les vignes euroasiatiques appartiennent à une seule espèce *Vitis vinifera* L., qui regroupe l'ensemble des cépages cultivés, de cuve et de table appartenant à la sous espèce *Vitis vinifera* subsp. *vinifera*, ainsi que les vignes sauvages de la sous espèce : *Vitis vinifera* subsp. *Sylvestris* (Lacombe, 2012).

L'espèce cultivée *Vitis vinifera* L. regroupe plus de 6000 variétés présentant des caractéristiques morphologiques et ampélographiques très différentes (Chedid, 2023).

### I.2.1.2. Les cépages identifiés en Algérie

En biologie, on appelle un ensemble d'individus possédant le même génome un « clone ». Alors que, le cépage est défini comme un ensemble de clones suffisamment homogènes pour être confondus sous un même nom (Levadoux, 1956 ; Van Leeuwen, 2010). Il faut considérer que les cultivars ou variétés cultivées comme des sous-catégories des cépages (Boursiquot et This, 1999). Par exemple, les variétés telles que le 'Grenache noir', le 'Grenache blanc', le 'Grenache gris' appartiennent toutes au cépage 'Grenache'. En réalité, un grand nombre de cépages ne montrent pas de variations significatives qui influencent fortement la morphologie ou le rendement. Donc, les dénominations cépage/cultivar/variété/cultivée sont souvent assimilées (Lacombe, 2012).

Selon la Base de données internationale VIVC (<http://www.vivc.de>), 23 625 21 accessions de *Vitis vinifera* y étaient référencées en novembre 2022. En Algérie, la production de vignoble a été évaluée à 6,3 millions de quintaux pour la campagne 2020/2021, enregistrant une augmentation de 13,7% comparativement à 2019/2020, principalement en raison d'une hausse des raisins de table, qui constituent plus de 95 % de la production totale de vignes. Alors que, la production des raisins de cuve a continué de diminuer (Annexe 2, 3).

Cependant, quelques études ont été établies sur l'identification des cépages autochtones algériens. Toutefois, les études sur la diversité des cépages algériens sont relativement rares. La plupart de ces études ont été réalisées sur la collection de germoplasme de Skikda (Tableau 01), qui a permis de caractériser certains cultivars autochtones de la partie orientale de l'Algérie. En revanche, il existe peu d'études sur les zones algériennes incontrôlées, telles que la région d'Aurès et les oasis, qui constituent une importante source de richesse en ressources génétiques, notamment les variétés autochtones.

**Tableau 01.** Nombre de cépages existant dans l'Algérie selon diverses sources documentaires.

Référence	Nombre de cépages ou nombre d'accessions
<b>Collections ampélographiques</b>	
La collection ITAFV de M'zej Edchiche (Sékikeda) (Laiadi et <i>al.</i> , 2009)	37 cépages de vigne autochtone
La collection ampélographique ITAFV de Tighennif (Mascara) (Laiadi et <i>al.</i> , 2013)	26 natives variétés de <i>Vitis vinifera</i> L.,
La collection ampélographique ITAFV de M'zej Edchiche (Sékikeda) (Bounab et <i>al.</i> , 2019)	36 variétés de vigne locale cultivées
La collection ITAFV de M'zej Edchiche (Sékikeda) (Khouni et <i>al.</i> , 2023)	14 (génotypes) vignes autochtones algériennes
<b>Recherches sur des régions incontrôlées</b>	
La région «Babar» Nord-est Algérien, (Rahali et <i>al.</i> , 2019)	4 variétés autochtones nouvellement identifiées
La région de Batna Nord-est Algérien, (Yahiaoui et <i>al.</i> , 2024)	8 variétés autochtones nouvellement identifiées

## I.2.2. La prospection et le choix des cultivars

La prospection et le choix des cépages de vigne sont des étapes essentielles pour mieux comprendre la diversité génétique des vignes et sélectionner de nouveaux cultivars. En suivant une méthode rigoureuse pour la sélection des cultivars, nous avons pu bien caractériser la structure génétique du vignoble de la région d'El-Kantara. La prospection a été menée sur trois ans (2020 à 2022) et nous avons exploré diverses régions (forêts de palmiers, maisons anciennes

et vestiges romains). Par la suite, nous avons mené des enquêtes auprès des vignerons pour recenser les cultivars trouvés. Plusieurs critères doivent être pris en compte lors du choix des cultivars de vigne à étudier, comme l'âge de la plante, le nom vernaculaire de la variété, la productivité, la qualité du raisin, la collecte d'informations sur les cépages rares, ainsi que leur accessibilité pour les prélèvements d'échantillons.

Lors de la sélection des variétés et des cépages, nous avons rencontré une difficulté majeure : l'existence de vignes abandonnées qui ne présentent aucune feuille. Une fois les sites sélectionnés, nous avons procédé à la récolte d'échantillons biologiques représentatifs des cultivars étudiés, à partir de feuilles et/ou d'échantillons de cambium du bois (des boutures).

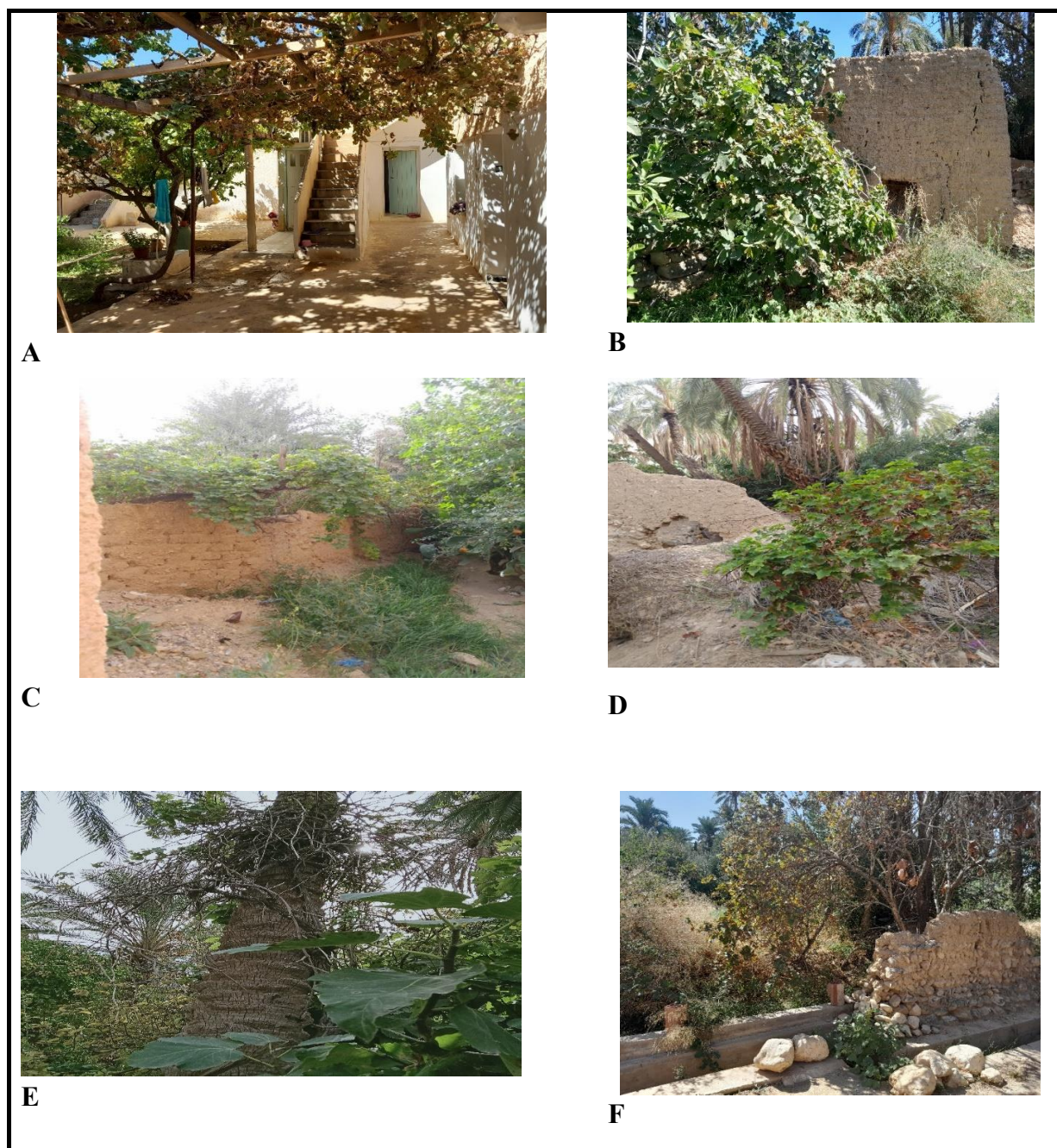
Cinquante-et-un cultivars locaux ont été analysés dans cette étude (Tableau 02). Ces cultivars ont été directement collectés dans quatre sites de la commune d'El-Kantara (Figure 02), lieux-dits : El-Faidhe, El-Ghousse, Bourj El-Ghoula (Greuger) et Dachera, les deux derniers sites étant les plus anciens de cette commune, où il est facile de trouver de vieilles vignes, dont l'âge de ces cultivars est plus de 90 ans. La plupart de ces vignes poussent dans des zones naturelles le long des berges des rivières ou dans les forêts de palmiers. D'autres encore étaient cultivées dans les maisons (Figure 03).



**Figure 02.** Les sites géographiques dans la commune d'El-Kantara où les variétés de raisin ont été prélevées. 1-Dachera, 2- El-Ghousse, 3- Bourj El-Ghoula (Greuger) et 4- El-Faidhe.

(<https://www.google.com/maps>)





**Figures 03.** Vignes poussant à différents endroits de l'oasis. **A et B** : Vignes poussant à l'intérieur d'une ancienne maison traditionnelle d'El-Kantara. **C et D** : vignes grimpant le long du mur de forêt. **E et F** : Vignes grimpant les arbres de palmier et de grenadier.

Les 51 cultivars utilisés dans cette étude ainsi que leur dénomination locale sont présentés dans le tableau (2). Ces cultivars ont été numérotés : D1 à D28, B1 à B12, F1 à F10 et C5. La plupart de ces variétés étaient inconnues et ne portaient pas de dénomination.

**Tableau 02 .** Liste des cultivars étudiés.

Code de cultivars	Nom de cultivars	Couleur de baie	site d'échantillonnage	Signification de nom de cultivar
<b>D1</b>	Anonyme	vert	Maison de CHERIF Kheireddine (le dachra)	/
<b>D2</b>	Datté	Noir	Maison de Messoude Kheireddine (le Dachra)	Dattier (en français)
<b>D3</b>	Anonyme	/	Forêt de rachide meghaber (le Dachera)	/
<b>D4</b>	Muscat	Blanc	Forêt de si Ammar (le Dachera)	Muscat
<b>D5</b>	Anonyme	Blanc	Forêt de rachide bellal (le Dachera)	/
<b>D6</b>	Mestateouile	/	Forêt de rachide bellal (le Dachera)	Longue (en dialecte Algérien)
<b>D7</b>	Seouikiya	/	Forêt d'Abdelhamid KHEIREDDINE (le Dachera)	Le gout sucré (en dialecte commun)
<b>D8</b>	Anonyme	/	Forêt d'Abdelghafour madani (le Dachera)	/
<b>D9</b>	Anonyme	Rouge foncé au noir	Forêt de hmed BELHADJ (le Dachera)	/
<b>D10</b>	Anonyme	Blanc	Forêt de hmed BELHADJ (le Dachera)	/
<b>D11</b>	Anonyme	/	Forêt de Younes (le Dachera)	/
<b>D12</b>	Zitouna	Noir	Maison de NAYELLI Ahmed (le Dachera)	Elle est comme olive noir (en dialecte Algérien)
<b>D13</b>	Anonyme	blanc	Maison de Kheireddine Messoud (le Dachera)	/
<b>D14</b>	Mestateouile	vert	Maison de LALOUI Lazehar (El-ghousse)	Longue (en langage Algérien)
<b>D15</b>	Muscat	Blanc au vert	Maison de LALOUI Lazehar (El-ghousse)	muscat
<b>D16</b>	Datté	Noir	Maison de LALOUI Lazehar (El-ghousse)	Dattier (en français)
<b>D17</b>	Anonyme	Noir	Maison de LALOUI Lazehar (El-ghousse)	/
<b>D18</b>	Chamerakha	Vert	Maison de Kheireddine hamadi (le Dachera)	Grappe de dattes (en dialecte Algérien)
<b>D19</b>	Anonyme	/	Sous le pont de Dachera	/
<b>D20</b>	anonyme	Vert	Maison de BOUAFEYA Redoiane (le Dachera)	/



<b>D21</b>	Kahela ou Aïn Taher	Noir	Maison de Kheireddine Messoud (le Dachera)	Kahela c'est le noir (en dialecte Algérien), et Aïn Taher signifie «baies noires, grandes comme les yeux beaux d'un homme »
<b>D22</b>	Kahela	Noir	Près de piscine de Dachera	Noir (en dialecte Algérien)
<b>D23</b>	Anonyme	/	Près de piscine de Dachera	/
<b>D24</b>	Seouikiya	Blanc	Près de piscine de Dachera	Le gout sucré (en dialecte commun)
<b>D25</b>	Anonyme (de grande grappe)	Blanc	Près de piscine de Dachera	/
<b>D26</b>	Anonyme (de grande grappe)	Noir	Près de piscine de Dachera	/
<b>D27</b>	Anonyme	Noir	Près de piscine de Dachera	/
<b>D28</b>	Anonyme	/	Maison de MENNANI Hameza (le Dachera)	/
<b>B1</b>	Anonyme	/	Forêt de FARADJI « 1 » (Bourj Elghoula)	/
<b>B2</b>	Bayedha	Blanc au vert	Maison de DEJANANE (Bourj Elghoula)	Blanc (en dialecte Algérien)
<b>B3</b>	Anonyme	Noir	Maison de DEJANANE (Bourj Elghoula)	/
<b>B4</b>	Anonyme	Rose au bleu	Forêt de AOUBID nassereddine (Bourj Elghoula)	/
<b>B5</b>	Anonyme	Jaune au rouge	Forêt de FARADJI « 2 » (Bourj Elghoula)	/
<b>B6</b>	Anonyme	Rouge	Maison de BAAJOUJE (Bourj Elghoula)	/
<b>B7</b>	Anonyme	Rouge	Maison de TERIA (Bourj Elghoula)	/
<b>B8</b>	Anonyme	Vert	Maison de HOUFANI « 1 » (Bourj Elghoula)	/
<b>B9</b>	Anonyme	/	Maison de HOUFANI « 2 » (Bourj Elghoula)	/
<b>B10</b>	Kahela	Noir	Maison de Amerat (Bourj Elghoula)	Noir (en dialecte Algérien)
<b>B11</b>	Khadhera	Blanc au Vert	Maison de Amerat (Bourj Elghoula)	Vert (en dialecte Algérien)
<b>B12</b>	Datté	Blanc au vert	(Bourj Elghoula)	Dattier (en français)

<b>C5</b>	Anonyme	Vert	Maison de BOUAFEYA Redoiane (le Dachera)	/
<b>F1</b>	Eldjebel	Blanc au vert	Maison de aoubid abdelaziz (El-faidhe)	La montagne (elle a été retrouvé pour la première fois en montagne)
<b>F2</b>	Anonyme	Vert	Maison de aoubid nassereddine (El-faidhe)	/
<b>F3</b>	Kahela seghira	Noir	Maison de aoubid Abdelkader (El-faidhe)	La petite noire (en dialecte Algérien)
<b>F4</b>	Mestateouile	Blanc au vert	Maison de Aoubid foudhil (El-faidhe)	Langue (en dialecte Algérien)
<b>F5</b>	Kahela	Noir	Maison de Aoubid foudhil (El-faidhe)	Le noir (en dialecte Algérien)
<b>F6</b>	Muscat	Blanc	Maison de ACHOUR Bachir (El-faidhe)	Muscat
<b>F7</b>	Elhamera	rose au Rouge	Maison de aoubid nassereddine (El-faidhe)	Rouge (en dialecte Algérien)
<b>F8</b>	Anonyme	Vert	La gare (El-ghousse)	/
<b>F9</b>	Anonyme	/	Maison de Kheireddine Messoud (El-dachera)	/
<b>F10</b>	Anonyme	/	Maison de meloud aoubid (El-faidhe)	/

### I.3. Méthodes de travail

#### I.3.1. Optimisation de protocole d'extraction d'ADN génomique

##### I.3.1.1. Préparation de l'échantillon

Le matériel végétal utilisé dans cette étude comprend diverses variétés de vigne. Parmi ces variétés, six ont été sélectionnées, dont El-Tamri (T) ou appelée aussi Datté, tandis que les autres restent non identifiées (V1, V2, V3, V4 et V5).

Pour l'extraction de l'ADN génomique, les jeunes feuilles ont été privilégiées, car elles sont fréquemment utilisées dans les études génétiques (Lucas *et al.*, 2019).

Après la collecte des feuilles, celles-ci ont été séchées selon la procédure décrite par Benbouza *et al.* (2006). Cependant, nous avons apporté quelques modifications au protocole. En effet, les feuilles ont été placées dans un four ventilé pendant quatre jours à une température de 27 °C. Ce processus préserve les feuilles en réduisant leur teneur en eau, ce qui ralentit les

processus cataboliques au sein des cellules, diminuant ainsi l'activité catalytique des nucléases et des protéases (Nunes *et al.*, 2011).

Les feuilles sèches ont été broyées dans un mortier sans l'utilisation d'azote liquide. Les échantillons ont ensuite été stockés dans des boîtes stériles contenant du gel de silice à température ambiante. Le gel de silice empêche les échantillons de se réhydrater sous l'effet de l'humidité pendant le stockage (Chase et Hills, 1991).

### I.3.1.2. Protocole d'extraction d'ADN génomique

Dans cette étude, nous avons adopté le protocole décrit par Piccolo *et al.* (2012) comme référence pour l'extraction de l'ADN génomique des feuilles de vigne. Ce protocole est basé sur la méthode de Doyle et Doyle (1987) et utilise la méthode CTAB/chloroforme-alcool isoamylique pour l'extraction liquide-liquide. Ce protocole a utilisé de l'azote liquide pour préparer la poudre de feuilles, puis les conserver à basse température. Les différentes étapes de protocole Piccolo *et al.* (2012) sont :

1. 200 à 300 mg de la poudre des feuilles (congelée à -80 °C) ont été mis dans un tube Eppendorf de 1,5 ml ;
2. 700 µl de tampon de lyse ont été ajoutés, dont la température doit être comprise entre 60 et 65 °C. Il est constitué de 2 % CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA (pH 8,0), 2,5 M NaCl, 2 % PVP et 1 % β-mercaptoéthanol ;
3. l'incubation a été effectuée à 65 °C pendant 60 minutes au bain-marie, en mélangeant par inversion 3 à 4 fois ;
4. les tubes ont été centrifugés à 10 000 rpm/min pendant 10 minutes à 4 °C, puis la phase aqueuse a été transférée doucement dans un nouveau tube ;
5. un volume égal de chloroforme : alcool isoamylique (24:1) a été ajouté ;
6. les tubes ont été centrifugés à 10 000 rpm/min pendant 10 minutes à 4 °C, puis la phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube ;
7. un volume égal d'isopropanol froid (-20 °C) a été ajouté, puis l'incubation a été faite à cette température pendant 30 minutes ;
8. les tubes ont été centrifugés à 14 000 rpm/min pendant 10 min à 4 °C, puis le surnageant obtenu a été éliminé ;

9. le culot d'ADN a été lavé avec 500 µl d'éthanol à 70 % froid (-20 °C), puis centrifugé à 14000 rpm/min pendant 5 min à 4 °C ;

10. le culot d'ADN obtenu a été séché à l'air, puis dissous dans 200 µl de tampon TE (Tris, EDTA). La RNase A a été ajoutée à chaque échantillon (1/100 µl d'échantillon d'ADN) puis l'incubation a été réalisée à 37 °C pendant 1 h ;

11. Enfin, les échantillons ont été conservés à -20 °C.

Dans le cadre de nos recherches, nous avons procédé à l'optimisation de plusieurs étapes du protocole d'extraction de l'ADN. Cette démarche a permis de mettre en œuvre une méthode d'extraction relativement simple, peu coûteuse et de haute qualité, adaptée aux équipements et aux ressources de notre laboratoire. Les paramètres testés pour optimiser ce protocole par rapport à celui de Piccolo et al. (2012) sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 03.** Paramètres optimisés pour le protocole proposé par Piccolo et *al.* (2012).

N° de l'étape	Le protocole original (Piccolo et al., 2012).	Les modifications
<b>Préparation des échantillons (1)</b>	200-300 mg de poudre de feuille congelée à -80°C.	100 mg de poudre de feuilles séchées et conservées à température ambiante en présence de gel de silice.
<b>L'étape de lavage</b>	Aucun lavage n'a été effectué.	Lavage par une solution à base de sorbitol (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.35 M Sorbitol, 5 mM EDTA (pH 8.0), 1% PVP, 1% β-ME), laver 1 à 3 fois (Inglis et al., 2018; Lucas et al., 2019).
<b>Tampon de lyse (2)</b>	700 µl de tampon de lyse.	1 ml de tampon de lyse.
	2% CTAB.	3% CTAB avec l'ajout de 0.5% Tween 20 (Xin et al., 2003).
	25 mM EDTA (pH 8,0).	50 mM EDTA (pH 8,0).
	2,5 M NaCl.	2,7M NaCl.
	/	Ajout de 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) (Varma et al., 2007) Et 2 M LiCl (Pirttilä et al., 2001).
<b>La lyse (3)</b>	Incubation à 65 °C pendant 60 minutes dans un bain-marie,	Incubation à 58 °C pendant 60 minutes dans un bain-marie, en agitant continuellement.

	avec agitation 3 à 4 fois pendant l'incubation.	
<b>La purification (5)</b>	Lavage unique au chloroforme : alcool isoamylique (24:1).	Laver deux fois avec du chloroforme et de l'alcool isoamylique (24:1) (Demeke et Jenkins, 2010).
<b>La précipitation d'ADN (7)</b>	Ajouter l'isopropanol froid, mélanger les tubes et incuber à (-20 °C) pendant 30 minutes.	Incubation à -20°C pendant la nuit (Scaldaferri et <i>al.</i> , 2013).
<b>Resuspendre l'ADN</b>	200 µl de tampon TE	60 µl l'eau bidistillée stérile.

Le tampon de lavage à base de sorbitol a été préparé la veille de l'expérience et conservé à une température de +4 °C. Après l'ajout du tampon de lavage, les tubes ont été centrifugés. Le surnageant obtenu a présenté des teintes variant du brun clair au vert clair. Malgré la répétition de l'étape de lavage à deux reprises, une coloration verdâtre persistait dans l'ensemble des échantillons. Cependant, après un troisième lavage, le surnageant obtenu présentait une teinte jaune clair, indiquant une élimination efficace des contaminants.

Le protocole après l'optimisation est comme suit :

1. mettre 100 mg de poudre de feuilles séchées dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant 1 ml de tampon de lavage (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,35 M sorbitol, 5 mM EDTA (pH 8,0), 1 % PVP et 1 %  $\beta$ -mercaptoéthanol) ;
2. vortexer les tubes pendant 5 secondes ;
3. centrifuger les tubes à 8000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante et jeter le surnageant ;
4. si nécessaire, répéter le lavage jusqu'à ce que le surnageant soit clair ;
5. ajouter 1 ml de tampon de lyse préchauffé (60-65°C) composé de 3% de CTAB, 2% de PVP, 100 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM d'EDTA (pH 8.0), 2,7 M de NaCl, 2 M de LiCl, 3 µl de protéinase K (20 mg/ml), 1% de  $\beta$ -mercaptoéthanol, et 0,5% de Tween 20 ;
6. mélanger les tubes par inversion pour obtenir une préparation homogène, puis incuber à 58°C pendant 60 minutes dans un bain-marie avec agitation horizontale continue ;
7. centrifuger les tubes à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, et transférer délicatement la phase aqueuse dans un nouveau tube ;

8. ajouter un volume égal de chloroforme : alcool isoamylique (24:1) et mélanger par inversion pendant 5 minutes ;
9. centrifuger les tubes à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C et transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube ;
10. effectuer un second lavage avec un volume égal de chloroforme : alcool isoamylique (24:1). Mélanger par inversion pendant 5 minutes ;
11. centrifuger les tubes à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C et transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube ;
12. ajouter un volume égal d'isopropanol froid (-20°C) pour précipiter l'ADN, mélanger doucement les échantillons pendant quelques minutes et incubé à -20°C pendant la nuit ;
13. centrifuger l'ADN précipité à 14 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C et jeter le surnageant ;
14. laver le culot d'ADN avec 500 µl d'éthanol froid à 70% (-20°C), et centrifuger les tubes à 14 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C ;
15. sécher à l'air le culot d'ADN résultant pendant 15 minutes et le dissoudre dans 60 µl d'eau bidistillée stérile ;
16. conserver l'ADN extrait à -20°C.

### I.3.1.3. Vérification la qualité et la quantité d'ADN extrait

#### A. Evaluation de l'intégrité d'ADN extrait

L'intégrité et la présence de l'ADN extrait ont été vérifiées par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 %. Cette méthode repose sur la coloration de l'ADN à l'aide du BET, un colorant qui s'intercale entre les bases de la double hélice et devient fluorescent lorsqu'il est exposé aux rayons ultraviolets. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la taille du fragment d'ADN, les fragments plus longs émettant une fluorescence plus intense.

Pour réaliser une migration sur gel d'agarose, un gel à 1 % est préparé en dissolvant 1 g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE 1X (voir annexe 4), puis la solution d'agarose est bouillie. On ajoute ensuite 2 µl de BET à cette solution. Le gel est versé dans un moule et un

peigne adapté y est inséré. Après refroidissement et solidification du gel, le peigne est retiré, formant ainsi des puits pour le dépôt des échantillons.

Dans un tube, on mélange 8 µl d'échantillon avec 3 µl de colorant de chargement (voir annexe 4), puis les échantillons sont délicatement déposés dans les puits, en notant leur ordre. Le gel est placé dans la cuve, en veillant à ce qu'il soit entièrement recouvert de tampon TAE 1X. Enfin, les fils sont connectés et le générateur de puissance est mis sous tension à 100 V pendant 30 minutes.

### B. Détermination de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait

La concentration et la pureté ont ensuite été déterminées par spectrophotométrie. Après une lecture au spectrophotomètre, une absorbance de 1,0 unité à 260 nm, elle correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin.

La concentration d'ADN pour un échantillon pur dilué 1/50 est égale à :

$$[\text{ADN}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times 50 \text{ (facteur de dilution)}$$

Calcul de la masse à partir de la concentration :

Masse d'ADN :  $C = m/v$

C : concentration d'ADN en ( µg/ml ) .

m : masse de l'ADN en ( µg ).

v : volume de l'eau bidistillé utilisée pour resuspendre l'ADN en ( ml ).

Donc :  $m = C.v$

Alors que, le rendement a été calculé comme le rapport entre la quantité d'ADN obtenue et la masse initiale utilisée (Bienvenu et *al.*, 1999).

La pureté de l'ADN est déterminée par deux ratios :  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  et  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ . Si le ratio  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  est inférieur à 2,0, cela indique que l'ADN extrait est contaminé par des ARN. En revanche, si le ratio est compris entre 1,8 et 2,0, l'ADN est considéré comme pur. Toutefois, si le ratio est supérieur à 2,0, cela suggère une contamination par des protéines ou des substances aromatiques (Brodeur et Toussaint, 2007 ; Denis et *al.*, 2018).

Concernant le ratio A260nm/A230nm. Si le ratio est supérieur à 1,8, cela indique une bonne pureté des acides nucléiques. Alors que, le ratio est inférieur à 1,8, cela peut être dû à une contamination par des polysaccharides, des polyphénols, du phénol ou des sels (Varma et *al.*, 2007 ; Denis et *al.*, 2018).

### I.3.1.4. Coût de méthode d'extraction

Le coût total de l'extraction pour 100 mg d'échantillon a été estimé en calculant la somme des prix de la quantité de chaque produit utilisé pour un échantillon de 100 mg. Le coût par extraction a été comparé à celui d'un kit GenElute™-E Single Spin Plant DNA (SIGMA).

## I.3.2. Identification génotypique des cépages étudiés

### I.3.2.1. La structure génétique

L'étude de la structure génétique s'attache à appréhender l'organisation et la distribution de la diversité génétique au sein d'une population ou entre plusieurs populations. Elle utilise des marqueurs génétiques (tels que les microsatellites, les SNP) afin d'évaluer la répartition des allèles au sein des populations et entre les populations. En ce qui concerne la caractérisation moléculaire proprement dite, diverses techniques peuvent être employées, telles que l'analyse de l'ADN à l'aide de marqueurs moléculaires comme les microsatellites (SSR), les SNP ou l'AFLP, qui permettent de mesurer la diversité génétique et de différencier les cultivars (Sefc, et *al.*, 2009 ; Riaz, et *al.*, 2010). De plus, l'utilisation de marqueurs phylogénétiques permet de reconstruire les relations évolutives entre les cultivars. Les données générées par ces analyses doivent ensuite être traitées à l'aide de logiciels bioinformatiques et comparées à des bases de données existantes comme le *Vitis International Variety Catalogue (VIVC)*, pour identifier les polymorphismes génétiques et établir des conclusions sur la diversité des cultivars étudiés (Laiadi et *al.*, 2009; Zombardo et *al.*, 2021)..

Dans cette étude, nous avons appliqué les marqueurs SSR pour faire la caractérisation moléculaire des variétés étudiés. Les marqueurs microsatellites (SSR) sont devenus des outils de référence pour l'identification des génotypes et l'évaluation de la diversité génétique des cépages. Ces marqueurs permettent de détecter des variations génétiques fines, d'établir des relations phylogénétiques et de retracer les flux génétiques entre populations (Emanuelli, et *al.*, 2013 ; Rahali et *al.*, 2019 ; Khouni et *al.*, 2023).



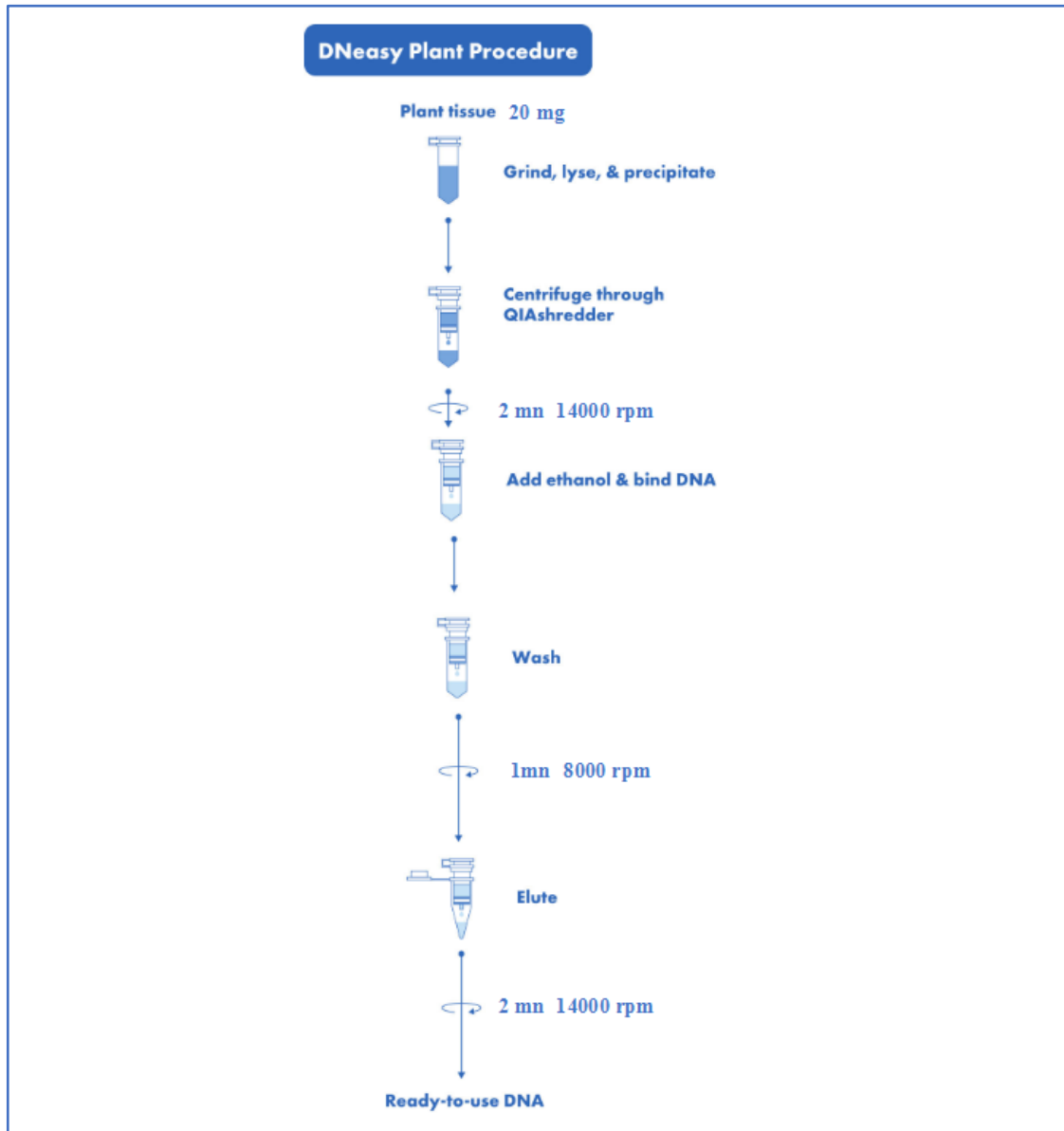
### **I.3.2.2. Extraction de l'ADN génomique**

Pour la caractérisation moléculaire des vignes étudiées, nous avons prélevé des échantillons de jeunes feuilles et extrait l'ADN génomique comme nous l'avons décrit dans la partie précédente. Dans le cas des vieilles vignes abandonnées, il n'y a pas de feuilles, c'est pourquoi nous avons prélevé du cambium du bois d'une seule plante de chaque cultivar, avec répétition en cas d'incohérence avec des études antérieures. Les échantillons ainsi collectés ont été envoyés au laboratoire du centre de recherche pour la viticulture et l'œnologie (CREA) en Italie, afin d'y être analysés génétiquement par des microsatellites, dans le but de déterminer l'identification moléculaire des cépages.

Les échantillons de cambium du bois ont été lyophilisés, puis broyés en poudre fine à l'aide d'un instrument nommé Tissue-Lyser II (Qiagen, Hilden, Allemagne). L'ADN a été extrait de 20 mg de poudre à l'aide d'un kit Qiagen DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) (Figure 04), en suivant le protocole du fabricant :

1. suspendre 20 mg de tissu lyophilisé dans 400 µl de tampon AP1, ajouter 4 µl de RNaseA ;
2. incubé pendant 10 min au bain marie à 65 °C avec agitation continuée ;
3. ajouter 130 µl de tampon P3 tout en mélangeant puis incubé dans la glace pendant 5 minutes ;
4. centrifuger le lysat à 14000 rpm pendant 5 min ;
5. récupérer le surnageant et déplacer dans la colonne (QIAshredder Mini spin column) puis centrifuger 2 min à 14000 rpm ;
6. ajouter 1,5 volume de tampon AW1 au lysat et mélanger immédiatement par pipetage ;
7. transférer 650 µl du mélange dans la mini colonne (DNeasy Mini Spin Column) et Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute ;
8. transférer la mini colonne (DNeasy Mini Spin Column) dans un nouveau microtube de 2 ml et ajouter 500 µl de tampon AW2 ;
9. centrifuger pendant 1 min à 8000 rpm puis répéter la centrifugation pendant 2 min à 14000 rpm ;
10. placer la mini colonne (DNeasy Mini Spin Column) dans un nouveau microtube de 2 ml ;

11. ajouter 100 µl de tampon AE pour élution, puis incubé à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 5 min, ensuite centrifuger pendant 1 min à 8000 rpm, cette étape est répétée dans le même tube ;
12. l'ADN pur est ensuite élué dans de l'eau ou un tampon à faible teneur en sel, prêt à être utilisé.



**Figure 04.** Schéma représentatif de procédure d'extraction d'ADN en utilisant DNeasy Plant Kits.

### A. Vérification de la quantité et la qualité d'ADN extrait

La qualité de l'ADN extrait a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, et la concentration et la pureté de l'ADN ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis).

### I.3.2.3. Caractérisation génétique par la PCR-SSR

Les marqueurs microsatellites (loci), également connus sous le nom de répétitions en tandem courtes (STR), sont des loci d'ADN polymorphes constituées d'une séquence nucléotidique répétée. Les marqueurs microsatellites nucléaires (nSSR) ont été largement étudiés dans le compartiment cultivé de *V. vinifera* du fait de leur niveau de polymorphisme approprié aux analyses de la variabilité inter-variétale (Sefc et al., 2009). Depuis les années 1990, de nombreuses recherches utilisant les nSSR ont abouti à des progrès significatifs dans l'identification des cépages et ont également permis une meilleure compréhension de la structuration de leur diversité génétique (This et al., 2006 ; Sefc et al., 2009).

Pour caractériser les cultivars étudiés, douze loci SSR ont été utilisés (Tableau 04). Les marqueurs SSR présentent chacun un polymorphisme élevé, ont été utilisés par le consortium européen GrapeGen06 ([http : //www1.montpellier.inra.fr/grapegen06/ accueil.php](http://www1.montpellier.inra.fr/grapegen06/accueil.php)) et ont été fréquemment utilisés pour identifier les cultivars étudiés par la comparaison des données de génotypage obtenues à partir de génotypes publiés ou de bases de données publiques (This et al., 2004 ; Zinelabidine et al., 2010 ; Mihaljevic et al., 2013 ; Li et al., 2017 ). Neuf de ces loci (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79) avaient été précédemment choisis comme marqueurs de base pour le génotypage des collections de vigne dans le cadre du projet de recherche européen Grapegen06 (This et al., 2004). On y ajoutera les trois marqueurs SSR suivants : VMC6E1 (ISV2), VMC6G1 (ISV4) et VMCNG4b9 (EVA2) (*Vitis* Microsatellite Consortium) (Migliaro et al., 2013).

**Tableau 04.** Amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification par PCR de différents microsatellites SSR étudiés.

Nom de SSR	Localisation du chromosome	Séquences d'amorces sens et anti-sens marquées (5'-3')	Référence
VVS2	11	F : CAG CCC GTA AAT GTA TCCATC R : AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG	Thomas et <i>al.</i> , (1993)
VVMD7	7	F : AGAGTTGCGGAGAACAGGAT R : CGAACCTTCACACGCTTGAT	Bowers et <i>al.</i> , (1996)
VMC6E1	14	F : CAC TGG CCT GTT GGG AGATAAT R : CCT TCA ACT GGA AAA GCCTGT C	Migliaro et <i>al.</i> , (2013)
VrZAG62	7	F : GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC R : CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	Sefc et <i>al.</i> , (1999)
VrZAG79	5	F : AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG R : TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC	
VVMD28	3	F : AACAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGAGA R : TCATCAATTTTCGTATCTCTATTTGCTG	Bowers et <i>al.</i> , (1999)
VVMD27	5	F : GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT R : ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	
VVMD25	11	F : TTCCGTTAAAGCAAAAGAAAAAGG R : TTGGATTTGAAATTTATTGAGGGG	
VVMD5	16	F : CTAGAGCTACGCCAATCCAA R : TATACCAAAAATCATATTCCTAAA	Bowers et <i>al.</i> , (1996)
VMCNG 4b9	6	F : CTGGGGAGCATATACACATACCAG R : CTCTCTCTTCCCGATAGCCACC	Migliaro et <i>al.</i> , (2013)
VVMD32	4	F : TATGATTTTTTAGGGGGGTGAGG R : GGAAAGATGGGATGACTCGC	Bowers et <i>al.</i> , (1999)
VMC6G1	11	F : TGC ATA GTG CTG TAG GCCATTG R : TCT GTC ATT GCT GTC CCT TTCA	Migliaro et <i>al.</i> , (2013)

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume total de 20 µl. Le mélange réactionnel contient 10 ng d'ADN génomique, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de chaque dNTP, 0.11 à 0.48 µM de cocktail des amorces, 1x tampon de réaction fourni avec l'enzyme 1.5 U/µl Taq ADN Polymerase (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA). Chaque région d'ADN a été repérée grâce à une molécule fluorescente intégrée dans l'amorce sens (6-FAM, PET, VIC, ou NED, Applied Biosystems Inc) (Tableau 05).

**Tableau 05.** Des informations sur les amorces des loci microsatellites utilisés dans cette étude, y compris le nom du marqueur, la concentration des amorces et la taille de l'allèle obtenue.

SSR	Étiquetage	Concentration d'amorce (μM)	Taille de l'allèle (bp)	Référence
VVS2	6-FAM	0,20	123-165	This <i>et al.</i> , (2004)
VVMD7	6-FAM	0,20	231-267	
VMC6E1	VIC	0,14	122-175	Crespan, (2003)
VrZAG62	VIC	0,11	173-219	This <i>et al.</i> , (2004)
VrZAG79	NED	0,11	236-270	
VVMD28	PET	0,24	216-285	Bowers <i>et al.</i> , (1999)
VVMD27	6-FAM	0,20	175-223	This <i>et al.</i> , (2004)
VVMD25	6-FAM	0,16	229-275	Bowers <i>et al.</i> , (1999)
VVMD5	VIC	0,48	220-268	This <i>et al.</i> , (2004)
VMCNG4b9	NED	0,14	138-188	Welter <i>et al.</i> (2007)
VVMD32	NED	0,30	216- 290	Bowers <i>et al.</i> , (1999)
VMC6G1	PET	0,14	169-197	Crespan, (2003)

Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un mix de 20 μl contenant :

- ✓ 10 ng d'ADN génomique ;
- ✓ 0.2 mM cocktail des amorces ;
- ✓ 0.2 mM de chaque dNTPs ;
- ✓ 1.5 U de *Taq* polymérase (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) ;
- ✓ 1x de tampon de PCR ;
- ✓ 2 mM de MgCl<sub>2</sub> ;
- ✓ qsp 20 μl de H<sub>2</sub>O bidistillée.

Les amplifications ont été effectuées dans des thermocycleurs (modèle GeneAmp 9700 PCR System). L'amplification de plusieurs produits dans une seule réaction PCR. Le programme d'amplification par PCR multiplexe est présenté dans le tableau (06).

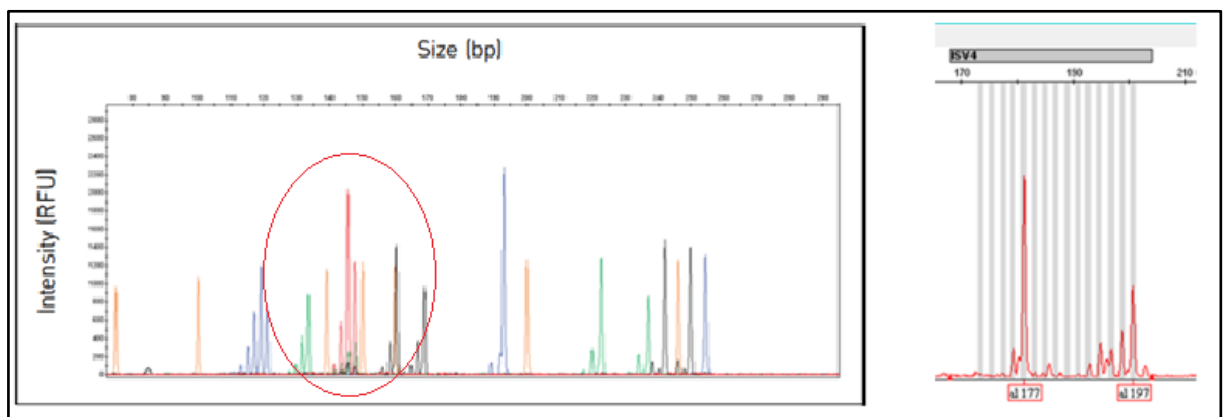
**Tableau 06.** Programme d'amplification par PCR des séquences cibles contenant les loci étudiés.

Phases du programme	Température (C°)	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	95°C	5 minutes	
Dénaturation	95°C	45 secondes	30 cycles
Hybridation	55°C	1 minute	
Extension	72 °C	30 secondes	
Extension finale	72 °C	30 minutes	

#### I.3.2.4. Analyse des produits de PCR

Les produits de PCR (0,5 µl) ont été mélangés avec 9,35 µl de formamide et 0,15 µl de standard GeneScan™ 500 LIZ® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) qui a été utilisé comme étalon interne pour déterminer les tailles des fragments d'ADN amplifiés.

Les fragments amplifiés ont été séparés par électrophorèse capillaire et l'analyse de la fluorescence avec un analyseur génétique ABI 3130xl (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Les fragments marqués ont été déterminés et classés à l'aide du logiciel GeneMapper 4.0 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). La taille des allèles a été enregistrée en pb et les génotypes présentant un seul pic à un locus donné, ont été considérés comme homozygotes (Figure 05).



**Figure 05.** Exemples d'électrophorégrammes avec des pics colorés représentant des allèles SSR. Dont les pics orange sont les pics de taille standard.

### I.3.2.5. Analyse bio-informatique

#### I.3.2.5.1. Détermination des synonymes

Les profils génétiques obtenus ont été comparés par l'utilisation de logiciel « Identity 1.0 » software (Wagner et Sefc, 1999), afin de vérifier les synonymes. IDENTITY 1.0 est un outil basé sur une chaîne de commande, qui comprend un certain nombre des analyses statistiques.

Le programme a été écrit pour analyser les données microsatellites obtenues au cours d'une étude des cultivars de vigne. Parmi ces analyses, les recherches de génotypes identiques (synonymes) (Wagner et Sefc, 1999).

#### Format du fichier d'entrée

L'identité utilise des fichiers délimités par des virgules comme format de fichier d'entrée. Les fichiers de ce format peuvent être facilement créés en enregistrant les données de votre programme de feuille de calcul préféré (par exemple MS Excel) au format csv. Les deux premières colonnes du fichier d'entrée contiennent l'identifiant de l'échantillon, suivi des données microsatellites en paires de bases (deux colonnes par locus). La première colonne doit contenir des nombres. La deuxième colonne peut contenir soit des nombres, soit des chaînes de caractères, soit des combinaisons des deux.

**Tableau 07.** Exemple de format de fichier d'entrée dans Microsoft Excel.

No	Cultivar	Locus1	Locus1	Locus2	Locus2
1	Grüner Veltliner	228	230	134	154
2	Cultivar 101	224	224	122	137
2	144			138	138

Il est enregistré au format csv, il se présente comme suit :

No, Cultivar, Locus1, Locus1, Locus2, Locus2

1, Grüner Veltliner, 228, 230, 134, 154

2, Cultivar 101, 224, 224, 122, 137

2, 144,,, 138, 138

Après cette étape, on peut exécuter le programme qui va lancer à partir de Windows DOS. IDENTITY génère des différents fichiers, parmi eux Filename.syn qui contient la liste

d'échantillons des géotypes identiques. Les nombres entre parenthèses sont ceux de la première colonne de votre fichier d'entrée.

### I.3.2.5.2. Analyse d'identification (géotypage)

Les identités des échantillons étudiés ont été vérifiées en comparant les profils génétiques des microsatellites avec ceux provenant des bases de données suivantes :

- CREA (Centre de recherche sur la viticulture et l'oenologie) contenant environ 6000 profils uniques et qui est constamment mise à jour (partiellement publiée dans le Italian Grapevine Catalogue, <http://catalogoviti.politicheagricole.it>);
- la base de données internationale publique *VIVC*, Catalogue international des variétés *Vitis*, ( <http://www.vivc.de/>);
- et par comparaison avec les géotypes SSR des cépages publiés dans la littérature.

Les géotypes non associés à un cultivar connu dans la base de données CREA et cépages publiés dans la littérature, ils ont été comparés à la base de données *VIVC* en utilisant 'Cabernet-Sauvignon', 'Chardonnay', 'Muscat à petits grains blancs' et 'Pinot noir' comme cultivars de référence pour harmoniser la taille des allèles SSR et comparer les profils génétiques obtenus avec les profils publiés. Lorsqu'aucune correspondance n'a été trouvée dans l'une ou l'autre des bases de données de *Vitis*, les profils ont été considérés comme « non identifiés ».

### I.3.2.6. Analyse statistique des données géotypiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des logiciels suivants :

- Le logiciel Cervus 3.0 software (Kalinowski et *al.*, 2007) ;
- Le logiciel GenAlEx 6.5 software (Peakall et Smouse, 2006).

#### I.3.2.6.1. Diversité génétique

Le logiciel Cervus 3.0 software (Kalinowski et *al.*, 2007) a été utilisé pour effectuer des recherches de parenté lorsque les géniteurs sont inconnus (Lacombe *et al.*, 2013). Les paramètres de diversité génétiques ont été calculés pour les 51 cépages étudiés sur 12 loci SSR. Ces paramètres génétiques ont été estimés à l'aide de le logiciel GenAlEx 6.5 software (Peakall et Smouse, 2006) qui a été utilisé pour calculer les paramètres suivant : nombre d'allèles différents (*No* allèles), le nombre moyen d'allèles effectifs (*Ne* allèles), les valeurs



d'hétérozygotie attendue ( $H_e$ ) et observée ( $H_o$ ), la fréquence de l'allèle nul ( $F_{nul}$ ), Indice de fixation ( $F_{is}$ ), Probabilité d'identité ( $PI$ ), Indice d'information de Shannon ( $I$ ) et Hardy–Weinberg equilibrium ( $HW$ ).

#### **A. Nombre d'allèles différents ( $N_o$ ) et effectifs ( $N_e$ )**

Le  $N_o$  fait référence au nombre d'allèles différents présents dans la population pour chaque locus. Un nombre plus élevé d'allèles indique une plus grande diversité génétique à ce locus. S'il y a une large gamme d'allèles pour chaque locus, cela suggère que la population est génétiquement diversifiée et offre une plus grande résistance aux maladies et aux changements environnementaux. Alors que, le nombre effectif d'allèles ( $N_e$ ) est une mesure de la diversité génétique, prenant en compte non seulement le nombre d'allèles, mais aussi leur fréquence. Un  $N_e$  faible (proche de 1) suggère que la population est dominée par quelques allèles, ce qui peut signaler un manque de diversité génétique. En revanche, un  $N_e$  élevé indique une meilleure diversité génétique et une population plus hétérogène.

#### **B. Hétérozygotie observée ( $H_o$ ) et hétérozygotie attendue ( $H_e$ )**

L'hétérozygotie observée (nombre d'individus hétérozygotes dans un locus donné) a été comparé avec l'hétérozygotie attendue (selon Hardy-Weinberg). Si les valeurs observées sont nettement inférieures aux attendues, cela peut indiquer une consanguinité ou une déviation de l'équilibre Hardy-Weinberg. Lorsque l'hétérozygotie observée dépasse l'hétérozygotie attendue, cela suggère une grande diversité génétique au sein de cette population, caractérisée par un taux élevé de polymorphisme (Khouni, 2023).

#### **C. Les indices de la diversité génétique**

Les indices ( $I$ ,  $PI$ ,  $F_{is}$  et  $HW$ ) sont souvent utilisés pour évaluer la diversité génétique dans les populations. Dont, l'Indice de Shannon ( $I$ ) mesure la diversité en prenant en compte à la fois la richesse des allèles (nombre d'allèles différents) et leur abondance relative. Un  $I$  plus élevé indique une plus grande diversité génétique (Peakall et Smouse, 2006).

Alors que, la probabilité d'identité ( $PI$ ) indique la probabilité que deux individus tirés au hasard dans la population aient un profil génétique identique. Une  $PI$  faible est souhaitable, car cela indique qu'il est peu probable que deux individus aient le même profil génétique, ce qui est

un signe de haute diversité génétique. Si la PI est élevée, cela pourrait suggérer une faible diversité génétique et un risque de clonage ou d'auto-fécondation accrue dans la population.

Le coefficient de fixation ou coefficients d'autofécondation de Wright ( $F_{is}$ ) mesure la tendance à la consanguinité au sein de la population. Dont, Une valeur positive de  $F_{is}$  indique un déficit d'hétérozygotes par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg, cela pourrait indiquer que la population présente une certaine forme de structure ou de consanguinité, ce qui pourrait être lié à des pratiques de sélection ou à des stratégies de reproduction asexuée. Alors que, si  $F_{is}$  est proche de zéro ou légèrement négatif, cela suggère une population plus génétiquement diverse et mieux mélangée (Lacombe, 2012).

Concernant le test de Hardy-Weinberg a été fait pour évaluer si la fréquence des allèles dans la population suit l'équilibre génétique attendu (This et *al.*, 2001). Si un locus est en équilibre de Hardy-Weinberg, cela suggère que la population est bien mélangée, qu'il n'y a pas de sélection ou de dérive génétique marquée, et qu'il n'y a pas de fortes restrictions à la reproduction (comme la consanguinité ou le clonage). Alors que, le locus est en déséquilibre de Hardy-Weinberg, cela pourrait indiquer une consanguinité, des effets de sélection, ou une déviation causée par une reproduction asexuée ou un biais dans les pratiques agricoles (par exemple, clonage des cultivars).

Donc, on peut dire que la diversité élevée :

- ✓ si nous avons trouvé des valeurs élevées pour le nombre d'allèles ( $N_o$ ), le nombre effectif d'allèles ( $N_e$ ), l'hétérozygotie observée ( $H_o$ ), l'indice de Shannon ( $I$ ), et une faible probabilité d'identité ( $PI$ ), cela indique que la population de nos cultivars est génétiquement diversifiée.
- ✓ cela pourrait suggérer une grande variabilité génétique parmi les cultivars, ce qui est souvent un signe positif, car cela peut améliorer la résistance aux maladies et l'adaptabilité environnementale.

Alors que, la diversité faible :

- ✓ si les valeurs de  $H_o$  sont significativement plus faibles que les valeurs de  $H_e$ , cela pourrait signaler un déséquilibre de Hardy-Weinberg et une faible diversité génétique, potentiellement due à un clonage, une reproduction asexuée ou une consanguinité.

- ✓ un Fis positif et significatif pourrait également indiquer des pratiques de culture qui favorisent la consanguinité ou la clonabilité des cultivars, ce qui pourrait être préoccupant si la population est à risque de perte de diversité génétique.

### I.3.2.7. Analyse phylogénétique

Le dendrogramme basé sur la matrice de distance a été construit en utilisant la méthode de neighbour-joining par Populations v. 1.2.30 (<http://bioinformatics.org>, Langella, unpubl.) (Saitou et Nei, 1987), tandis que le logiciel Mega5.2 a été utilisé pour l'afficher (Tamura *et al.*, 2011).

### I.3.3. Caractérisation ampélographique des nouvelles variétés identifiées

L'étude a porté sur la caractérisation ampélographique des feuilles matures de variétés de vigne nouvellement identifiées et récoltées dans la région d'El-Kantara. Des échantillons de feuilles ont été prélevés sur des vignes à pleine maturité pendant la saison de croissance pendant deux années consécutives (2021-2022), en suivant la méthodologie décrite par les descripteurs de l'Organisation Internationale de la Vigne et du vin (OIV, 2009) pour les variétés de vigne.

Les échantillons ont été prélevés sur des feuilles saines situées dans la partie tierce médiane de plusieurs rameaux (entre les nœuds numéro 8 à 12, le comptage se fait de bas en haut), en veillant à ce que la morphologie de la feuille soit entièrement développée (Martinez et Grenan, 1999).

Le choix des feuilles situées entre le 8<sup>ème</sup> ou 9<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> nœud présente une grande similitude, ce qui justifie leur comparaison (Ravaz, 1902 ; Bodor *et al.*, 2023).

#### I.3.3.1. Analyse ampélographique

Pour chaque génotype, on a collecté un total de onze feuilles entre les stades phénologiques de la nouaison et de la véraison. Ces échantillons provenaient de vignes cultivées dans des vignobles soumis aux conditions climatiques typiques de la région d'El-Kantara. En effet, les répétitions contribuent à rehausser le niveau de signification de nos mesures.

Toutefois, diverses recherches ont constaté qu'une série de onze répétitions suffisait pour mener une étude approfondie sur le cépage (Martinez et Mantilla 1993 ; Laiadi et *al.*, 2013).

La caractérisation ampélographique a été réalisée conformément aux descripteurs définis par l'OIV (OIV, 2009). Le système de codification de l'OIV constitue un outil essentiel pour la description morphologique des variétés de vigne et des nouvelles obtentions. Ce système offre un langage universel et standardisé, adopté par les ampélographes et chercheurs du monde entier pour garantir l'uniformité et la reproductibilité des études (Kerridge et Antchiff, 1999 ; Ben Sliman Harbi, 2003). Le code OIV comprend un total de 147 descripteurs spécifiques, chacun étant identifié par un code numérique unique allant de 001 à 806 (OIV, 2009). Ces descripteurs couvrent une large gamme de caractéristiques morphologiques, phénologiques et agronomiques, telles que la forme des feuilles, la taille des baies, la période de floraison, et bien d'autres.

Les descripteurs OIV sont largement utilisés pour la caractérisation ampélographique, permettant une identification efficace des variétés, une analyse de la diversité génétique et la distinction entre les cultivars. Ce système est également crucial dans le cadre des programmes de sélection variétale et de conservation du germoplasme, où il sert à identifier les traits agronomiques souhaitables et à documenter les ressources génétiques disponibles.

Dans cette étude, l'accent est mis sur les traits morphologiques des feuilles. Pour chaque feuille, 17 caractères quantitatifs et 18 caractères qualitatifs ont été mesurés ou observés (Tableau 08). Ces caractères incluaient les descripteurs OIV 601 à OIV 617 pour les données quantitatives et les descripteurs qualitatifs OIV 067, OIV 068, OIV 070, OIV 071, OIV 076, OIV 079, OIV 080, OIV 081-1, OIV 082, OIV 083-2, OIV 084, OIV 085, OIV 088, OIV 089, OIV 090, OIV 091, OIV 093 et OIV 094.

**Tableau 08.** Tableau récapitulatif des paramètres quantitatifs et qualitatifs étudiés.

Stade phénologique	Organe végétal	Paramètres	Code
<b>Descripteurs qualitatifs</b>			
		Forme du limbe	OIV 067
		Nombre de lobes	OIV 068
		Distribution de la pigmentation anthocyanique	OIV 070

<b>Observation à faire entre la nouaison et la véraison</b>	Feuille adulte	des nervures principales de la face supérieure du limbe	
		Distribution de la pigmentation anthocyannique des nervures principales de la face inférieure du limbe	OIV 071
		Forme des dents	OIV 076
		Degré d’ouverture / chevauchement du sinus pétiole	OIV 079
		Forme de la base du sinus pétiole	OIV 080
		Dents dans le sinus pétiole	OIV 081-1
		Degré d’ouverture / chevauchement des sinus latéraux supérieurs	OIV 082
		Dents dans les sinus latéraux supérieurs	OIV 083-2
		Densité des poils couchés entre les nervures principales sur la face inférieure du limbe	OIV 084
		Densité des poils dressés entre les nervures principales sur la face inférieure du limbe	OIV 085
		Poils couchés sur les nervures principales de la face supérieure du limbe	OIV 088
		Poils dressés sur les nervures principales de la face supérieure du limbe	OIV 089
		Densité des poils couchés sur le pétiole	OIV 090
		Densité des poils dressés sur le pétiole	OIV 091
		Longueur du pétiole par rapport à la longueur de la nervure médiane	OIV 093
		Profondeur des sinus latéraux supérieurs	OIV 094
<b>Descripteurs quantitatifs</b>			
		Longueur de la nervure N1	OIV 601
		Longueur de la nervure N2	OIV 602
		Longueur de la nervure N3	OIV 603
		Longueur de la nervure N4	OIV 604
		Longueur du point pétiole au fond du sinus latéral supérieur	OIV 605

<b>Observation à faire entre la nouaison et la véraison</b>	Feuille adulte	Longueur du point pétiolaire au fond du sinus latéral inférieur	OIV 606
		Angle entre N1 et N2 (mesuré à la première bifurcation)	OIV 607
		Angle entre N2 et N3 (mesuré à la première bifurcation)	OIV 608
		Angle entre N3 et N4 (mesuré à la première bifurcation)	OIV 609
		Angle entre N3 et la tangente entre le point pétiolaire et l'extrémité N5	OIV 610
		Longueur de la nervure N5	OIV 611
		Longueur de la dent de N2	OIV 612
		Largeur de la dent de N2	OIV 613
		Longueur de la dent de N4	OIV 614
		Largeur de la dent de N4	OIV 615
		Nombre de dents entre l'extrémité de N2 et l'extrémité de la première nervure secondaire de N2, les dents terminales inclus	OIV 616
		Distance entre l'extrémité de N2 et l'extrémité de la première nervure secondaire de N2	OIV 617

## A. Les paramètres quantitatifs (Ampélogométrie)

Pour les mesures de 17 caractères quantitatifs, le système repose sur la symétrie des organes étudiés, notamment les feuilles. Les mesures sont réalisées sur les côtés gauche et droit de la feuille adulte, et la moyenne des deux valeurs est utilisée pour garantir une précision optimale. Cela inclut des caractéristiques telles que la longueur et la largeur du limbe, la profondeur des sinus ou encore la longueur des nervures principales.

Après la collecte des feuilles adultes, celles-ci sont scannées. Les mesures quantitatives ont été effectuées à l'aide du logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>), qui permet une mesure précise des paramètres morphologiques (Abràmoff et *al.*, 2004). Ces outils renforcent la fiabilité des données et facilitent les comparaisons entre différentes études.

Les paramètres ampélométriques mesurés ont été codifiés (1, 3, 5, 7, 9), ce qui permet de transformer les caractères quantitatifs en caractères qualitatifs afin de décrire les cépages de façon plus standardisée (Tableau 09).

**Tableau 09.** Codification des paramètres ampélométriques quantitatifs (longueurs en mm, angles en °).

Code OIV	paramètre étudié	Codification				
		1 (jusqu'à environ)	3 (environ)	5 (environ)	7 (environ)	9 (environ et plus)
<b>OIV 601</b>	Longueur de la nervure N1	75	105	135	165	195
<b>OIV 602</b>	Longueur de la nervure N2	65	85	105	125	145
<b>OIV 603</b>	Longueur de la nervure N3	35	55	75	95	115
<b>OIV 604</b>	Longueur de la nervure N4	15	25	35	45	55
<b>OIV 605</b>	Longueur du point pétiolaire (sinus latéral supérieur)	30	50	70	90	110
<b>OIV 606</b>	Longueur du point pétiolaire (du sinus latéral inférieur)	30	45	60	75	90
<b>OIV 607</b>	Angle entre N1 et N2	30	30-45	46-55	56-70	70.1
<b>OIV 608</b>	Angle entre N2 et N3	30	30-45	46-55	56-70	70.1
<b>OIV 609</b>	Angle entre N3 et N4	30	30-45	46-55	56-70	70.1
<b>OIV 610</b>	Angle entre N3 et la tangente entre le point pétiolaire et l'extrémité N5	30	30-45	46-55	56-70	70.1
<b>OIV 611</b>	Longueur de la nervure N5	15	25	35	45	55
<b>OIV 612</b>	Longueur de la dent de N2	6	10	14	18	22
<b>OIV 613</b>	Largeur de la dent de N2	6	10	14	18	22
<b>OIV 614</b>	Longueur de la dent de N4	6	10	14	18	22
<b>OIV 615</b>	Largeur de la dent de N4	6	10	14	18	22
<b>OIV 616</b>	Nombre de dents entre l'extrémité de N2 et l'extrémité de la première nervure secondaire de N2	3	4	5-6	7-8	9
<b>OIV 617</b>	Distance entre l'extrémité de N2 et l'extrémité de la	30	30-45	46-55	56-70	70.1

	première nervure secondaire de N2					
--	--------------------------------------	--	--	--	--	--

## B. les paramètres qualitatifs

Outre les mesures quantitatives, l'OIV propose des descripteurs qualitatifs permettant d'évaluer des traits distinctifs tels que :

- la distribution de la pigmentation anthocyanique (présente sur les écailles des rameaux ou les nervures des feuilles adultes).
- la texture du limbe (gaufree ou ondulée).
- la longueur relative du pétiole par rapport à la nervure principale.
- le degré de lignification du pédoncule des grappes.

Les caractéristiques qualitatives ont été déterminées par inspection visuelle et classées selon le système de codification standardisé proposé par l'OIV. Dont, elles sont notés sur une échelle numérique standardisée (1, 2, 3, 4, 5, 7, 9), où chaque chiffre indique l'intensité ou le degré d'expression du caractère observé (OIV, 2009) (Tableau 10).

**Tableau 10.** Codification des paramètres qualitatifs étudiés.

Code OIV	paramètre étudié	Codification				
		1	2	3	4	5
<b>OIV 067</b>	Forme du limbe	Cordiforme	Cuneiforme	Pentagonale	Orbiculaire	Réniforme
<b>OIV 068</b>	Nombre de lobes	Un	Trois	Cinq	Sept	Plus de sept
<b>OIV 070</b>	Distribution de la pigmentation anthocyanique des nervures principales de la face supérieure du limbe	Nulle	Seulement au point pétiole	Jusq'à la 1 <sup>ère</sup> bifurcation	Jusq'à la 2 <sup>ème</sup> bifurcation	Au-delà de la 2 <sup>ème</sup> bifurcation



<b>OIV 071</b>	Distribution de la pigmentation anthocyannique des nervures principales de la face inférieure du limbe	Nulle	Seulement au point pétioleaire	Jusqu'à la 1 <sup>ère</sup> bifurcation	Jusqu'à la 2 <sup>ème</sup> bifurcation	Au-delà de la 2 <sup>ème</sup> bifurcation
<b>OIV 076</b>	Forme des dents	A deux côtés concaves	A deux côtés rectilignes	A deux côtés convexes	un côté concave, un côté convexe	Mixte des deux côtés rectilignes (notation2) et deux côtés convexes (notation3)
<b>OIV 080</b>	Forme de la base du sinus pétioleaire	En U	En accolade {	En V	/	/
<b>OIV 082</b>	Degré d'ouverture / chevauchement des sinus latéraux supérieurs	Ouverts	fermés	Légèrement chevauchants	Très chevauchants	Absence de sinus
<b>Codification</b>		<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>9</b>
<b>OIV 079</b>	Degré d'ouverture / chevauchement du sinus pétioleaire	Très ouvert	Ouvert	fermé	Chevauchant	Très chevauchant
<b>OIV 081-1</b>	Dents dans le sinus pétioleaire	Absentes	/	/	/	Présentes
<b>OIV 083-2</b>	Dents dans les sinus latéraux supérieurs	Absentes	/	/	/	Présentes
<b>OIV 084</b>	Densité des poils couchés entre les nervures principales sur la face inférieure du limbe	Nulle ou très faible	Faible	Moyenne	Forte	Très forte
<b>OIV 085</b>	Densité des poils dressés entre les nervures principales	Nulle ou très faible	Faible	Moyenne	Forte	Très forte

	sur la face inférieure du limbe					
<b>OIV 088</b>	Poils couchés sur les nervures principales de la face supérieure du limbe	Absents	/	/	/	Présents
<b>OIV 089</b>	Poils dressés sur les nervures principales de la face supérieure du limbe	Absents	/	/	/	Présents
<b>OIV 090</b>	Densité des poils couchés sur le pétiole	Nulle ou très faible	Faible	Moyenne	Forte	Très forte
<b>OIV 091</b>	Densité des poils dressés sur le pétiole	Nulle ou très faible	Faible	Moyenne	Forte	Très forte
<b>OIV 093</b>	Longueur du pétiole par rapport à la longueur de la nervure médiane	Plus court	Légèrement plus court	Egal	Légèrement plus long	Plus long
<b>OIV 094</b>	Profondeur des sinus latéraux supérieurs	Absents ou très peu profonds	Peu profonds	Moyens	Profonds	Très profonds

Cette approche combinée (entre les paramètres qualitatifs et quantitatifs) a permis une description complète et précise des traits ampélographiques des génotypes étudiés.

### I.3.3.2. Analyse statistique des données obtenues

Les analyses statistiques descriptives ont été effectuées pour chaque trait morphologique afin d'évaluer la variabilité des données. Les paramètres tels que le minimum, le maximum, la moyenne et le coefficient de variation (CV%) ont été calculés en tant qu'indicateurs clés de la dispersion et de l'homogénéité des traits étudiés. Ces calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel XLSTAT (version d'essai), un outil puissant pour les analyses statistiques appliquées en biologie et en agronomie.

L'analyse en composantes principales (ACP) a été menée sur les caractères quantitatifs recueillis afin de réduire la dimensionnalité des données et d'identifier les principales variables

responsables de la variation observée entre les échantillons. Cette méthode a été réalisée à l'aide du logiciel PAST (Hammer et *al.*, 2001), largement utilisé pour les analyses statistiques multidimensionnelles en sciences naturelles.

Une analyse de corrélation, basée sur le coefficient de corrélation de Pearson, a été effectuée pour explorer les relations linéaires entre les différentes caractéristiques morphologiques. Cette analyse a permis de mettre en évidence des associations significatives entre certains traits, suggérant des influences communes ou des mécanismes biologiques partagés.

Pour évaluer les relations phénotypiques globales entre les cultivars étudiés, une analyse de classification hiérarchique (cluster analysis) a été réalisée. Les caractères quantitatifs et qualitatifs ont été pris en compte, en suivant une méthode de codage basée sur les lignes directrices des descripteurs de vigne établis par l'OIV (2009). Les distances euclidiennes ont été utilisées comme mesure de similarité, tandis que l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) a été appliqué pour regrouper les cultivars en fonction de leur proximité phénotypique. Cette approche est couramment employée en biologie pour illustrer les relations hiérarchiques et les schémas de divergence entre groupes.

En combinant ces analyses, l'étude offre une vision détaillée et rigoureuse des caractéristiques morphologiques des cultivars, permettant d'identifier des relations phénotypiques complexes et de mieux comprendre la structure de la diversité génétique présente.

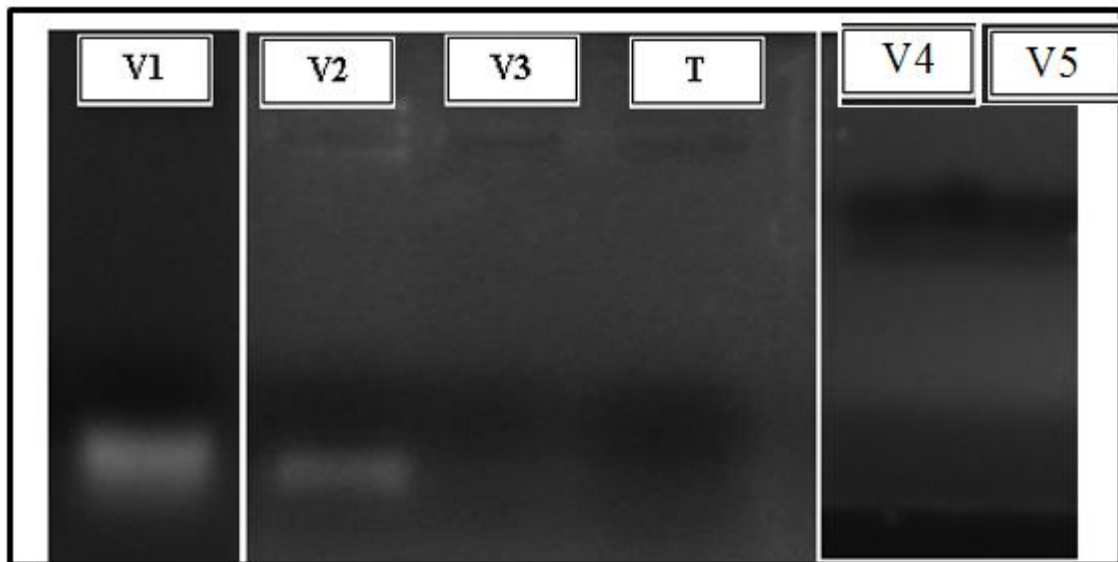
## **II. Résultats et discussions**

## II.1. Optimisation de protocole d'extraction d'ADN génomique

### II.1.1. Résultats obtenus

#### II.1.1.1. L'ADN extrait avant optimisation

L'application du protocole proposé par Piccolo et *al.* (2012) à nos échantillons n'a pas permis de détecter de l'ADN, le signal étant trop faible pour certains (Figure 06). Les difficultés rencontrées avec ce protocole incluaient la formation d'une pâte visqueuse après l'ajout du tampon de lyse, en raison de la faible quantité de tampon utilisée par rapport à la quantité de poudre. Dans certains tubes, il n'y avait pas du tout de phase aqueuse après centrifugation, et dans d'autres, il y en avait très peu (étape 4).

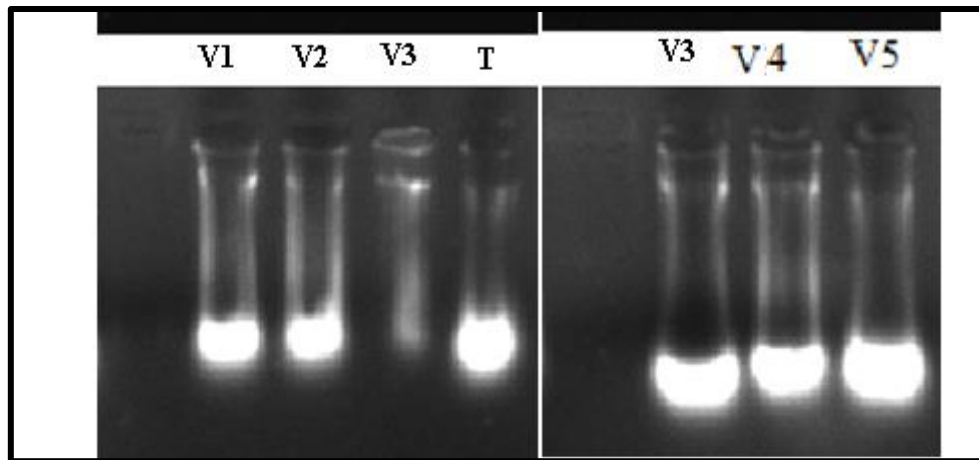


**Figure 06.** Profil électrophorétique de l'ADN génomique obtenu après application du protocole de Piccolo et *al.* (2012). Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% a été réalisée, suivie d'une coloration BET et d'une visualisation sous lumière UV. Les puits V1, V2, V3, V4, V5 et T représentent les échantillons utilisés.

#### II.1.1.2. L'ADN extrait après optimisation

D'après le profil électrophorétique (Figure 07) le signal a été plus fort pour tous les échantillons. Mais l'échantillon V3 (dans le puits 3) a donné un signal plus faible. Cela peut être dû au fait que l'échantillon a été éliminé pendant la manipulation. La migration de cet échantillon a été répétée pour confirmer la présence de l'ADN extrait. De plus, l'intégrité de

l'ADN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose, qui a révélé des bandes nettes et sans fragmentation visible.



**Figure 07.** Profil électrophorétique de l'ADN obtenu après application du protocole optimisé. Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% a été réalisée, suivie d'une coloration BET et d'une visualisation sous lumière UV. Les puits V1, V2, V3, T, V3 (échantillon répété), V4 et V5 représentent les échantillons utilisés.

### II.1.1.3. Evaluation de la qualité et la quantité d'ADN extrait

Le protocole de référence utilisé pour l'extraction d'ADN a permis d'obtenir une concentration moyenne relativement faible, estimée à 72  $\mu\text{g/ml}$ . En outre, la masse totale d'ADN extraite par échantillon était en moyenne de 14,4  $\mu\text{g}$ , ce qui reflète un rendement d'extraction limité, équivalent à 0,072  $\mu\text{g/mg}$  de matériel initial (Tableau 11). Ces résultats mettent en évidence les limites du protocole en termes d'efficacité, notamment pour les échantillons riches en métabolites secondaires ou présentant des parois cellulaires particulièrement résistantes, susceptibles d'inhiber une extraction optimale de l'ADN.

**Tableau 11.** Concentration moyenne, masse et rendement de l'ADN extrait à l'aide du protocole de Piccolo et *al.* (2012).

Echantillon	Concentration en ADN (µg/ml)	Masse totale d'ADN (µg)	Rendement d'extraction (µg d'ADN par mg de feuille)
V1	253	50.6	0.253
V2	123	24.6	0.123
V3	5	1	0.005
V4	13	2.6	0.013
V5	15	3	0.015
T	23	4.6	0.023
<b>Moyenne</b>	<b>72</b>	<b>14.4</b>	<b>0.072</b>

Alors que, le protocole optimisé a démontré une performance remarquable en matière d'extraction d'ADN, permettant d'obtenir une concentration moyenne élevée de 2109.5 µg/ml (voir Tableau 12). La masse totale d'ADN extraite par échantillon atteint en moyenne 126.56 µg, ce qui correspond à un bon rendement d'extraction de 1265 µg/g de matériau initial. Ces résultats soulignent l'efficacité du protocole optimisé, particulièrement adapté aux échantillons végétaux complexes. La forte concentration et le rendement élevé indiquent une extraction efficace et une minimisation des pertes au cours des étapes critiques, notamment la lyse cellulaire et la purification. Ce protocole constitue une avancée notable par rapport aux méthodes conventionnelles, en répondant aux exigences des analyses moléculaires nécessitant des quantités importantes d'ADN de haute qualité.

**Tableau 12.** Concentration moyenne, masse et rendement de l'ADN extrait à l'aide du protocole optimisé.

Echantillon	Concentration en ADN (µg/ml)	Masse totale d'ADN (µg)	Rendement d'extraction (µg d'ADN par mg de feuille)
V1	2270	136.2	1.362
V2	2033	121.98	1.219
V3	2235	134.1	1.341
V4	2013	120.75	1.207
V5	1633	97.95	0.979
T	2473	148.38	1.483
<b>Moyenne</b>	<b>2109.5</b>	<b>126.56</b>	<b>1.265</b>

Après avoir évalué la qualité de l'ADN extrait au moyen du protocole optimisé (Tableau 13), les résultats de cette analyse révèlent que l'ADN obtenu présente une pureté satisfaisante pour l'ensemble des échantillons étudiés. Les ratios d'absorbance A260 nm/A280 nm et A260 nm/A230 nm confirment l'absence notable de contaminants tels que les protéines, les polysaccharides ou les phénols, qui sont souvent problématiques dans les échantillons végétaux. Ces résultats mettent en évidence une pureté adéquate ainsi que la compatibilité de l'ADN avec des applications en biologie moléculaire telles que la PCR ou le séquençage, lesquelles requièrent un ADN de haute qualité.

**Tableau 13.** Détermination de la pureté de l'ADN extrait par le protocole optimisé.

Echantillon	A <sub>260nm</sub> /A <sub>280nm</sub>	A <sub>260nm</sub> /A <sub>230 nm</sub>	Indication de la pureté
V1	1,8	2.00	Bonne pureté de l'ADN
V2	1,93	2,10	
V3	1,89	2,00	
V4	1,89	1,95	
V5	1.94	2.07	
T	1.99	2.2	
Moyenne	1.90	2.05	

### II.1.2. Discussions

#### II.1.2.1. Discussion analytique

Dans notre étude, nous avons choisis les jeunes feuilles de vigne pour extraire l'ADN génomique. D'après Varma et *al.* (2007), l'efficacité de l'extraction de l'ADN peut être influencée par divers facteurs, notamment l'âge et le type de tissu prélevé, tels que les feuilles, les tiges, les racines ou les fruits, ainsi que par la méthode de préparation de l'échantillon. En effet, contrairement aux jeunes feuilles, les feuilles adultes sont généralement riches en métabolites secondaires, ce qui peut altérer la qualité de l'ADN extrait (Hanania et *al.*, 2004 ; Varma et *al.*, 2007 ; Sahu et *al.*, 2012 ; Marsal et *al.*, 2013 ; Cantu et *al.*, 2019). Par ailleurs, dans les tissus tels que les tiges et les racines, le processus de lignification entraîne une accumulation importante de métabolites secondaires (Lewinsohn et *al.*, 1994), susceptibles d'inhiber l'amplification du locus cible lors de la PCR (Schori et *al.*, 2013). En revanche, les



jeunes feuilles contiennent peu de métabolites secondaires comme les polysaccharides, les polyphénols et les tanins, ce qui en fait une source idéale pour obtenir un ADN pur et de haute qualité.

En outre, la plupart des protocoles d'extraction d'ADN reposent sur l'utilisation de tissus frais, mais dans le cadre de cette étude, nous avons travaillé avec des feuilles conservées en raison de contraintes spécifiques. Tout d'abord, les échantillons étaient souvent collectés dans des zones éloignées, où il était difficile d'assurer un transport rapide vers le laboratoire. Par la suite, l'extraction d'ADN était fortement influencée par le stade du cycle biologique de la plante. La période idéale pour la récolte des feuilles était pendant la phase d'élongation active des pousses, s'étendant du débourrement à la chute des feuilles, habituellement vers la mi-novembre (Lodhi et *al.*, 1994 ; Ghaffari et *al.*, 2011). De plus, à la suite de cette période, la dormance hivernale des plantes rendait quasiment impossible l'extraction d'ADN (Marsal et *al.*, 2013). Devant ces contraintes, il a été nécessaire pour nous de concevoir et d'améliorer un protocole de conservation des feuilles.

Ce protocole nous permet d'extraire de l'ADN à tout moment, indépendamment des phases de croissance végétative, en évitant ainsi la dépendance aux jeunes feuilles fraîches ou à des périodes spécifiques du cycle de vie de la plante. D'après les résultats obtenus, la méthode de séchage des feuilles à l'étuve s'est avérée très efficace et permet une conservation à long terme des échantillons en utilisant du gel de silice.

L'extraction d'ADN à partir de végétaux pose des défis particuliers. La performance, la pureté et l'intégrité des acides nucléiques représentent des critères fondamentaux visant à garantir la qualité et la fiabilité des analyses en biologie moléculaire (Shukla et *al.*, 2018). Cette procédure est particulièrement compliquée avec les échantillons végétaux, où il est souvent difficile d'obtenir à la fois un rendement élevé et une pureté optimale (Friar, 2005). Les plantes contiennent des métabolites secondaires qui accélèrent la dégradation de l'ADN, ce qui rend les échantillons visqueux et l'ADN difficilement amplifiable. De plus, leurs parois cellulaires rigides requièrent des méthodes particulières pour être efficacement rompues (Hanania et *al.*, 2004). Bien qu'il existe diverses techniques de broyage des tissus végétaux, l'utilisation de l'azote liquide dans un mortier est généralement la méthode la plus efficace. Cependant, en raison de l'indisponibilité de l'azote liquide dans notre laboratoire et des difficultés liées à son transport, nous avons mis au point une méthode de broyage plus simple et plus économique, permettant d'obtenir une poudre fine sans avoir recours à des cycles de congélation /

décongélation. Pour prévenir toute contamination et la dégradation de l'ADN liée à l'humidité, nous avons recours à l'utilisation de gel de silice, qui permet de conserver les échantillons pendant plusieurs mois à température ambiante.

Le protocole de référence présente une limitation majeure : il requiert une quantité importante d'échantillon initial (200 à 300 mg de feuilles) tout en utilisant un volume réduit de tampon de lyse (700 µl). Cette configuration ne permet pas une lyse complète des cellules, ce qui entraîne un faible rendement en ADN extrait. Pour surmonter cette contrainte, nous avons ajusté les paramètres en réduisant la quantité de poudre utilisée à 100 mg et en augmentant le volume de tampon de lyse à 1 ml. Cette modification a permis d'obtenir une extraction plus efficace, avec une quantité d'ADN plus importante.

Lors de l'optimisation, nous avons ajouté une étape de lavage avec un tampon à base de sorbitol. Selon les études de Henry (2008), Russell et *al.* (2010), Inglis et *al.* (2018) et Lucas et *al.* (2019), le tampon de lavage à base de sorbitol permet d'éliminer les polysaccharides mucilagineux présents dans les tissus végétaux et d'inhiber le polyphénol oxydase. Les polyphénols et les polysaccharides sont en effet des contaminants majeurs dans les procédures d'isolation de l'ADN. L'élimination des polysaccharides s'avère complexe, et leur abondance entraîne une forte viscosité de l'homogénat tissulaire, ce qui peut induire des erreurs dans la quantification de l'ADN. Ils ont tendance à précipiter conjointement avec l'ADN, ce qui confère à ce dernier une consistance collante et visqueuse ainsi qu'une teinte brune (Katterman et Shattuck, 1983). Dans cette configuration, ils perturbent également le fonctionnement de diverses enzymes biologiques telles que les polymérases, les ligases et les endonucléases de restriction (Varma et *al.*, 2007 ; Japelaghi et *al.*, 2011).

En revanche, les polyphénols peuvent entraîner la dégradation de l'ADN génomique. Lors de la lyse cellulaire, ces composés se dégagent des vacuoles et sont rapidement oxydés par les oxydases cellulaires. Cette interaction entraîne une modification irréversible de la structure des acides nucléiques (Khanuja et *al.*, 1999 ; Japelaghi et *al.*, 2011).

Le polyvinylpyrrolidone (PVP) a été utilisé dans le but d'éliminer les polyphénols et de les séparer de l'ADN, comme décrit par Palomera-Avalos et *al.* (2008) et Demeke et Jenkins (2010). D'après les recherches menées par Nazhad et Solouki (2008) ainsi que par Ghaffari et *al.* (2011), le  $\beta$ -Mercaptoéthanol est identifié comme un agent antioxydant capable de prévenir l'oxydation des polyphénols et de faciliter aussi l'élimination des protéines.

Au cours de cette recherche, le réactif CTAB a été employé en tant que détergent de qualité supérieure. Il augmente la solubilité de la membrane cellulaire et perturbe les protéines de la bicouche lipidique, entraînant ainsi la libération des acides nucléiques (Surzycki, 2000 ; Palomera-Avalos et *al.*, 2008). En outre, l'élévation de sa concentration à 3 % en présence d'une forte concentration de chlorure de sodium (2,7 M) conduit à une amélioration significative de la pureté de l'ADN. L'adjonction de CTAB à une concentration élevée en sel s'avère efficace pour prévenir la co-précipitation des polysaccharides avec l'ADN (Hanania et *al.*, 2004 ; Hasan et *al.*, 2008 ; Henry, 2008 ; Marsal et *al.*, 2011 ; Marsal et *al.*, 2013). Par ailleurs, l'augmentation de la concentration de sel empêche la séparation des deux brins d'ADN. En effet, la liaison des ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) aux groupements phosphate ( $\text{PO}_4^-$ ) réduit les forces de répulsion entre les brins d'ADN, comme indiqué par Varma et *al.* (2007), Hasan et *al.* (2008), Ghaffari et *al.* (2011) et Sahu et *al.* (2012). Afin de garantir l'intégrité de l'ADN durant le processus d'extraction, il a été décidé d'augmenter la concentration d'EDTA à 50 mM. Cette concentration optimale permet de chélater les ions métalliques et d'inactiver les enzymes nucléases, comme recommandé par Surzycki, (2000).

L'ajout d'un autre agent tensioactif, le Tween 20 (0,5 %), un détergent non ionique, favorisera la rupture des membranes et la séparation des protéines membranaires associées (Xin et *al.*, 2003). Afin d'optimiser la lyse cellulaire, une quantité de 3  $\mu\text{l}$  de protéinase K, une endoprotéase non spécifique couramment employée pour dénaturer les protéines par clivage protéolytique, a été incorporée. Cette enzyme agit en rompant les liaisons peptidiques (Varma et *al.*, 2007).

Afin de procéder à l'élimination des ARN, une concentration de 2 M de chlorure de lithium ( $\text{LiCl}$ ) a été ajoutée. D'après les recherches menées par Lefort et Douglas (1999) et par Pirttilä et *al.* (2001), l'ajout de  $\text{LiCl}$  dans le tampon d'extraction est une méthode efficace pour éliminer l'ARN, considéré comme un contaminant lors de l'isolement de l'ADN génomique. En effet, l'ARN a la capacité d'inhiber l'amplification de la PCR et de perturber les applications ultérieures (Jobes et *al.*, 1995). La précipitation sélective par le  $\text{LiCl}$  offre divers avantages par rapport au traitement à la RNase utilisé dans les protocoles standards. En effet, cette méthode permet l'élimination de l'ARN plutôt que sa dégradation en fragments plus petits (Ribeiro et Lovato, 2007), tout en étant plus économique (Jobes et *al.*, 1995).

En revanche, il est crucial de contrôler avec précision la durée et la température d'incubation afin d'obtenir une quantité significative d'ADN de qualité supérieure (Thomson, 1995). Par conséquent, cette étape a été réalisée durant une période d'une heure et demie. Selon Bokszzanin et Przybyla (2006), il a été confirmé que le prolongement de temps d'incubation

d'une heure à une heure et demie favorise une efficacité accrue du tampon de lyse sur les membranes cellulaires.

Concernant les protéines, elles sont éliminées par un double lavage au chloroforme, provoquant la dénaturation des protéines. De plus, la présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol dans le tampon de lyse contribue également à la dénaturation des protéines en rompant les liaisons disulfures entre les résidus de cystéine. En outre, la protéase K est ajoutée afin de dénaturer les protéines. L'alcool isoamylique maintient la stabilité de la phase après la centrifugation de la solution déprotéinée, favorisant ainsi la séparation nette de la phase aqueuse et de la phase organique (Sharma *et al.*, 2002).

Enfin, le protocole standard établi par Piccolo *et al.* (2012) a été employé, utilisant le tampon TE pour la dissolution de l'ADN. Ce tampon contient 1mM d'EDTA, un composé capable d'inhiber la réaction de PCR, comme mentionné par Demeke et Jenkins (2010). Par conséquent, nous avons substitué ce tampon par de l'eau bidistillée stérile.

### II.1.2.2. Discussion des résultats

Les résultats obtenus montrent la présence d'une seule bande d'ADN sur gel, ce qui confirme que l'ADN extrait est intact et que son intégrité a été préservée grâce à une méthode efficace de préparation des échantillons, notamment par une déshydratation complète avant l'extraction. Cette approche permet de minimiser les dégradations souvent induites par l'humidité et d'éliminer les contaminants fréquents dans les extraits d'ADN.

Selon l'étude de Marsal *et al.* (2013), les méthodes classiques d'extraction de l'ADN génomique (extraction liquide-liquide), telles que celles décrites par Dellaporta *et al.* (1983), Doyle et Doyle (1987) et Bowers *et al.* (1993), présentent des limites notables lorsqu'elles sont appliquées à des espèces riches en métabolites secondaires, comme *Vitis vinifera* L. La richesse de cette espèce végétale en composés tels que les polyphénols et les polysaccharides dans cette espèce végétale réduit considérablement l'efficacité de ces protocoles, entraînant un ADN de faible pureté et des rendements insuffisants. Ces contaminants interfèrent également avec les applications en aval, telles que la PCR et le clonage, compromettant ainsi les analyses moléculaires (Varma *et al.*, 2007 ; Japelaghi *et al.*, 2011).

En revanche, le protocole optimisé dans cette étude a permis de surmonter ces obstacles. Il a fourni une concentration élevée d'ADN, atteignant 2109.5  $\mu\text{g/ml}$ , avec un rendement moyen

impressionnant de 1265 µg/g de tissu. Notre résultat est plus élevé que ceux trouvés par l'équipe de Lucas *et al.* 2019 ( $140 \pm 53,2$  ng/µl), de Li *et al.* (2020) (500 ng/ µl) et l'équipe de Tiwari *et al.* (2021) (1990, 14 ng/ µl).

En outre, l'ADN extrait présentait une excellente pureté, comme en témoignent les ratios d'absorbance mesurés : un ratio A260nm/A280nm parfait de 1,90 et un ratio A260nm/A230nm de 2,05. Ces valeurs indiquent l'absence de contaminants majeurs tels que les protéines, les polyphénols ou les polysaccharides, validant l'efficacité du protocole modifié.

Ces résultats confirment que l'optimisation du protocole est particulièrement adaptée aux plantes à haut contenu en métabolites secondaires, offrant des extraits d'ADN de qualité supérieure, compatibles avec diverses applications de biologie moléculaire (Katterman et Shattuck, 1983 ; Demeke et Jenkins, 2010 ; Ghaffari *et al.*, 2011).

### II.1.2.3. Estimation des coûts

L'estimation du coût du protocole optimisé pour un seul échantillon de 100 mg est de 54,39 DA (0,39 €), contre 13,95 DA (0,10 €) pour le protocole non optimisé. Ainsi, 5 mg de feuilles sèches (équivalent à 50 extractions) coûtent 2751,60 DA (19,73 €). Le prix du protocole modifié est raisonnable par rapport au coût d'un kit GenElute™-E Single Spin Plant DNA (SIGMA), qui coûte 33750,05 DA ( 242,00 €) pour 50 tests.

## II.2. Identification génotypique des cépages étudiés

Cette étude représente une recherche fondamentale sur la diversité génétique des vignes algériennes, plus précisément dans la région d'El-Kantara, une zone historiquement importante pour la viticulture en raison de son vaste patrimoine viticole (roman, berbère et arabe, etc.), de ses conditions agroclimatiques favorables et de sa situation entre le nord (Aurès) et le sud.

Cette recherche utilise des techniques moléculaires pour caractériser en profondeur les cultivars de vigne, dans le but d'identifier les cépages locaux et d'élucider leurs relations génétiques dans le contexte de la diversité mondiale de la vigne.

Au cours des vingt dernières années, les marqueurs microsatellites nucléaires, en tant qu'outils moléculaires efficaces, ont été principalement utilisés pour valoriser les ressources génétiques de la vigne, notamment pour identifier les accessions et les variétés de vigne. Ils

permettent également de résoudre les problèmes et les incertitudes liés à l'homonymie, à la synonymie, aux erreurs de nom et à l'inférence de la structure génétique des populations de raisins (Cipriani et *al.*, 2010 ; Margaryan et *al.*, 2021).

### II.2.1. L'ADN extrait

L'ADN extrait de tous les échantillons a été amplifié avec succès à l'aide de chacun des 12 SSR, et 18 génotypes distincts ont été détectés en analysant les cultivars choisis.

### II.2.2. Identification génotypique et dénominations des cultivars

La caractérisation moléculaire permet de mieux comprendre l'évolution, le développement historique, et la diversité génétique de *V. vinifera* L. (Riahi et *al.*, 2012). Dans cette étude, 51 cultivars ont été caractérisés à l'aide de 12 marqueurs microsatellites nucléaires. Lorsque des accessions présentaient le même profil SSR, elles ont été considérées comme synonymes et exclues de l'analyse ultérieure.

L'analyse par le logiciel « Identity 1.0 » (Wagner et Sefc, 1999) a permis de déterminer que les synonymes présentaient le même profil SSR (Tableau 14). Nous avons trouvé que les cultivars anonymes (B4, D1, D28, F2 et F8) présentent le même génotype que les cépages muscat (F6, D15), datté (B12), Mestateouile (D6), Chamerakha (D18) et Elhamera (F7), d'après la nomenclature en dialecte commun la plupart de ces cultivars se caractérisent par une forme en grappe de dattes. En revanche, les cultivars (Sample B3, Sample B7, Sample D17), qui présentent des baies de couleur rouge à la noire, sont des synonymes du même profil SSR.

Nous avons obtenu que le cultivar Bayedha (B2) partage le même profil SSR que la vigne (B8) et qu'ils présentent la même couleur de baies (blanc au vert) ainsi qu'un site d'échantillonnage plus proche.

De plus, le cépage Seouikiya (D24), qui signifie « sucré » en dialecte algérien, a le même génotype que le muscat (D4).

Selon l'analyse, les deux cultivars D14 et F4 possèdent le même profil SSR et partagent le même synonyme « Mestatouile », ce qui signifie qu'ils ont des grappes longues en dialecte commun.

Les échantillons D21 (Kahela ou Aïn Taher), D27 (de baies noires) et F3 (Kahela seghira) ont la même couleur de baies et partagent le même génotype SSR. Ils sont identiques aux cépages B1, B5 et D13.

Il y a aussi des cépages qui ont le même profil SSR, comme : les cultivars B6, B9, C5 et D20, ainsi que le cépage D3 avec le D10. Les cultivars F9 et F10 sont identiques. L'échantillon B10 (Kahela) est identique à D5.

Les profils génétiques des cépages B11 (Khadhera), D2 (Datté), D8, D19 et D26 sont identiques. Les trois derniers génotypes Zitouna (D12), Kahela (D22) et D23 se sont partagé le même profil SSR.

D'après l'analyse par le logiciel « Identity 1.0 », six échantillons présentent un profil SSR différent des autres : le D11, le D16, le F5, le D7, le D25 et le F1.

## II. Résultats et discussions

**Tableau 14.** Liste de cultivars de même synonymes (des génotypes identiques). Les 18 profils SSR différents obtenus à 12 loci SSR. La longueur des allèles est exprimée en paires de bases. Les longueurs des allèles pour VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 et VrZAG79 sont fournies en utilisant la taille des allèles du VIVC

SSR Profile ID	Cultivars de même synonymes	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD25		VVMD27		VVMD28		VVMD32		VrZAG62		VrZAG79		VMC6E1		VMC6G1		VMCNG4b9	
1	Sample B4, Sample B12, Sample D1, Sample D6, Sample D15, Sample D18, SampleD28, Sample F2, SampleF6, Sample F7, Sample F8	135	151	236	238	247	249	241	245	180	184	258	258	250	272	188	204	247	247	169	175	177	187	158	160
2	Sample B3, Sample B7, Sample D17	137	145	230	236	233	239	241	255	195	195	236	244	262	272	188	204	257	257	137	143	177	191	138	166
3	Sample B2, Sample B8	137	155	228	242	239	249	245	255	180	195	244	258	256	262	188	204	243	257	143	165	187	187	150	158
4	Sample B6, Sample B9, Sample C5, Sample D20	143	149	228	242	239	239	249	255	180	195	244	248	250	272	186	188	251	257	141	141	169	177	160	172
5	Sample D3, Sample D10	135	147	234	240	239	249	255	267	184	195	248	254	252	256	192	204	247	257	165	169	179	193	150	150
6	Sample D4, Sample D24	133	149	230	234	249	251	249	249	180	195	244	268	264	272	186	204	247	255	141	143	169	195	158	158
7	Sample D11	133	137	238	242	233	253	241	255	184	186	258	260	252	252	200	204	237	259	141	157	187	191	158	170
8	Sample D14, Sample F4	133	135	228	234	239	249	249	255	186	186	234	258	258	272	186	188	243	251	143	167	177	191	150	158
9	Sample D16	135	135	228	238	249	249	255	255	180	186	244	268	252	272	186	186	251	255	143	165	177	193	158	176
10	Sample F5	133	135	238	240	249	251	241	255	186	190	234	236	256	272	186	194	239	261	141	143	187	197	150	158
11	Sample F9, Sample F10	133	135	240	242	249	249	239	241	195	195	234	260	252	272	194	204	257	257	141	165	191	191	176	176
12	Sample B1, Sample B5, Sample D13, Sample D21, Sample D27, Sample F3	133	145	228	230	239	253	241	241	184	195	244	258	252	272	188	200	257	259	143	157	177	187	150	166
13	Sample B10, Sample D5	137	145	240	242	249	253	241	241	195	195	234	258	252	272	194	200	257	257	141	165	177	191	138	158
14	Sample B11, Sample D2, Sample D8, Sample D19 Sample D26	133	151	228	238	249	253	241	249	184	186	236	258	252	252	200	204	251	259	157	157	187	187	150	170
15	Sample D7	143	143	240	242	249	249	241	241	186	195	244	258	252	262	204	204	237	257	165	165	187	191	166	172
16	Sample D12, Sample D22, Sample D23	133	137	228	240	249	253	241	255	184	195	258	260	252	252	200	204	257	259	157	165	187	191	150	158
17	Sample D25	137	151	238	240	253	253	249	255	186	195	258	260	252	252	200	200	251	257	157	165	187	191	150	158
18	Sample F1	143	145	228	230	239	253	241	241	195	195	244	258	272	272	188	200	257	257	143	143	177	187	150	166



**Tableau 15.** Liste des 18 profils SSR uniques obtenus à 12 loci SSR. La longueur des allèles est exprimée en paires de bases.

SSR Profile ID	Grapevine Variety	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD25		VVMD27		VVMD28		VVMD32		VrZAG62		VrZAG79		VMC6E1		VMC6G1		VMCNG4b9	
1	DABOUKI	135	151	236	238	247	249	241	245	180	184	258	258	250	272	188	204	247	247	169	175	177	187	158	160
2	RASSEGUI	143	149	228	242	239	239	249	255	180	195	244	248	250	272	186	188	251	257	141	141	169	177	160	172
3	DANUGUE	137	145	230	236	233	239	241	255	195	195	236	244	262	272	188	204	257	257	137	143	177	191	138	166
4	AFUS ALI	133	135	228	234	239	249	249	255	186	186	234	258	258	272	186	188	243	251	143	167	177	191	150	158
5	AHMEUR BOU AHMEUR	135	147	234	240	239	249	255	267	184	195	248	254	252	256	192	204	247	257	165	169	179	193	150	150
6	AMOKRANE	137	155	228	242	239	249	245	255	180	195	244	258	256	262	188	204	243	257	143	165	187	187	150	158
7	TAFERIELT	133	135	240	242	249	249	239	241	195	195	234	260	252	272	194	204	257	257	141	165	191	191	176	176
8	MUSCAT OF ALEXANDRIA	133	149	230	234	249	251	249	249	180	195	244	268	264	272	186	204	247	255	141	143	169	195	158	158
9	CARDINAL	135	135	228	238	249	249	255	255	180	186	244	268	252	272	186	186	251	255	143	165	177	193	158	176
10	DATTIER DE ST. VALLIER	133	135	238	240	249	251	241	255	186	190	234	236	256	272	186	194	239	261	141	143	187	197	150	158
11	LOUALI	133	137	238	242	233	253	241	255	184	186	258	260	252	252	200	204	237	259	141	157	187	191	158	170
12	GENOTYPE 1	133	145	228	230	239	253	241	241	184	195	244	258	252	272	188	200	257	259	143	157	177	187	150	166
13	GENOTYPE 2	137	145	240	242	249	253	241	241	195	195	234	258	252	272	194	200	257	257	141	165	177	191	138	158
14	GENOTYPE 3	133	151	228	238	249	253	241	249	184	186	236	258	252	252	200	204	251	259	157	157	187	187	150	170
15	GENOTYPE 4	143	143	240	242	249	249	241	241	186	195	244	258	252	262	204	204	237	257	165	165	187	191	166	172
16	GENOTYPE 5	133	137	228	240	249	253	241	255	184	195	258	260	252	252	200	204	257	259	157	165	187	191	150	158
17	GENOTYPE 6	137	151	238	240	253	253	249	255	186	195	258	260	252	252	200	200	251	257	157	165	187	191	150	158
18	GENOTYPE 7	143	145	228	230	239	253	241	241	195	195	244	258	272	272	188	200	257	257	143	143	177	187	150	166

Les profils génétiques obtenus pour 12 SSR ont été comparés par paire avec 6 354 références disponibles dans le *Vitis* International Variety Catalogue *VIVC* (accès en février 2024), ainsi qu'avec les 6 000 profils génétiques stockés dans la base de données du Centre de recherche sur la viticulture et l'oenologie (CREA), et même avec les génotypes SSR des cépages publiés dans la littérature pour l'identification génétique.

D'après cette analyse, plusieurs catégories de données SSR pour des génotypes spécifiques ont été définies (voir les tableaux 15,16) :

- huit génotypes d'origine internationale provenant de divers pays du bassin méditerranéen ont été identifiés parmi les échantillons étudiés : le Dabouki (Arménie), le Rassegui (Tunisie), le Taferielt (Maroc), l'Afus Ali (Liban), le Muscat of Alexandria (Grèce), le Danugue et le Dattier de ST. Vallier (la France) et la variété Cardinal qui est d'origine américaine « USA » ;
- trois génotypes identifiés et enregistrés dans la base de données *VIVC* comme étant d'origine algérienne : Amokrane, Ahmer Bou Ahmeur et Louali ;
- sept génotypes sans correspondance dans les bases de données internationales et jamais signalés.

**Tableau 16.** Liste des 51 échantillons de vigne regroupés par génotype. Le nom de cultivars, la couleur des baies, le nom de l'espèce originale, le pays d'origine, le numéro d'identification du profil SSR (ID) et le code du catalogue international des variétés de vigne (*VIVC*) sont indiqués. Couleur des baies : RS/B : Rose au Bleu, Bl/V : Blanc au vert, V : Vert, Bl : blanc, RS/R : Rose au Rouge, N : Noir, R : Rouge, J/R : Jaune au rouge.

code cultivars étudiés	Nom vernaculaire	Couleur de baie	le nom de l'espèce originale (Correspondance par SSR)	Pays d'origine	ID number (SSR profile)	VIVC Code
Sample B4	Anonyme	RS/B	Dabouki B.	Arménie	1	3309
Sample B12	Datté	Bl/V				
Sample D1	Anonyme	V				
Sample D6	Mestateouile	/				
Sample D15	Muscat	Bl/V				
Sample D18	Chamerakha	V				
Sample D28	Anonyme	/				
Sample F2	Anonyme	V				
Sample F6	Muscat	Bl				
Sample F7	Elhamera	RS/R				
Sample F8	Anonyme	V				
Sample B3	Anonyme	N				

<b>Sample B7</b>	Anonyme	R	Danugue N.	France	2	
<b>Sample D17</b>	Anonyme	N				3425
<b>Sample B2</b>	Bayedha	Bl/V	Amokrane B.	Algérie	3	431
<b>Sample B8</b>	Anonyme	V				
<b>Sample B6</b>	Anonyme	R				
<b>Sample B9</b>	Anonyme	/	Rassegui B.	Tunisie	4	9923
<b>Sample C5</b>	Anonyme	V				
<b>Sample D20</b>	Anonyme	V				
<b>Sample D3</b>	Anonyme	/	Ahmer bou Ahmeur R.	Algérie	5	140
<b>Sample D10</b>	Anonyme	Bl				
<b>Sample D4</b>	Muscat	Bl	Muscat of Alexandria B.	Grèce	6	8241
<b>Sample D24</b>	Seouikiya	Bl				
<b>Sample D11</b>	Anonyme	/	Louali B.	Algérie	7	24613
<b>Sample D14</b>	Mestateouile	V	Afus Ali B.	Liban	8	122
<b>Sample F4</b>	Mestateouile	Bl/V				
<b>Sample D16</b>	Datté	N	Cardinal N.	Etats-Unis d'Amérique	9	2091
<b>Sample F5</b>	Kahela	N	Dattier de ST. VALLIER	France	10	3437
<b>Sample F9</b>	Anonyme	/				
<b>Sample F10</b>	Anonyme	/	Taferielt (Farana noir)	Maroc	11	12196
<b>Sample B1</b>	Anonyme	/	« GENOTYPE 1 »	Algérie	12	/
<b>Sample B5</b>	Anonyme	J/R	aucune,			
<b>Sample D13</b>	Anonyme	Bl	nom proposé : <b>Aïn Taher</b>			
<b>Sample D21</b>	Aïn Taher ou kahela	N				
<b>Sample D27 (anonyme)</b>	Anonyme	N				
<b>Sample F3</b>	Kahela seghira	N				
<b>Sample B10</b>	Kahela	N	« GENOTYPE2 »	Algérie	13	/
<b>Sample D5</b>	Anonyme	Bl	aucune,			
			nom proposé : <b>Ineb ganteri</b>			
<b>Sample B11</b>	Khadhera	Bl/V	« GENOTYPE 3 »	Algérie	14	/
<b>Sample D2</b>	Datté	N	aucune,			
<b>Sample D8</b>	Anonyme	/	nom proposé : <b>Datté ganteri</b>			
<b>Sample D19</b>	Anonyme	/				
<b>Sample D26</b>	Anonyme (de grande grappe)	N				
<b>Sample D7</b>	Seouikiya	/	« GENOTYPE 4 »	Algérie	15	/
			aucune,			
			nom proposé : <b>Seouikiya</b>			
<b>Sample D12</b>	Zitouna	N	« GENOTYPE 5 »	Algérie	16	/
<b>Sample D22</b>	Kahela	N	aucune,			
<b>Sample D23</b>	Anonyme	/	nom proposé : <b>Ineb Elzitouna</b>			
<b>Sample D25</b>	Anonyme (de grande grappe)	Bl	« GENOTYPE 6 »	Algérie	17	/
			aucune,			
			nom proposé : <b>Bayedha d'El-Kantara</b>			

<b>Sample F1</b>	Eldjebel	Bl/V	« GENOTYPE 7 » aucune, nom proposé : <b>Ineb El Djebel</b>	Algérie	18	/
------------------	----------	------	---	---------	----	---

### A. Cultivars étrangers

L'analyse des profils microsatellites a permis d'identifier une présence notable de cultivars de raisin étrangers de Méditerranée orientale surtout le Liban « Afus Ali », de pays Maghrébin comme la Tunisie « Rassegui » et le Maroc « Taferielt », de l'est de l'Europe exactement la Grèce « Muscat of Alexandria » et aussi de pays de Caucase, comme l'Arménie « Dabouki ». En outre, des cultivars de pays occidentaux comme la France « Danugue et Dattier de ST. VALLIER » et « le Cardinal » par exemple, originaire d'Amérique, ont été introduits. Cette diversité des cultivars confirme les données historiques qui faisant l'état d'introductions des multiples variétés à El-Kantara à partir de diverses régions au fil du temps.

Cependant, il est intéressant de noter que plusieurs variétés internationales de raisin ont été rebaptisées des noms locaux. Ces noms locaux sont probablement influencés par les pépinières qui fournissent ces cultivars ou par les agriculteurs locaux qui adoptent des noms familiers.

La plupart de ces noms sont directement liés à des caractéristiques morphologiques distinctives, principalement liées à la couleur ou à la forme de la peau des baies, au goût, ainsi qu'à l'origine géographique ou au nom du fournisseur de boutures de vigne. Notamment, de nombreuses accessions, en particulier celles collectées dans des vignobles abandonnés, n'avaient pas de nom et ont été étiquetées « anonymes »

Au cours de notre étude, nous avons constaté que le génotype « Dabouki B. » était le plus répandu dans la commune d'El-Kantara, où il était représenté par onze cultivars parmi les échantillons étudiés. La variété Dabouki est enregistrée dans les catalogues nationaux de la France, de l'Espagne et du Portugal pour la culture du raisin de table et elle est référencée sous l'ID 3309 dans le VIVC ([www.vivc.de](http://www.vivc.de)), où plusieurs pays sont cités, dont l'Arménie, comme pays d'origine.

Une recherche approfondie dans les études ampélographiques antérieures, notamment celles de Guillon en 1896 et de Viala en 1909, a révélé l'absence de résultats pertinents concernant la variété Dabouki. Selon l'étude de Guillon (1896), il existe quelques vignobles palestiniens, mais ils sont mal entretenus et produisent peu. Néanmoins, il est à noter la présence de cépages renommés, tels que la Vigne d'Ascalon, l'Assoued Kere et le Rouge de Palestine, ce qui corrobore l'hypothèse d'une présence de cépages d'origine palestinienne. Selon les

caractéristiques ampélographiques décrites par Guillon pour la variété Vigne d'Ascalon, celle-ci serait plus proche de la variété Dabouki. En revanche, l'étude de Viala (1909) a révélé que la variété palestinienne Vigne d'Ascalon était le cépage Zeni de Damas, un raisin blanc. Cependant, en arabe, le mot « Zeni » signifie « douceur ». Par ailleurs, l'étude de Basheer-Salimia et *al.* (2014) a montré que le dabouki est l'une des variétés les plus cultivées en Palestine, où son nom, « dabuki », signifie « douceur » en dialecte palestinien. On peut donc suggérer que cette variété est d'origine palestinienne et qu'elle a été nommée Vigne d'Ascalon.

Notre résultat est concordant avec celui de Rahali et *al.* (2019), qui a démontré que la région de Babar (wilaya de Khanchela) est principalement cultivée avec la variété de Dabouki. Cette région n'est pas éloignée de notre région d'étude, qui fait partie de la zone de l'Aurès. On peut donc dire que cette variété est la plus fréquemment cultivée dans la région de l'Aurès et dans le nord du Sahara. L'abondance de cette variété indique son importance en tant que variété emblématique pour l'ensemble de la région, suggérant ainsi un lien culturel et historique partagé au-delà des frontières.

Le deuxième cultivar le « Rassegui blanc » est représenté par 4 échantillons parmi les cultivars étudiés. C'est une variété Tunisienne originaire de Sicile ou de Pantelleria (Galet, 2000). Il est le cépage autochtone le plus répandu dans toutes les régions viticoles tunisiennes, appelé encore le Farrani, Sfaxi et M'guargueb (Ben Slimane, 2003 ; Snoussi et *al.*, 2015).

En revanche, deux échantillons sont identifiés comme appartenant au cultivar Afus Ali, d'origine libanaise. Le cultivar Afus Ali est l'un des cultivars les plus répandus dans les pays du bassin méditerranéen, avec 67 institutions détentrices et 253 synonymes ([www.vivc.de](http://www.vivc.de)). Le plus fréquemment cité est le Dattier de Beyrouth (Ghaffari et *al.*, 2013 ; Rahali et *al.*, 2019 ; Maraš et *al.*, 2020 ; Augusto et *al.*, 2021 ; Crespan et *al.*, 2021 ; Tello et *al.*, 2024). Dans notre région d'étude, la variété « Afus Ali » est également connue sous un autre nom : « Mestateouile », en raison de ses grosses baies allongées.

Des variétés d'origine française présumée ont été recensées, telles que Danugue (Raimondi et *al.*, 2015), qui représentée par trois échantillons et un seul échantillon de Dattier de ST. Vallier, ont été signalées dans notre région d'étude. Le Dattier de ST. Vallier est une variété de raisin de table blanc. Dans notre région d'étude, il est reconnu par le synonyme Kahela c'est-à-dire le noir, et ces deux variétés ont donc des baies de couleur différente, alors qu'elles sont de même génotype. Cette variation de couleur peut être causée par une mutation

somatique. Ce type de changement de couleur somatique est courant chez les cultivars de raisin de table (Lijavetzky et *al.*, 2006).

À la suite de l'analyse réalisée, il a été constaté que deux échantillons identifiés sont du « Muscat d'Alexandrie », une variété résiliente qui est sensible à l'humidité extrême, mais elle résiste à la sécheresse et aux climats chauds (Robinson, 2013). Il s'agit d'une variété blanche qui est cultivée dans de nombreuses régions viticoles à travers le monde, notamment dans le bassin méditerranéen, en Afrique du Sud, en Californie, en Australie et en Amérique du Sud, avec plus de 200 synonymes enregistrés (Galet, 2000 ; Robinson, 2013).

Parmi les variétés identifiées, nous avons trouvé un échantillon de génotype « Cardinal », cépage californien (États-Unis) historique obtenu par le croisement entre « Flame Tokay » (syn. « Ahmer Bou Amer ») et « Ribier » (syn. « Alphonse Lavallée ») (Akkak et *al.*, 2007). Dans notre région d'étude, ce cépage est connu sous le nom de « dattier », en raison de la forme et de la couleur de ses grappes, qui sont longues et foncées, semblables à des dattes.

Deux échantillons ont été identifiés comme appartenant à la variété « Farana noir » ou « Tafereilt ». La première caractérisation ampélographique du cultivar « Farana » de la région de Blida a été réalisée par Pulliat (1898). En outre, l'étude de Laidi et *al.* (2009) a révélé que les variétés « Aberkane », « Farana Noir » et « Amokrane » partageaient tous le chlorotype C. L'inclusion du cultivar « Farana Noir » dans ce groupe suggère son origine algérienne. Selon l'étude de Galet (2000) et l'étude de Laidi et *al.* (2013), le synonyme de « Farana Noir » est classé dans la catégorie des variétés algériennes. Néanmoins, le catalogue de (VIVC) le considère comme synonyme de « Tafereilt », une variété marocaine (code variété 12196 : <https://www.vivc.de>). En outre, « Farana Noir » est référencée dans la collection INRA Vassal sous le code 1905 (Zinelabidine et *al.*, 2014).

D'après l'étude de Rahali (2019), la variété « Azbib », connue dans la région d'Aurès, était considérée comme une variété marocaine sous le nom « Tafereilt ». Cependant, notre analyse a révélé une forte relation génétique entre les variétés algériennes identifiées « Azbib » et « Farana Noir » avec nos échantillons (voir Tableau 17). En effet, l'analyse a démontré que cinq des douze loci étudiés présentent une identité parfaite entre l'échantillon étudié et la variété « Azbib », et que les deux variétés sont identiques sur presque cinq allèles avec la variété Farana Noir. En revanche, une relation génétique très faible a été observée avec la variété marocaine « Tafereilt », ce qui suggère que le « Farana Noir » est d'origine algérienne.

**Tableau 17.** Comparaison entre les profils microsatellites des accessions algériennes analysées et des cultivars étudiés (Farana noir) dans ce travail avec des autres génotypes de vigne publiés.

	VV S2	VVM D5	VVMD 7	VVMD 25	VVMD 27	VVMD 28	VVMD 32	VrZAG 62	VrZAG 79	VMC 6E1	VMC 6G1	VMC NG4b 9
<b>Cultivar Farana noir selon l'Etude de Laiadi et al. (2009)</b>	137 143	240 240	250 254	245 259	183 194	261 263	253 263	200 204	260 260	/	/	/
<b>La variété Azbib selon l'étude de Rahali et al. (2019)</b>	133 135	238 240	249 249	243 245	194 194	237 263	253 273	193 203	256 256	141 165	191 191	176 176
<b>La variété Taferielt selon l'étude d'ELOualkadi et al. (2009)</b>	131 133	236 238	249 249	238 240	191 191	233 259	251 271	/	/	/	/	/
<b>La variété Taferielt selon l'étude de Ghaffari, et al. (2013)</b>	130 132	235 237	/	/	191 191	232 258	/	193 203	/	/	/	/
<b>Echantillon de Notre résultat</b>	133 135	240 242	249 249	239 241	195 195	234 260	252 272	194 204	257 257	141 165	191 191	176 176

### B. Cultivars algériens traditionnels

Dans notre région d'étude, on trouve des variétés autochtones algériennes identifiées, telles qu'Amokrane, Ahmers Bou Ahmers et Louali. Selon Galet (2000), Amokrane est une variété algérienne. Il s'agit d'un grand cépage de table blanc de Kabylie (FODIL, 1989), et c'est également le cultivar le plus apprécié en Algérie (Laiadi et al., 2009). Selon l'étude de Larnaud (1948), les premiers vignobles ont été plantés dans la colonie française d'Algérie vers 1830. En 2008, une variété nommée Amokrane Draa Mizen du Tizi Ouzou a été enregistrée à l'INRA Domaine de Vassal, Montpellier (Khouni et al., 2023). Dans notre région, il est appelé Baydha (blanc en dialecte local).

Ahmer Bou Ahmeur est également une variété traditionnelle d'origine algérienne qui s'est répandue dans le monde entier (Akkak et al., 2007). Selon les études de Borrego et al. (2002), Ibáñez et al. (2003), Laidi et al. (2009) et Zinelabidine et al. (2014), le même génotype est cultivé en Espagne sous différents noms : Royal Gordo, Teta de Vaca, etc. Il est également connu sous le nom de « Flame Tokay » (Ghaffari et al., 2014). Cette diffusion est probablement le résultat d'échanges culturels et matériels entre l'Afrique du Nord et la péninsule ibérique au cours de nombreux siècles.

En revanche, le génotype «Louali» a également été identifié dans notre région d'étude. Selon les études de Lacombe et al. (2013) et Riahi et al. (2010), ainsi que les données du

catalogue *IVC*, il s'agit d'une variété algérienne. Dans cette étude, nous avons trouvé que la variété Louali est totalement différente de l'Amokrane, qui n'est pas un synonyme de Louali. Ce résultat est concordant avec celui obtenu par l'étude de Khouni et *al.* (2023). En revanche, les résultats rapportés par Laiadi et *al.* (2009) ont montré que l'Amokrane est un synonyme de Louali (les deux variétés sont de même génotype), ce qui peut être expliqué par une erreur de plantation de la variété Amokrane dans la collection de germoplasme de Sékikda.

### C. Nouveaux génotypes identifiés

Au cours de notre étude, nous avons découvert et documenté de nouveaux génotypes de vigne portant des noms vernaculaires (sept profils génétiques différents correspondant à dix-neuf échantillons), qui n'avaient pas été observés auparavant dans la littérature académique et ne correspondaient à aucun profil stocké dans la base de données CREA ou dans *IVC*. Ces résultats démontrent la présence d'une diversité génétique unique et non documentée au sein du pool génétique de la vigne en Algérie, plus précisément dans la région d'El-Kantara.

Les accessions ont été nommées principalement en fonction de leur origine géographique (comme El Djebel, la montagne de Metelili), de caractéristiques morphologiques telles que la forme des baies (datté signifiant « les dattes », zitouna signifiant « l'olive »), etc., ou encore la couleur des baies (par exemple, le terme « Bayedha » signifie « blanc » et « Aïn Taher » signifie « baies noires, grandes comme les yeux beaux d'un homme », et Khadhera « vert »). D'autres encore portent des noms qui font référence à des caractéristiques distinctives, comme « Seouikiya » qui est lié à son goût sucré ou arôme de musc distinctif.

Il est intéressant de noter que de nombreux cultivars portaient des noms vernaculaires différents sur plusieurs sites de collecte (parfois jusqu'à deux noms pour le même génotype comme le génotype 5 et 3). En outre, un nombre important d'accessions portant le même nom, « kahela » (noir) ou « Aïn Taher », basé sur la couleur de la peau des baies, présentaient des génotypes distincts, comme les génotypes 1 (échantillon D21), 2 (échantillon B10) et 5 (échantillon D22). Cela souligne la nécessité d'une caractérisation génétique pour comprendre et conserver avec précision la diversité du vignoble de la région d'El-kantara.

La majorité des variétés est noire (8 échantillons), 3 échantillons sont blancs et il y a des variétés de couleur verte ou jaune (voir le tableau 16). Ces nouveaux génotypes devront être décrits ampélographiquement. Ils sont nommés comme suit (voir tableau 16).



L'une de ces nouvelles variétés, le génotype 1, qui a été représenté par six cépages, a été signalée dans notre étude. Nous lui proposons le nom « Aïn Taher ». Nous proposons également le nom « Ineb El Djebel » pour le génotype 7. D'après les données des profils SSR (voir le tableau 15), nous remarquons que les deux génotypes pourraient être liés à la variété «Danugue», car ils partagent la plupart des allèles de cette variété, avec neuf à onze allèles par locus pour chacun des douze marqueurs SSR. Les deux génotypes partagent également six marqueurs identiques et six allèles par locus des 12 marqueurs SSR étudiés.

En revanche, le deuxième génotype identifié est représenté par deux cépages : « le nom proposé : Ineb ganteri » et le génotype 4 « Seouikiya », qui pourraient être un lien parent-enfant avec la variété «Taferielt ou Farana noir », parce qu'ils partagent avec cette variété onze à seize allèles par locus pour chacun des 12 SSR étudiés (voir le tableau 15).

Concernant les génotypes 3, 5 et 6, nous proposons les noms suivants respectivement : « Datté ganteri », « Ineb Elzitouna » et « Bayedha d'El-Kantara ». Ceux-ci ont une forte relation génétique (père-enfant) avec la variété autochtone « Louali ». Ils partagent également presque tous les allèles des 12 marqueurs SSR étudiés.

La richesse de l'encépagement de la viticulture d'El-Kantara est attribuable à plusieurs facteurs climatiques et pédologiques favorables, ainsi qu'à l'influence historique de la région. Au cours des dernières décennies, l'intérêt pour la préservation et l'exploration des variétés locales, peu exploitées jusqu'alors, s'est significativement renforcé. En effet, la richesse génétique de la vigne représente un atout majeur pour faire face aux défis actuels auxquels est confrontée la viticulture (Wolkovich et *al.*, 2018). Ceci est particulièrement intéressant pour les variétés traditionnelles adaptées aux conditions semi-arides, car elles pourraient présenter des caractéristiques bénéfiques en vue de leur adaptation à la sécheresse et aux conditions climatiques plus chaudes (Zinelabidine et *al.*, 2014 ; Morales-Castilla et *al.*, 2020).

Ces nouveaux génotypes identifiés représentent probablement des cultivars autochtones mineurs, mais ils ont une importance locale et possèdent des caractéristiques précieuses, telles que la qualité des fruits et l'adaptation aux environnements locaux.

Selon les profils SSRs obtenus dans la présente analyse, Louali et Taferielt ou Farana noir, sont impliqués dans de nombreuses relations entre parents et descendants, pourraient avoir joué ce rôle.

### II.2.3. Analyses statistiques

#### II.2.3.1. Estimation de la diversité génétique

La diversité génétique des 51 cultivars étudiés a été évaluée à l'aide de 12 marqueurs nucléaires, comme le montre le (Tableau 18). Les indices de diversité génétique ont été calculés à l'aide du logiciel GenAlEx 6.5 (Peakall et Smouse 2006).

**Tableau 18.** Analyse statistique de 12 marqueurs SSR évalués dans 51 génotypes de vigne. HObs : LG = linkage group ; N. of obs : nombre de génotypes analysés pour calculer les statistiques ; No allèles : nombre de différents allèles ; Ne allèles : nombre effectif d'allèles ; Ho : Hétérozygotie observée ; He : hétérozygotie attendue ; F (Null) : probabilité d'allèles nuls ; HW = Hardy–Weinberg equilibrium : ns=non significatif, \* P<0,05 ; I : l'indice de Shannon ; PI : Probabilité d'identité ; Fis : Indice de fixation.

Locus	LG	N. of Obs	No Alleles	Ne Alleles	Ho	He	F(Null)	HW	I	PI	Fis
VVS2	11	51	9.000	6.612	0.889	0.849	-0.047	ns	2,006	0,041	-0,047
VVMD5	16	51	7.000	6.056	1.000	0.835	-0.198	ns	1,862	0,049	-0,198
VVMD7	7	51	6.000	3.580	0.722	0.721	-0.002	ns	1,454	0,121	-0,002
VVMD25	11	51	6.000	3.340	0.667	0.701	0.048	ns	1,385	0,140	0,048
VVMD27	5	51	5.000	3.393	0.722	0.705	-0.024	ns	1,367	0,131	-0,024
VVMD28	3	51	8.000	5.023	0.944	0.801	-0.179	ns	1,816	0,064	-0,179
VVMD32	4	51	7.000	3.560	0.722	0.719	-0.004	ns	1,507	0,122	-0,004
VrZAG62	7	51	6.000	4.629	0.833	0.784	-0.063	ns	1,620	0,080	-0,063
VrZAG79	5	51	9.000	4.378	0.722	0.772	0.064	*	1,808	0,073	0,064
VMC6E1	2	51	8.000	5.102	0.778	0.804	0.033	ns	1,769	0,067	0,033
VMC6G1	11	51	8.000	4.320	0.833	0.769	-0.084	*	1,667	0,088	-0,084
VMCNG4b9	6	51	8.000	4.947	0.833	0.798	-0.044	ns	1,812	0,067	-0,044
Mean			7.250	4.578	0.806	0.771			1,673		-0,042
Sum			87.000	54.941	9,667	9,256			20,074		
Cumulative										8,04E-14	

#### A. Le nombre d'allèles différents (No) et effectif d'allèles (Ne)

Le nombre d'allèles différents estimé dans cette étude est (87) observés aux 12 loci SSR analysés confirme le degré acceptable de diversité génétique des 51 cultivars. Soit une moyenne de 7.250 allèles par locus. Le nombre d'allèles différents (No) par locus SSR variait de 5 pour

VVMD27 à 9 pour VVS2 et VrZAG79. Cependant, le nombre effectif d'allèles ( $N_e$ ) par locus SSR varie de 3,340 pour VVMD25 à 6,612 pour VVS2. Dont, le moyen de nombre effectif d'allèles était légèrement faible (4,578), un résultat similaire à celui de l'étude réalisée par l'équipe de Rahali et *al.*, (2019) (nombre moyen de  $N_e = 4,727$  et de  $N_o = 7,000$ ) dont 37 accessions de vignes de la région Babar en Khenchela ont été analysées.

Alors que, l'étude de Khouni et *al.*, (2023), qui a analysé la diversité de 81 accessions conservées dans la collection de M'zejj Edchiche de Sekikda, appartenant à 43 espèces de *Vitis* a détecté environ 7 allèles par locus (nombre moyen de  $N_e$ ) avec un nombre élevé (149) d'allèles différents aux 12 loci SSR analysés (en moyenne 12,42), une quantité plus importante que celle observée dans cette étude. Cela montre que les accessions taxonomiquement plus larges contribuent à un plus grand nombre d'allèles.

### B. L'hétérozygotie attendue ( $H_e$ ) et observée ( $H_o$ )

Les hétérozygoties moyennes observées et attendues ( $H_o$  et  $H_e$ ) étaient respectivement de 0,806 et 0,771 (Tableau 18).  $H_e$  est inférieur à  $H_o$  pour la plupart des loci, cela suggère une grande diversité génétique au sein de cette population, caractérisée par un taux élevé de polymorphisme.

Concernant l'hétérozygotie attendue ( $H_e$ ), qui allait de 0,701 pour MD25 à 0,849 pour VVS2 avec une hétérozygotie moyenne attendue (77 %) inférieure à celle enregistrée pour de nombreuses collections algériennes avec 85% (Khouni et *al.*, 2023) et 86 % (Laiadi et *al.*, 2019), ainsi que pour d'autres collections telles que la collection Brésilienne avec 85 % (Schuck et *al.*, 2009) et Géorgienne avec 80,7 % (Maghradze et *al.*, 2010). Cependant, elle est similaire aux collections : turque (75%) (Boz et *al.*, 2011), arménienne avec 78,9 % (Margaryan et *al.*, 2021) et des régions du Maghreb, comme la collection marocaine avec 76 % (El Oualkadi et *al.*, 2009), Tunisienne avec 75.0% (Riahi et *al.*, 2010).

La plus faible hétérozygotie observée ( $H_o$ ), 0,667, a été détectée au locus VVMD25 et la plus élevée était de 1,000 au locus VVMD5, où l'hétérozygotie observée moyenne était de 80,6%. Les valeurs de l'hétérozygotie observée sont plus élevées que celles trouvées par certaines études antérieures sur les vignes, telles que 69,3 % au milieu du bassin méditerranéen pour 295 géotypes (De Michele et *al.*, 2019), 71,96 % en Afrique du Nord (région du Maghreb) pour 181 géotypes (Riahi et *al.*, 2012), plus élevé que 74,2 % en Asie centrale pour 1 378 géotypes (Riaz et *al.*, 2018) et 75 % au Brésil pour 410 géotypes (de Oliveira et *al.*, 2020).

### C. La fréquence de l'allèle nul F (null)

Ce paramètre a été calculé pour évaluer l'efficacité et le potentiel discriminant de chaque marqueur microsatellite. Il permet également de détecter certains problèmes d'amplification des allèles lors du génotypage ou de la suppression d'une séquence cible (De Oliveira et *al.*, 2020). Le F (nul) était particulièrement intéressant, car il était négatif pour 9 des 12 SSR et présentait des valeurs faiblement positives ont été trouvées pour les marqueurs SSR (VVMD25, ZAG79 et VMC6E1) (voir le tableau 18). Pour ces trois loci, le  $H_e > H_o$  avec le F (nul) était positif. Cette observation suggère qu'à ces loci, certains homozygotes apparents, un allèle étant présent et l'autre absent. De tels allèles nuls peuvent se produire lorsque des mutations empêchent la liaison des amorces à la région cible (Pollefeys et *al.*, 2003).

### D. Équilibre de Hardy-Weinberg (HW)

Les P-values associées à l'équilibre de Hardy-Weinberg sont :

- Le ns (non significatif) signifie qu'il n'y a pas de déviation par rapport à l'équilibre génétique pour ce locus.
- Le  $P < 0,05$  indique une déviation significative de l'équilibre de Hardy-Weinberg, suggérant l'existence de facteurs tels que la sélection, la dérive génétique, ou des effets de consanguinité.

Selon les résultats obtenus, la majorité des locus ne présentent pas de déviation significative par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg (indiqué par "ns"). Cela suggère que la population est bien mélangée, qu'il n'y a pas de sélection ou de dérive génétique marquée, à l'exception de quelques locus (ZAG79 et VMC6G1).

### E. L'indice d'information de Shannon (I)

L'indice de Shannon le plus élevé a été observé dans le locus VVS2 (2,006) et le plus bas dans le locus VVMD27 (1,367), avec une moyenne de 1,673 (Tableau 18). L'indice d'information de Shannon est un paramètre important qui reflète le niveau de polymorphisme. Cela indique une diversité allélique modérée à élevée.

### F. Indice de fixation (Fis)

La majorité des loci présentent des valeurs négatives ou proches de zéro pour le facteur (Fis), suggérant une faible ou inexistante consanguinité. Une valeur moyenne de -0,042 confirme ce faible niveau d'autofécondation. Cela suggère que la population étudiée est plus génétiquement diverse et mieux mélangée.

### G. La probabilité d'identité (PI)

La probabilité d'identité de la plupart des loci présente des valeurs légèrement variables, avec la plus élevée pour VVMD25 (0,140) et la plus faible pour VVS2 (0,041) (Tableau 18). Cette probabilité d'identité relativement faible indique une bonne capacité de discrimination entre les génotypes.

L'PI cumulative ou probabilité d'obtenir des individus présentant un profil identique aux 12 loci, a été estimée à  $8,04 \times 10^{-14}$ , ce qui indique une très faible probabilité que deux variétés différentes partagent le même génotype. Cette valeur de PI est supérieure à celle des études réalisées en Algérie :  $7,35 \times 10^{-18}$ , (Khouni et al., 2023), et  $3,4 \times 10^{-15}$  (Laiadi et al., 2009), ainsi qu'à celle en Sud d'Ombrie (Italie centrale)  $1,6 \times 10^{-15}$  (Zombardo et al., 2021). En revanche, elle s'avère inférieure à celle de la Bulgarie  $1,2 \times 10^{-8}$  (Hvarleva et al., 2004), et à celle de l'Espagne  $9,9 \times 10^{-12}$  (Ibáñez et al., 2003).

### H. Loci spécifiques

La fiabilité des microsatellites pour l'identification des cépages dépend de la probabilité d'identité (PI) (Paetkau et al., 1995). Dont, un SSR efficace pour discriminer les génotypes a des niveaux élevés d' $H_o$ , et des valeurs faibles de PI (Salayeva et al., 2010 ; Popescu et al., 2018).

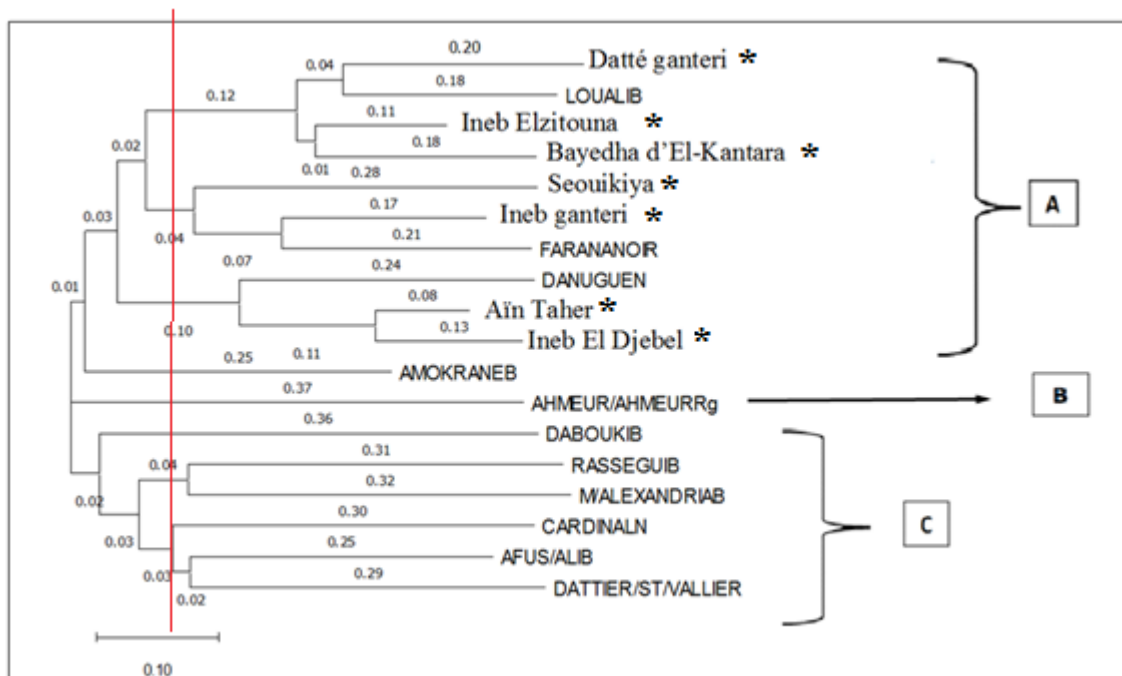
Les marqueurs VVS2, VVMD5 et VVMD28 ont présenté un niveau de diversité élevé, avec le locus VVS2 indiquant une hétérozygotie attendue ( $H_o = 0,889$ ) supérieure à la valeur moyenne de 0,806 et des valeurs de PI faibles (inférieures à celles des autres marqueurs). Cependant, les marqueurs SSR (VVMD5 et VVMD28) ont également montré une hétérozygotie observée ( $H_o$ ) supérieure à l'attendue ( $H_e$ ) :  $1,000 > 0,835$  et  $0,944 > 0,801$ , respectivement, ainsi que des valeurs de PI faibles, ce qui peut être un signe de sélection.

Alors que, les loci (ZAG79 et VMC6E1) présentent une hétérozygotie  $H_e > H_o$  avec le F (nul) était positif. Ces loci mériteraient toutefois une analyse approfondie pour comprendre les déviations potentielles.

Les données montrent une diversité génétique acceptable dans l'ensemble des 51 génotypes étudiés, avec une structure génétique équilibrée et une faible consanguinité.

### II.2.4. Résultats phylogénétiques

L'arbre phylogénétique de 18 génotypes est retracée au moyen du logiciel populations-1.2.32 à l'aide de l'algorithme Neighbor Joining, puis le logiciel MEGAX a été utilisé pour la visualisation de dendrogramme phylogénétique illustré dans la figure (08).



**Figure 08.** Dendrogramme illustrant les relations génétiques entre 18 génotypes pour les 12 locus microsatellites. Arbre obtenu à l'aide de l'algorithme NJ. (\*) : Nouvelles variétés identifiées.

La nette séparation entre les deux compartiments autochtones Algériens et méditerranéens confirme bien par les résultats de dendrogramme. Le résultat phylogénétique représente les relations génétiques entre 18 génotypes obtenus à partir de 12 SSR nucléaires, révèle parfaitement l'existence d'un niveau significatif de polymorphisme génétique qui amènent à

distinguer trois groupes de variétés (A, B, C) bien distincts, comprenaient respectivement, onze, une et six variétés, chaque groupe a été divisé en différents sous-groupes.

En effet, les individus de premier groupe « A » représentent toutes variétés autochtones et les nouvelles variétés identifiées dans la région d'El-Kantara, dont les indices de similarité de NJ sont compris entre 0,03 à 0,25. Ils sont regroupés en quatre clades bien distincts.

Le premier sous-groupe est composé de quatre variétés qui montrent des relations phylogénétiques très proches et importantes. Où il est clair que les trois nouvelles génotypes identifiés « Datté ganteri, Ineb Elzitouna et Bayedha d'El-Kantara » ceux-ci ont une forte relation génétique avec la variété « Louali » et ils partagent entre eux presque tous les allèles de 12 locus SSR étudiés. Ces relations sont confirmées par l'arbre dressé, où les indices de similarité de NJ sont compris entre 0,18 à 0,20 entre deux variétés « Datté ganteri et LOUALI » et 0,11 à 0,18 entre « Ineb Elzitouna et Bayedha d'elkantara ».

Alors que, les trois variétés « Ineb ganteri, Seouikiya et Farana noir ou Tafrielet » constituent un seul clade exprimant leur forte liaison génétique et cela confirme la relation parentale mentionnée précédemment.

Le troisième sous-groupe est représenté par trois variétés de plus forte similitudes « Aïn Taher et Ineb El Djebel » avec la variété française « Danugue ». Dans la base de données VIVC, 'Danugue' a une origine française (Variety number VIVC 3425) (<https://www.vivc.de>). Cependant, des autres études ont montré que danugue est apparenté à une variété espagnole « Breval negro » (Lauco *et al.*, 2018 ; D'Onofrio *et al.*, 2021).

Cependant, le Danugue n'avait pas été identifié jusqu'à présent dans le nord-est de l'Algérie (dans la collection de matériel génétique des vignes de M'zejj Edchiche à Sékikda), et dans le nord-ouest du pays (dans la station expérimentale de Teghennif de Mascara) (Liaidi *et al.*, 2009 ; Liaidi *et al.*, 2013 ; laidi *et al.*, 2019 et Khouni *et al.*, 2023). Cependant, cette variété a été identifiée uniquement dans la région d'Aurès (commune de Babar, Khanchela) par l'étude de Rahali (2019) et Yahiaoui (2024), qui a montré que la variété locale « Babari » présentait une forte affinité génétique avec le Danugue. En outre, dans notre étude, l'analyse des SSR positionne le Danugue au cœur du groupe de variétés locales nouvellement identifiées, soulevant ainsi des questions quant à son origine véritable : est-il originaire d'Algérie ou de France ?

Sa présence spécifiquement dans la région d'Aurès, où elle présente une relation génétique forte avec différentes variétés locales, suggère que cette région pourrait être son origine géographique. Le mouvement de ce cultivar de l'Afrique de nord vers la péninsule ibérique puis au centre d'Europe (comme la France), a été probablement apporté par les musulmans. Ce

résultat concorde avec ceux de Laiadi et *al.* (2009), qui ont prouvé que certains cultivars algériens avaient des génotypes identiques à ceux de cultivars ibériques bien connus, du fait de la longue histoire d'interaction et d'échange entre la péninsule ibérique et l'Algérie. Il faut confirmer cette hypothèse par des autres études de parenté (SNP, et des marqueurs microsatellites chloroplastiques, cpSSR) qui devraient être menées pour explorer la présence de ce cultivar dans la région d'Aurès.

Le quatrième sous-groupe est représenté par le cépage « Amokrane B » qui est décrits dans la littérature ampélographique comme un cultivar algérien autochtone (Galet, 2000 ; Laidi et *al.*, 2009). Ce cultivar est classé avec les variétés nouvellement identifiées donc ils pourraient être des parents proches.

Le deuxième groupe «B» est représenté par l'unique variété autochtone algérienne « Ahmer Bou Ahmeur Rg. » qui connue sous différents synonymes : d'Ahmar de Mascara , Angelina, Royal Gordo, Téta de Vaca, Flame Tokay, poussant en Afrique du Nord, en Europe, et en Amérique ( Hidalgo, 1991 ; Galet, 2000 ; Ibanez et *al.*, 2003 ; Akkak et *al.*, 2005 ; Akkak et *al.*, 2007 ; Laiadi et *al.*, 2009 ; Mena et *al.*, 2014 ; GOTO-YAMAMOTO et *al.*, 2013 ; Zinelabidine et *al.*, 2014).

Enfin, le troisième groupe « C » regroupe des échantillons hétérogènes de génotypes d'origine supposée différente. Parmi eux, « Dabouki », « Rassegui B », « Muscat Alexandria », « Cardinal », « Afus Ali » et « Dattier de ST. Vallier ». Dont, les indices de similarité de NJ sont compris entre 0,02 et 0,39. Ils sont regroupés en trois clades bien distincts.

Le premier sous-groupe est représenté par la seule variété « Dabouki ». D'après l'étude de Merheb et *al.*, (2024), la variété « Dabouki » est d'origine méditerranéenne orientale. L'abondance et la pertinence de cette variété, surtout dans la région d'Aurès, sont confirmées par nos résultats et par l'étude de Rahali et *al.*, (2019). Cela suggère un lien culturel et historique partagé à travers les frontières.

Un autre clade clair de cultivars de raisin blanc étroitement apparentés comprend « le Muscat Alexandria » et « Rassegui », dont l'indice de similarité NJ est compris entre 0,31 et 0,32. Cela pourrait suggérer une origine proche de la Méditerranée orientale pour ces cultivars liés au cépage « Heptakilo ». Lacombe et *al.*, (2013) ont montré que « Heptakilo » était à l'origine de diverses variétés. Selon les études de Ghaffari et *al.*, (2014) et Ghaffari et *al.*, (2013), le cultivar tunisien « Rassegui blanc » était présenté comme une descendance de « Mayorquin » (synonyme « Planta Fina ») et de « Heptakilo ». Tandis que le cultivar « Heptakilo » est l'un des parents du cultivar grec « Muscat d'Alexandrie ».



Le dernier sous-groupe des cultivars de table se compose de : « Cardinal », « Afus Ali » et « Dattier de St. Vallier ». L'étude d'El Oualkadi *et al.*, (2009) a confirmé la présence du cultivar « cardinal » dans le même clade que « Afus Ali » (ou dattier de Beyrouth).

### II.2.5. Comment l'histoire a-t-elle influencé la diversité des variétés dans cette région ?

Les résultats de l'identification génétique confirment que les relations historiques entre les différents pays du bassin méditerranéen comprenaient également des échanges de boutures de vigne entre ces régions. Le présent travail montre qu'il existe une grande différenciation génétique des cultivars identifiés dans la région d'El-Kantara. La plupart de ces cultivars (Afus Ali, Dabouki, Muscat of Alexandria et Rassegui) sont originaires de la région de la Méditerranée orientale. Cette constatation est confirmée par les résultats de Riahi *et al.* (2010), Laiadi *et al.* (2009) et Riahi *et al.* (2012), basés sur les marqueurs cpSSR et SNP. Ils supposent également que la plupart des cultivars nord-africains sont originaires de la région de l'Est européen.

Dans les pays du Maghreb, en particulier en Algérie, la viticulture a été historiquement caractérisée par une riche diversité de cépages locaux (Levadoux *et al.*, 1971). Depuis son expansion durant les périodes phénicienne, carthaginoise et romaine, cette culture est devenue une source de revenus au même titre que l'olivier et le figuier (Hamama *et al.*, 2014). En Algérie, la diversité des cépages est impressionnante (Laiadi *et al.*, 2009 ; Laiadi *et al.*, 2013 ; Rahali *et al.*, 2019 ; Khouni *et al.*, 2023). L'Algérie présente une richesse génétique qui reflète les multiples influences laissées par les différentes civilisations ayant marqué son histoire, telles que les Phéniciens, les Romains et les Musulmans. Parmi ces influences, les Phéniciens ont introduit et favorisé la culture de la vigne, un héritage qui a été ensuite consolidé et développé par les Romains en Afrique du Nord (El Oualkadi *et al.*, 2011).

La culture des arbres fruitiers et des légumes était une activité largement pratiquée par les sédentaires vivant autour de la Méditerranée. La Berbérie, grâce à ses conditions favorables, était particulièrement propice à ce type d'agriculture. Les Phéniciens, conscients de ce potentiel, ont joué un rôle clé dans le développement de l'arboriculture dans cette région. Bien que la vigne, l'olivier et le figuier soient des espèces indigènes, ce furent probablement les Phéniciens qui commencèrent à les cultiver de manière organisée. Ils introduisirent des variétés orientales, greffèrent les arbres sauvages, pratiquèrent la caprification sur les figuiers et appliquèrent les

techniques perfectionnées de l'arboriculture qu'ils maîtrisaient depuis des siècles. En Afrique, comme dans leur terre d'origine, ils produisaient du vin et de l'huile, témoignant ainsi de leur expertise agricole et de leur influence dans la région (Gsell, 1927).

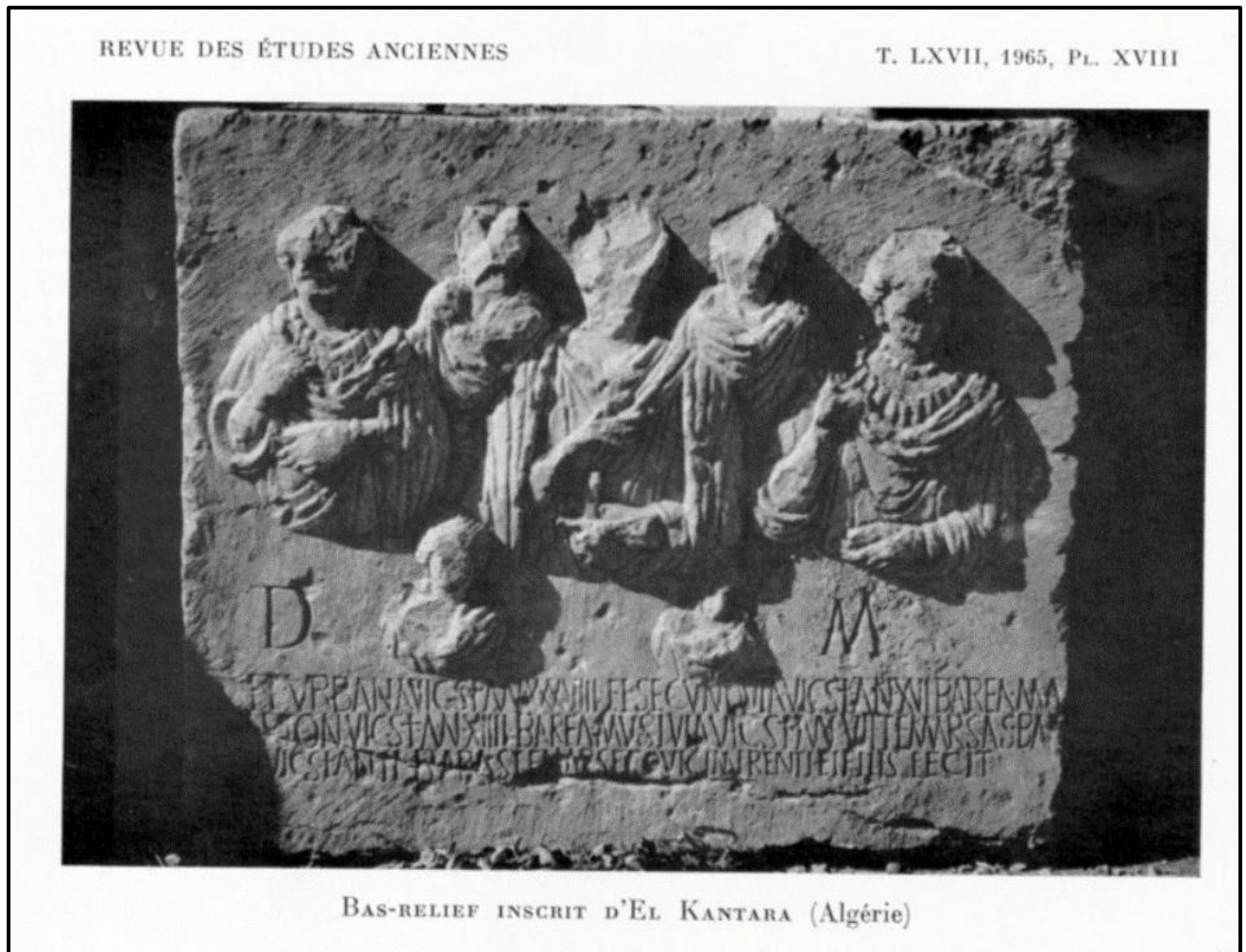
L'oasis d'El-Kantara a pris son nom d'un pont romain (*Calceus Herculis*) (Figure 09) (Morizot, 1998). Les vestiges romains se trouvent surtout en amont d'oasis et dans le Dachera qui a été établie sur un banc de grès conglomératique donnant sur la rivière (oued Elhay) et la palmeraie ; c'est le premier établissement. Un autre village, « le Gréteur », s'est formé au-delà de la palmeraie sur l'autre rive de l'oued (Hamouda et *al.*, 2011 ; Benseddik, 2012) .



Figure 09. Le pont romain (*Calceus Herculis*).

Il faut signaler que dès l'époque Romaine, l'Algérie cultivait des cépages tardifs, principalement destinés à la table, comme le « Muscat d'Alexandrie » que nous avons pu répertorier dans la région d'El-Kantara. Cette tradition culturelle a perduré et s'est maintenue facilement au fil des siècles, comme en témoignent plusieurs sources qui évoquent l'importance du vignoble algérien de table avant l'occupation française (Fodil, 1989).

Selon des études de l'histoire de cette région, *Calceus Herculis* c'est une petite ville de population mêlée : des Sémites, Puniques et Syriens et surtout les Palmyréniens établis au *Calceus* dans la deuxième moitié du II<sup>e</sup> siècle ap. J.C, d'une part, et des berbères de l'autre. Donc, El-Kantara a été présentée une société de villageois berbères romanisés et Sémites (Figure 10). Dont, elle a été aussi une centre de colonisation et de culture : des blés, des vignes, etc (Carcopino, 1933 ; Lassère, 1965).



**Figure 10.** Monument historique inscrit d'El-Kantara, qui est un texte funéraire concernant une famille syrienne de soldats Baras (Lassère, 1965).

En 682 après J.-C., Okba Ibn Nafaa et son armée se sont installés au sud de l'Algérie, au bord de la rivière, et ont fondé les premiers établissements grâce à la topographie des lieux et aux gorges qui leur offraient une sécurité et une source permanente d'eau, ainsi que des oasis. L'un de ces établissements portera plus tard le nom de Dachra dahraouia. Lors de la deuxième invasion, en 1048, des tribus berbères et arabes sont venues s'installer dans le sud-est de la Dachra, dans « le Gréteur », et donnant également naissance à un autre village appelé BorAbbas (Hamouda et *al.*, 2011).

L'influence arabe (les musulmans) durant cette période ne peut pas non plus être écartée, soit en apportant des cultivars orientaux de leur zone d'influence, comme nous avons obtenus dans notre région d'étude des variétés orientales telles que « Afus Ali, Dabouki, etc », et plus tard, après le retrait de la péninsule Ibérique, soit en ayant recours à des cultivars espagnols

(Berrada, 1999), avec un accent sur la production de raisins frais et de raisins secs (ISnard, 1951 ; Aldebert et Orsat, 1959). Donc, l'invasion musulmane mettra un terme à la production de vin, mais pas à la culture de la vigne pour la consommation de raisins de table et de raisins secs.

Au cours des siècles suivants, la vigne apparaîtra et disparaîtra périodiquement. Alors que, durant la période de colonisation française, pour s'installer, les européens ont choisis de s'établir au-delà des gorges vers le nord, dans un village appelé El-Ghousse. Ce site caractérisé par son éloignement par rapport aux villages autochtones, dont il est séparé par la gorge. Un climat plus frais et protégé des vents chauds venant du sud (Hamouda et *al.*, 2011). Durant cette période la viticulture algérienne a connu un très fort développement de vignes de cuve pour des raisons agro-économiques évidentes mais la viticulture de table n'est l'objet d'aucune sollicitude particulière. Pour cette dernière, le cépage prédominant à cette époque était le chasselas dont la production était destinée surtout aux exportations (Fodil, 1989).

En fin, la diversité de vignoble de la région d'El-Kantara s'explique par l'histoire ancienne de la région et par la succession de différentes civilisations et populations qui y ont exercé leur influence.

### **III.3. Etude ampélographique des nouvelles variétés identifiées**

#### **III.3.1. Etude des critères quantitatifs**

##### **III.3.1.1. Statistiques descriptives et diversité phénotypique des génotypes étudiés**

Les statistiques descriptives des caractéristiques ampélographiques des sept nouvelles variétés de vigne « Aïn Taher, Ineb ganteri, Datté ganteri, Seouikiya, Ineb Elzitouna, Bayedha d'El-Kantara et Ineb El Djebel » récupérées à El-Kantara sont présentées dans le tableau (19).

**Tableau 19.** Statistiques descriptives des caractéristiques morphologiques des génotypes étudiés : Les valeurs minimales, maximales, moyennes, l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV%).

Variable	Observations	Minimum	Maximum	Mean	±SD	CV%
OIV601	7	5.473	11.555	8.396	2.187	26.051
OIV602	7	4.591	9.766	6.949	1.745	25.118
OIV603	7	3.259	6.893	4.890	1.220	24.957
OIV604	7	1.801	3.979	2.736	0.700	25.592
OIV605	7	2.937	6.356	4.305	1.146	26.621
OIV606	7	2.544	6.006	3.787	1.155	30.498
OIV607	7	45.339	52.347	48.591	3.037	6.251
OIV608	7	46.529	57.075	50.292	3.830	7.616
OIV609	7	53.784	61.944	57.213	3.094	5.407
OIV610	7	54.764	64.771	58.288	3.369	5.780
OIV611	7	0.669	1.574	1.103	0.300	27.232
OIV612	7	0.384	1.132	0.737	0.270	36.624
OIV613	7	0.802	1.574	1.170	0.345	29.501
OIV614	7	0.327	0.771	0.542	0.172	31.701
OIV615	7	0.673	1.139	0.874	0.180	20.621
OIV616	7	4.818	7.045	5.915	0.887	15.003
OIV617	7	2.248	5.360	3.884	1.179	30.357

L'analyse révèle une variabilité phénotypique significative, reflétant soit la diversité génétique, soit les influences environnementales parmi tous les génotypes étudiés. Le coefficient de variation (CV %) varie de 5,407 % pour l'OIV 609 à 36,624 % pour l'OIV 612, ce qui donne un aperçu de la stabilité et de la variabilité des caractères entre les variétés étudiées.

Notamment, 12 des 14 caractères OIV ont atteint des valeurs de CV supérieures à 20 %, y compris OIV 606 (CV = 30,5 %), OIV 612 (36,6 %), OIV 613 (29,5 %), OIV 614 (31,7 %) et OIV 617 (30,4 %). Ces valeurs élevées de CV suggèrent une diversité considérable de ces caractères parmi les génotypes étudiés. L'OIV 612, en particulier, a montré la plus grande variabilité (CV = 36,6 %), indiquant un étalement substantiel des valeurs autour de sa moyenne (0,737). Ce degré élevé de variation peut refléter des différences génétiques sous-jacentes, ce qui fait de ces caractères des marqueurs potentiels pour distinguer les génotypes. Inversement, les caractères ayant des valeurs de CV plus faibles, tels qu'OIV 607 (6,3 %), OIV 608 (7,6 %), OIV 609 (5,4 %) et OIV 610 (5,8 %), étaient relativement cohérents entre les génotypes. Par



exemple, l'OIV 609, qui représente l'angle entre les nervures N3 et N4 des feuilles, avait une moyenne de 57,213 et un faible CV de 5,4 %, ce qui indique la stabilité de ce caractère parmi les géotypes. Ces caractères stables sont généralement moins influencés par les variations environnementales, ce qui les rend fiables pour la caractérisation de base dans les études phénotypiques, mais moins appropriés pour distinguer la diversité génotypique.

D'autre part, les caractères avec des valeurs de CV moyennes, comme l'OIV 616 avec 15,003 %, affichent une variabilité modérée, indiquant des caractères qui peuvent être modérément influencés par des facteurs environnementaux ou de légères différences génétiques.

En outre, les valeurs moyennes des caractères clés, associées aux écarts types, donnent un aperçu des tendances centrales et du degré de dispersion autour de la moyenne pour chaque caractère. Les caractères à forte dispersion, tels que OIV606 (moyenne = 3,787, écart-type = 1,155) et OIV612 (moyenne = 0,737, écart-type = 0,270) présentent des écarts-types relativement élevés, ce qui indique une dispersion considérable autour de la moyenne. Cette dispersion suggère que les géotypes individuels diffèrent sensiblement dans ces caractéristiques, peut-être en raison de la variabilité génétique ou de la plasticité phénotypique en réponse aux conditions environnementales.

Les facteurs environnementaux tels que la composition du sol, la disponibilité en eau, le degré de la salinité et l'état de la santé de la plante, influencent sur l'état et la croissance de la vigne, notamment sur ses feuilles (Cervera, et *al.*, 2001 ; Fisarakis et *al.*, 2001 ; Ferree et Streeter, 2004).

Selon les recherches de Maas (1990) ; McCarthy et *al.*, (1992), la vigne présente une sensibilité modérée à la salinité. Toutefois, l'étude de Shani et Ben-Gal (2005) a montré que la réponse des vignes à la salinité se fait par la réduction de la transpiration et de la croissance. Ce mécanisme a un effet sur la croissance de la plante.

L'étude de Schriener et *al.* (2012) a également mis en évidence l'impact du niveau de nutrition sur la croissance végétative, en particulier sur le limbe de la feuille.

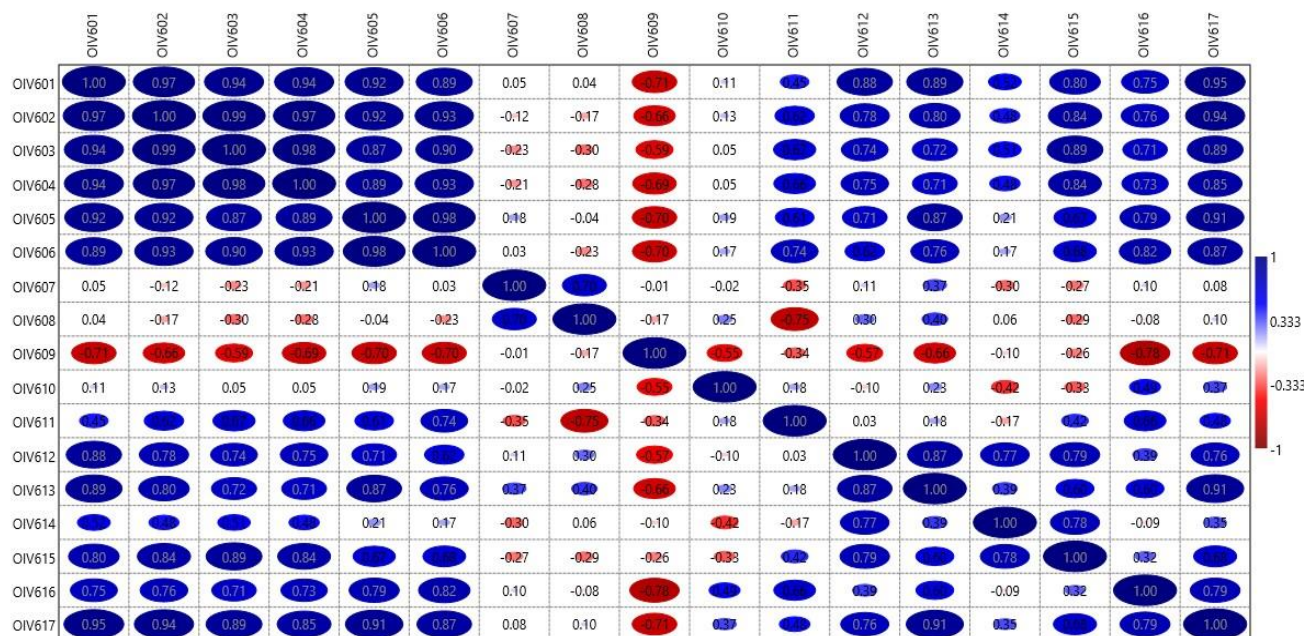
Les climats chauds et semi-arides se distinguent par leur faible pluviométrie. Les vignes soumises à un stress hydrique plus sévère présentent une croissance végétative plus faible, en particulier au niveau de la partie des feuilles (Sivritepe et *al.*, 2010).

En revanche, les caractères à faible dispersion, comme OIV609 (moyenne = 57,213, écart-type = 3,094) et OIV610 (moyenne = 58,288, écart-type = 3,369), présentent moins de variation autour de la moyenne, ce qui suggère que ces caractères sont relativement stables d'un génotype à l'autre. La faible dispersion autour des valeurs moyennes élevées indique que ces caractères peuvent représenter des caractéristiques morphologiques fondamentales qui sont conservées entre les variétés.

### III.3.1.2. Corrélations entre les variables

L'ensemble des données a permis de mettre en évidence des corrélations significatives entre les variables étudiées (figure 11). De très fortes corrélations positives existent entre les variables OIV 601 à OIV606 ( $r \approx 1$ ), indiquant probablement que ces caractères sont étroitement liés et peuvent être influencés par les mêmes gènes, les facteurs environnementaux ou par les conditions de croissance. Notamment, le caractère OIV 617 présente également de fortes corrélations positives avec les variables numérotées précoces ( $r \geq 0,85$ ). Par ailleurs, des corrélations positives modérées à fortes ( $r \approx 0,62$  à  $0,89$ ) apparaissent entre les caractères OIV 612 à OIV 616 et les caractéristiques mentionnées. D'autre part, les variables OIV 611 et OIV 614 présentent des corrélations positives modérées ( $r \geq 0,74$  et  $r \geq 0,52$  respectivement). À l'inverse, la variable OIV 610 présente des corrélations faibles ou nulles ( $r \geq 0,19$ ). Il est intéressant de noter qu'il existe des corrélations négatives élevées avec plusieurs autres variables. La présence de ces corrélations négatives implique des relations inverses. Par exemple, le caractère OIV 609 présente des corrélations négatives constantes avec les variables notées OIV 601 à OIV 606. Ce schéma suggère que lorsque l'angle entre les veines N3 et N4 (représenté par OIV 609) augmente, les longueurs des nervures N1, N2, N3 et N4, ainsi que la distance entre le sinus du pétiole et les sinus latéraux supérieurs et inférieurs de la feuille, ont tendance à diminuer. D'autres exemples de corrélations négatives incluent celles entre OIV 609 et OIV 616 ( $r = -0,78$ ) et OIV 609 et OIV 617 ( $r = -0,71$ ), ainsi que OIV 608 et OIV 611 ( $r = -0,75$ ).

En outre, les paires OIV 607 et OIV 608 présentent des corrélations faibles ou nulles avec la plupart des autres variables (valeurs de corrélation proches de 0 indiquées en blanc ou en couleur pâle), ce qui suggère des relations négligeables.



**Figure 11.** Matrice de corrélation de 17 caractères ampérométriques parmi les nouvelles variétés de vigne d'El-Kantara (Algérie).

### III.3.1.3. ACP des génotypes étudiés

L'analyse en composantes principales (ACP) réalisée pour la caractérisation ampélographique de nouveaux génotypes de vigne récupérés à El-Kantara (Biskra), sur la base de 17 caractères OIV. Cette analyse fait partie des méthodes statistiques multivariées utilisées dans les descriptions phénotypiques et la caractérisation morphologique de nombreuses espèces fruitières et de cultivars, notamment les génotypes d'olivier (*Olea europea* L.) (Tunç et al., 2024), de figuier (*Ficus carica* L.) (Abdelkader et al., 2023), le prunier (*Prunus domestica* L.), le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) (Alrashidi et al., 2023), ainsi que des études entrant dans le cadre de notre recherche (Alba et al., 2014 ; Labagnara et al., 2018 ; Akram et al., 2021 ; Güler et al., 2023 ; Sümbül et Yıldız, 2024).

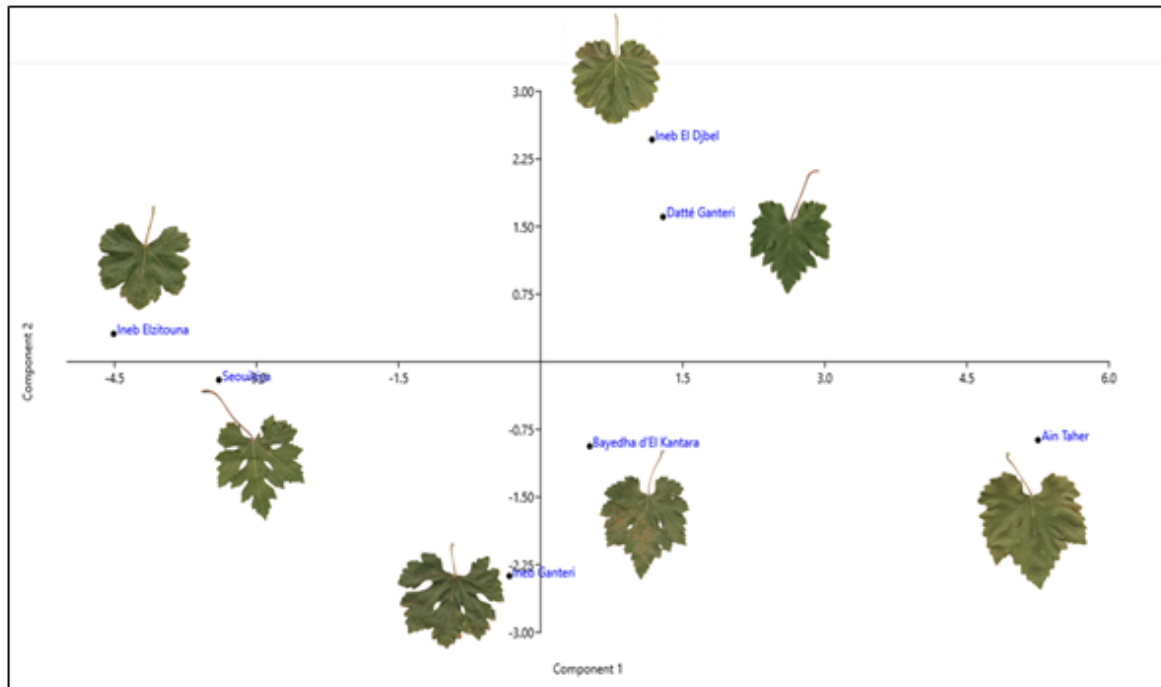
Il est intéressant de noter que nos résultats révèlent que les trois premières composantes expliquent une part importante de la variance des données (91 %). Cependant, les deux premiers axes (PC) ont été considérés comme significatifs pour les caractères étudiés. Plus précisément,



la PC1 représente 60,24 % de la variance totale, capturant les principales variations dans l'ensemble des données, tandis que la PC2 explique 16,03 % supplémentaires, ce qui porte la variance cumulée expliquée par les deux premières composantes à 76,27 %. Ce résultat est presque le double de la valeur obtenue par Bounab et Laiadi, (2019) sur la collection de germoplasme algérien où avec 108 descripteurs. Ainsi, il est beaucoup plus élevé que les résultats obtenus par Khalil et *al.* (2017), Chehade et *al.* (2022) et légèrement inférieur aux résultats de l'ACP obtenus par Gago et *al.* (2022).

Par conséquent, ces résultats suggèrent que la majeure partie de la variabilité des caractéristiques des feuilles peut être résumée à l'aide de deux dimensions seulement. La distribution des variétés est illustrée par un diagramme de dispersion en 2D (Figure 12). Le premier axe PC1 représente principalement la variabilité due aux caractères liés à la longueur des nervures (OIV 601, OIV602, OIV603 et OIV604). En outre, les caractères qui se réfèrent à la longueur du sinus pétiolaire aux sinus latéraux supérieurs et inférieurs des feuilles (OIV 605 et OIV 606). Nos résultats présentent des similitudes avec ceux de recherches antérieures menées par Labagnara et *al.* (2018), Bounab et *al.* (2019) et Gago et *al.* (2022).

D'autres caractères sont également pertinents sur cet axe, comme la longueur/largeur de la dent (OIV 612, OIV 613 et OIV 615), le nombre de dents (OIV 616), et distance entre l'extrémité de N2 et l'extrémité de la première nervure secondaire de N2 (OIV 617). Comme le rapportent Cunha et *al.* (2007), certains traits, tels que la taille de la feuille et la longueur des dents par rapport à leur largeur, sont des caractéristiques discriminantes des populations de vigne sauvage situées au Portugal.



**Figure 12.** Diagramme de dispersion bidimensionnel des deux premières composantes principales (PC1 et PC2) montrant la distribution des nouveaux génotypes de vigne sur la base de 17 caractéristiques ampérométriques des feuilles.

Des valeurs négatives aux valeurs positives de la PC1, les génotypes présentent des augmentations graduelles de la longueur des nervures, de la longueur du sinus du pétiole par rapport aux sinus latéraux supérieurs et inférieurs de la feuille, de la longueur/largeur de la dent, du nombre de dents et de la longueur entre l'extrémité de la dent de la N2 et l'extrémité de la dent de la première nervure secondaire de la N2. Par exemple, les génotypes situés du côté positif de la PC1, tels que Datté ganteri et Ineb El Djebel, présentent des valeurs élevées pour les caractères de longueur des nervures et de sinus du pétiole (OIV 601-606), ce qui indique que ces génotypes ont des nervures plus longues et des sinus plus profonds que les autres. Inversement, des génotypes comme Ineb ganteri et Bayedha d'El-Kantara, qui sont situés du côté négatif de l'axe PC1, sont caractérisés par des nervures plus courtes et des sinus pétiolaire moins profonds.

Le deuxième axe PC2 présente des variables relatives aux angles (OIV 607 et OIV 608), à la longueur de la nervure N5 (OIV 611). Ce résultat est en accord avec celui obtenu par Gago *et al.* (2022). Des valeurs négatives aux valeurs positives de PC2, les génotypes montrent des augmentations graduelles de la taille des angles et de la longueur de la nervure N5. Par exemple,

les génotypes Seouikiya et Ineb Elzitouna, qui se situent à une position inférieure sur le PC2, présentent des angles plus petits et de longueur de nervure plus courte (N5). En revanche, le génotype Aïn Taher, situé plus haut sur la PC2, présente des angles plus ouverts et de nervure N5 plus longues.

### III.3.2. Etude des critères qualitatifs

#### III.3.2.1. Identification des caractères ampélographiques des nouvelles variétés identifiés

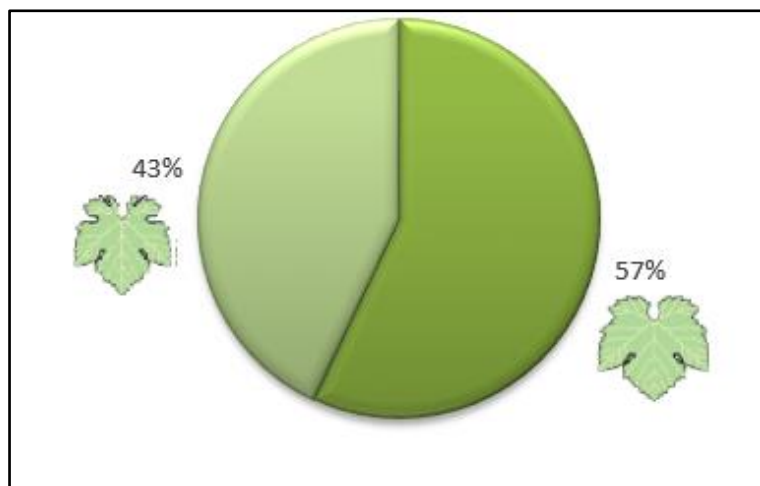
La caractérisation des nouvelles variétés s'appuie sur les critères qualitatifs examinés, comme l'illustre le tableau (20), OIV 067 (forme du limbe), OIV 068 (nombre de lobes) , OIV 076 (forme des dents), OIV 093 (longueur de pétiole), OIV 080 (forme de la base du sinus pétiolaire), OIV 079 (degré d'ouverture du sinus pétiolaire), OIV 081-1 (dents dans le sinus pétiolaire), OIV 070 (distribution de la pigmentation anthocyanique des nervures principales de la face supérieure du limbe), alors que sur la face inférieure du limbe c'est OIV 071, la densité des poils couchés OIV 084 / dressés OIV 085 entre les nervures principales sur la face inférieure du limbe ; les poils couchés OIV 088 / dressés OIV 089 sur les nervures principales sur la face supérieure du limbe, densité des poils couchés OIV 090/ dressés OIV 091 sur le pétiole. Dans les étapes à venir, nous examinerons chaque caractère individuellement.

**Tableau 20.** Paramètres qualitatifs observés sur la feuille adulte de nouvelles variétés locales selon le catalogue d'OIV.

	OIV 067	OIV 068	OIV 076	OIV 093	OIV 080	OIV 079	OIV 081- 1	OIV 082	OIV 094	OIV 083- 2	OIV 070	OIV 071	OIV 084	OIV 085	OIV 088	OIV 089	OIV 090	OIV 091
<b>Aïn Taher</b>	2	2	3	3	1	3	1	1-4	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Ineb ganteri</b>	2	4-5	3	3	1	3	1	4	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Datté ganteri</b>	3	3	3	3	1	3	1	1	1-3-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1-5
<b>Seouikiya</b>	3	3	3	3	1	3	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Ineb Elzitouna</b>	2	3	2	3	3	3	1	1	1-3-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Bayedha d'El-Kantara</b>	2	3	2	3	2	3	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	3	1
<b>Ineb ELDjebel metlili d'El-Kantara</b>	2	2	3	3	3	3	1	4	3	1	1	1	1	5	9	1	1	3

### III.3.2.1.1. Forme de limbe (OIV 067)

Conformément au catalogue l'OIV, le caractère forme de limbe de la feuille adulte (OIV 067) a été classé selon l'échelle suivant : le niveau (1) la forme de la feuille est cordiforme, le niveau (2) la feuille a une forme cunéiforme, le niveau (3) la forme de feuille est pentagonale, le niveau (4) elle est de forme orbiculaire, alors que le dernier niveau (5) elle est de forme réniforme. Selon les résultats obtenus, nous avons identifié deux catégories de cépages (Figure 13), les cépages (Aïn Taher, Ineb ganteri, Ineb Elzitouna, Bayedha d'El-Kantara et Ineb ELDjebel) présentant une forme cunéiforme constituaient 56% du total, alors que 44% (Datté ganteri et Seouikiya) avaient une forme pentagonale.

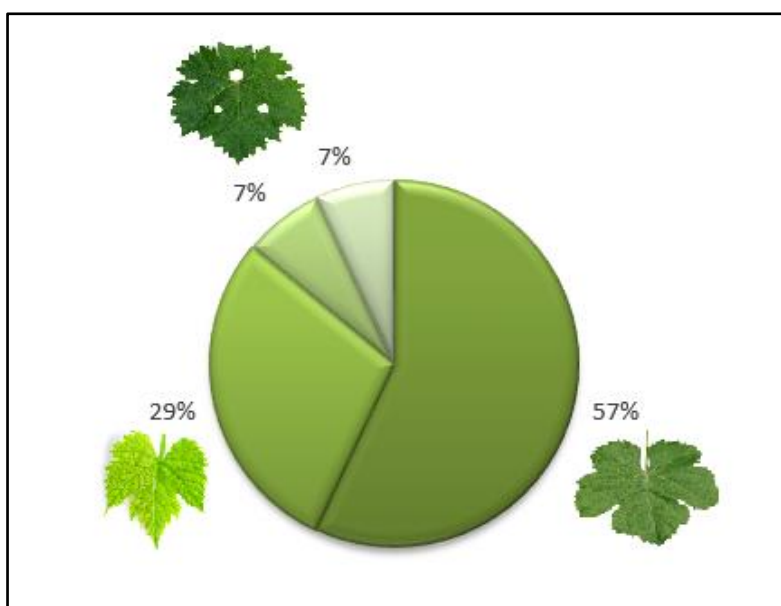


**Figure 13.** Forme de limbe des échantillons étudiés.

### III.3.2.1.2. Nombre de lobes (OIV068)

Selon le catalogue d'OIV, le caractère de nombre de lobes (OIV 068) s'exprime en cinq niveaux comme suit : le premier niveau (1) la feuille est complète, le deuxième niveau (2) la feuille a trois lobes, le troisième niveau (3) la feuille a cinq lobes, le quatrième niveau (4) la feuille a sept lobes, et le dernier niveau (5) la feuille a plus de sept lobes.

D'après nos résultats (Tableau 20), la plupart des variétés locales (57 %) ont en moyenne cinq lobes dans le limbe. Les variétés Aïn Taher et Ineb El Djebel ont, quant à elles, trois lobes. Cependant, la variété Ineb ganteri a sept lobes ou plus de sept (Figure 14).

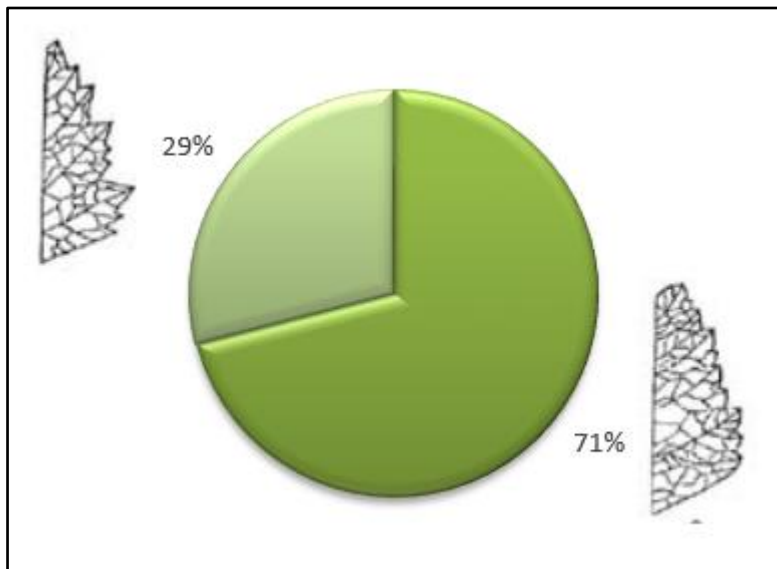


**Figure 14.** Le nombre de lobe des génotypes étudiés.

### III.3.2.1.3. Forme des dents (OIV 076)

Selon le catalogue OIV, la forme des dents de la feuille adulte est classée comme suit : le premier niveau (1) est une dent concave, le deuxième niveau (2) est une dent rectiligne, le troisième niveau (3) est une dent convexe, le quatrième niveau (4) est une dent convexe d'une côté et concave de l'autre, et le cinquième niveau (5) est une combinaison des deuxième et troisième niveaux.

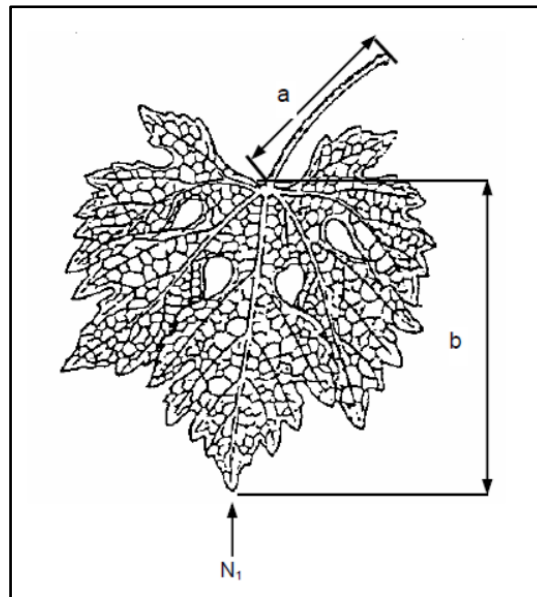
La majorité des variétés étudiées (71 %) adoptent le troisième niveau avec une dent à faces convexes, tandis que les autres (29 %) ont une dent de forme rectiligne, comme dans les deux variétés Ineb Elzitouna et Bayedha d'El-Kantara (Figure 15).



**Figure 15.** La forme des dents de la feuille adulte des nouvelles variétés identifiées.

### III.3.2.1.4. Longueur de pétiole (OIV093)

Toutes les variétés nouvellement identifiées ont un pétiole légèrement plus court par rapport à la longueur de la nervure médiane (N1) (Figure 16).



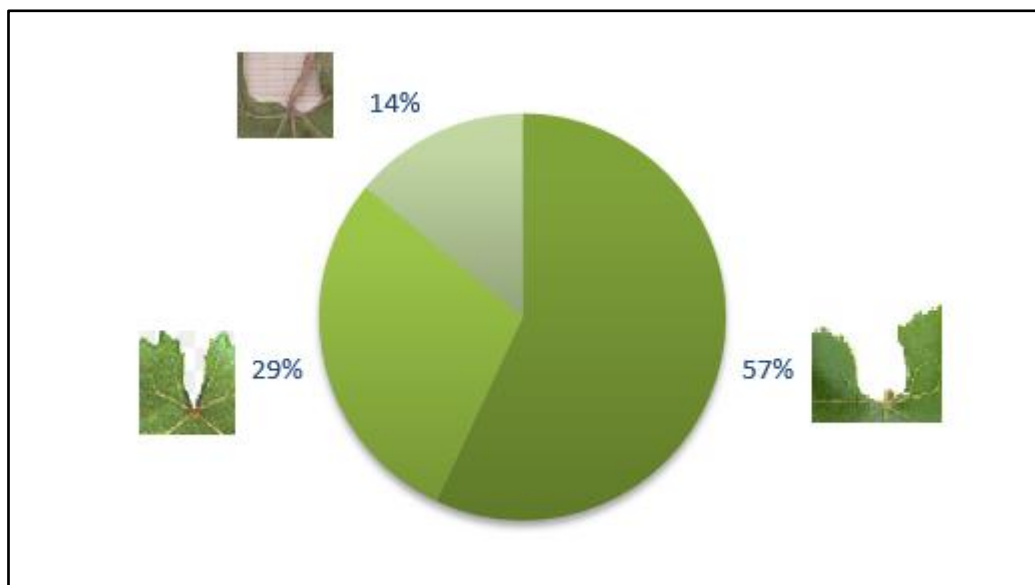
**Figure 16.** Longueur du pétiole par rapport à la longueur de la nervure médiane. a = Longueur du pétiole, b = Longueur de la nervure médiane N1 (a un peu court que b = notation 3). (OIV, 2009)

### III.3.2.1.5. Caractéristiques qualitatives liées au sinus pétiolaire

#### A. Forme de la base du sinus pétiolaire (OIV 080)

Selon l'échelle de l'OIV, la forme de l'ouverture de la base du sinus dans les feuilles adultes prend trois formes : en forme de U au premier niveau (1), en forme de « { » au deuxième niveau (2) et en forme de V au troisième niveau (3).

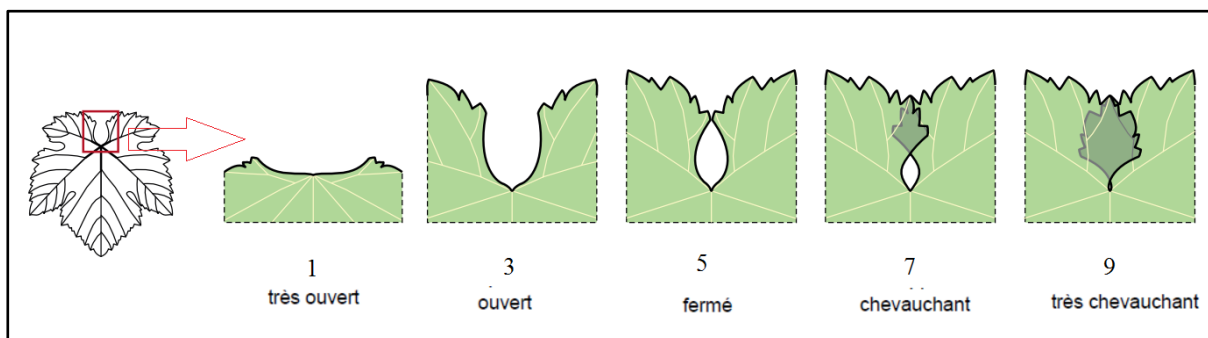
Les résultats obtenus (Figure 17) montrent que les variétés suivantes, « Aïn Taher, Ineb ganteri, Datté ganteri et Seouikiya », ont la forme d'un « U » à la base du sinus pétiolaire. Alors que, les deux variétés « Ineb Elzitouna et Ineb ElDjebel » ont une forme en « V » de la base du pétiole. Cependant, le deuxième niveau est représenté par la seule variété « Bayedha d'El-Kantara ».



**Figure 17.** Forme de la base du sinus pétiolaire des différents cultivars étudiés.

### B. Degré d'ouverture de sinus pétiolaire (OIV 079)

Après avoir examiné ampélographiquement le degré d'ouverture du sinus pétiolaire des feuilles adultes. Nous avons remarqué que toutes les variétés nouvellement identifiées présentent un sinus pétiolaire ouvert (Figure 18).



**Figure 18.** Feuille adulte : Degré d'ouverture / chevauchement du sinus pétiolaire  
(<https://www.plantgrape.fr/fr>).

### C. Dents dans le sinus pétiolaire (OIV 081-1)

Ce critère ne comporte que deux niveaux, basés sur l'absence ou la présence de la dent dans le sinus pétiolaire, selon l'expression du premier niveau (1) à la présence de la dent, et du second niveau (9) à son absence. Nous pensons que ce dernier niveau est rare, c'est pourquoi l'OIV en a fait une référence importante : seule la présence d'au moins une dent dans les dix



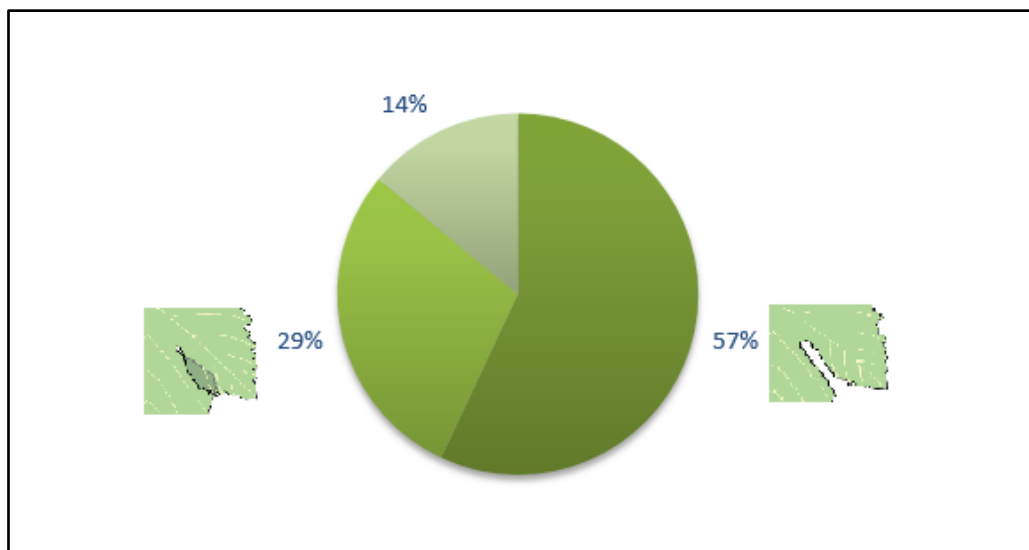
répétitions recommandées lors de l'étude de ce critère permet d'atteindre ce niveau. Suite à cela, une seule variété « Seouikiya » a été enregistrée avec la présence d'une dent dans la base du sinus pétiolaire. Alors que, les autres variétés nouvellement identifiées ne présentent pas de dent dans le sinus pétiolaire.

### III.3.2.1.6. Caractéristiques qualitatives liées aux sinus latéraux supérieurs

#### A. Etude de degré d'ouverture / chevauchement des sinus latéraux supérieurs (OIV 082)

Selon le catalogue (OIV, 2009), ce critère est résumé en cinq niveaux respectivement : sinus ouvert (1), sinus fermé (2), sinus légèrement chevauchant (3), sinus fortement chevauchant (4) ou absence du sinus latéraux supérieurs (5).

Selon ce critère, les variétés « Datté ganteri, Seouikiya, Ineb Elzitouna et Bayedha d'El-Kantara » présentent des sinus latéraux ouverts, alors que les autres variétés locales, « Ineb ganteri et Ineb ElDjebel », présentent des sinus latéraux fermés, mais très chevauchants. Parfois, le degré d'ouverture des sinus latéraux varie même au sein d'un même cultivar, comme le montrent les feuilles d'un cultivar « Aïn Taher » dont le sinus présente des variations allant de l'ouverture à la fermeture et à l'état très chevauchant (Figure 19).

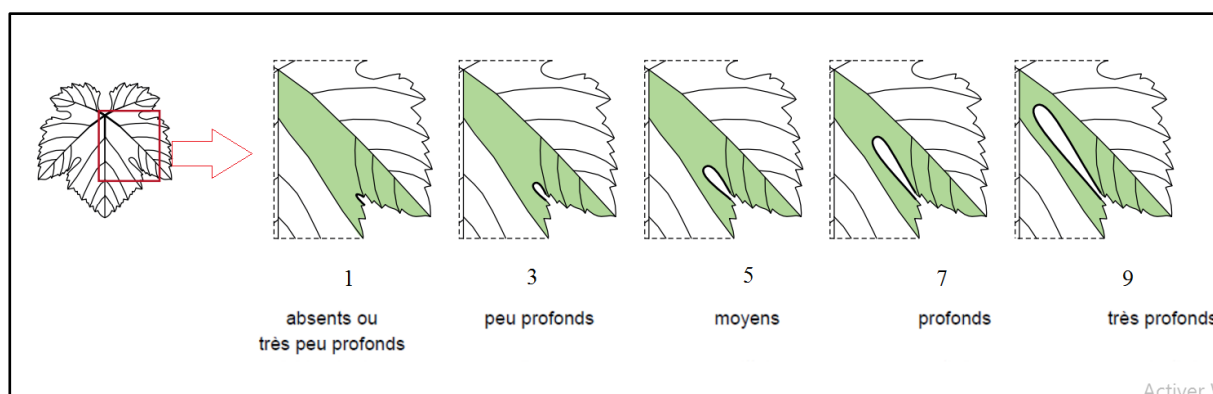


**Figure 19.** Degré d'ouverture / chevauchement des sinus latéraux supérieurs des différents cultivars étudiés.

## B. Etude de profondeur des sinus latéraux supérieurs (OIV 094)

La profondeur des sinus latéraux supérieurs de la feuille adulte est exprimée sur une échelle à cinq niveaux (Tableau 20). Le premier niveau (1) exprime l'absence de sinus ou un sinus très petit, tandis que le deuxième niveau (3) exprime des sinus moins profonds. Le troisième niveau (5) correspond à la séparation entre des sinus moyennement profonds et moins profonds. Le quatrième niveau (7) et le cinquième (9) correspondent respectivement à des sinus profonds et très profonds.

Il s'avère que la profondeur des sinus des variétés locales nouvellement identifiées varie considérablement (Figure 20), peut-être plus que pour n'importe lequel des critères précédents. Nous commençons par la variété « Seouikiya » dans laquelle les sinus sont très peu profonds, puis les variétés les plus proches « Aïn Taher, Bayedha d'El-Kantara et Ineb ElDjebel », dont les sinus sont légèrement profonds selon le deuxième niveau de cette description. Alors que, les deux variétés « Datté ganteri et Ineb Elzitouna » se caractérisent par des sinus très peu au moyennement profonds.



**Figure 20.** Les différentes profondeurs des sinus latéraux supérieurs (OIV 094) dans la feuille adulte (<https://www.plantgrape.fr/fr>).

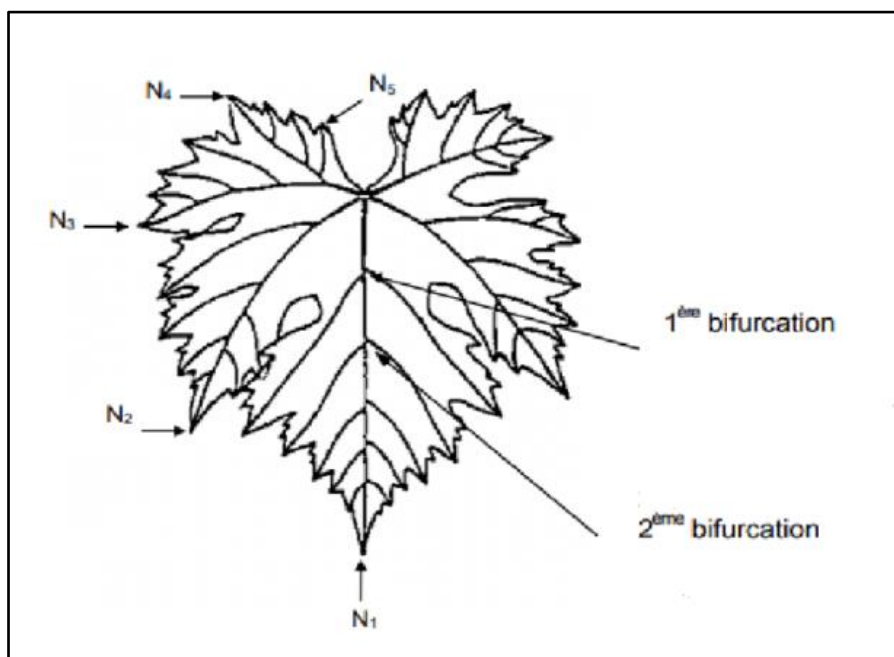
## C. Etude la présence ou l'absence des dents dans les sinus latéraux supérieurs (OIV 083-2)

Comme pour l'ouverture du sinus pétiole, ce critère ne comporte que deux niveaux, avec soit l'absence de dent dans les sinus latéraux (niveau 1), soit la présence d'une dent dans les sinus (niveau 9). Dont, Les sept nouvelles variétés identifiées ont ainsi en commun l'absence de dent dans les sinus latéraux supérieurs.

### III.3.2.1.7. Caractéristiques qualitatives liées à la distribution de la pigmentation anthocyanique (OIV 070/ OIV 071)

La distribution de la pigmentation anthocyanique des nervures principales (N1, N2, N3, N4 et N5) (Figure 21) sur la face supérieure (OIV 070) ou la face inférieure (OIV 071) du limbe est exprimée sur une échelle à cinq niveaux selon la méthode de l'OIV (2009). Le premier niveau (1) exprime l'absence de pigmentation anthocyanique, tandis que le deuxième niveau (2) exprime la présence de pigmentation uniquement au point pétiole. Le troisième niveau (3) correspond à la présence de pigmentation anthocyanique jusqu'à la première bifurcation. Le quatrième niveau (4) correspond à la présence de pigmentation jusqu'à la deuxième bifurcation, et le cinquième (5) à la présence de pigmentation au-delà de cette dernière (voir la figure 21).

Lors de l'examen microscopique (sous loupe), nous avons remarqué l'absence de pigmentation anthocyanique sur les nervures principales des deux faces du limbe pour toutes les nouvelles variétés identifiées.



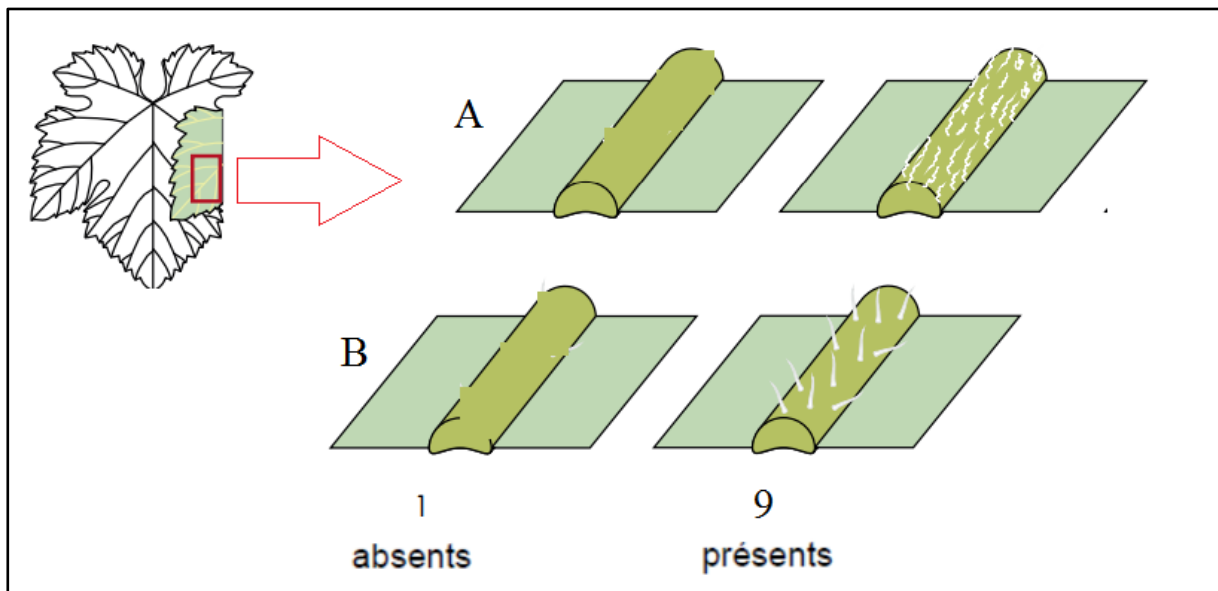
**Figure 21.** Schéma représente les nervures principales de la feuille adulte de la vigne (OIV, 2009).

### III.3.2.1.8. Caractéristiques qualitatives liées aux poils couchés / dressés

#### A. Etude des poils couchés (OIV 088) /dressés (OIV 089) sur les nervures principales de la face supérieure du limbe

Ce critère ne comporte que deux niveaux, avec soit l'absence des poils couchés/dressés (niveau 1), soit la présence des ces poils sur les nervures principales de la face supérieure du limbe (niveau 9) (Figure 22).

D'après nos observations, nous avons remarqué que l'absence de poils couchés, voire dressés, sur les nervures principales de la face supérieure du limbe concernait presque toutes les variétés locales nouvellement identifiées. Cependant, les feuilles de la variété « Ineb ELDjebel » qui se caractérise par la présence des poils couchés sur sa face supérieure.



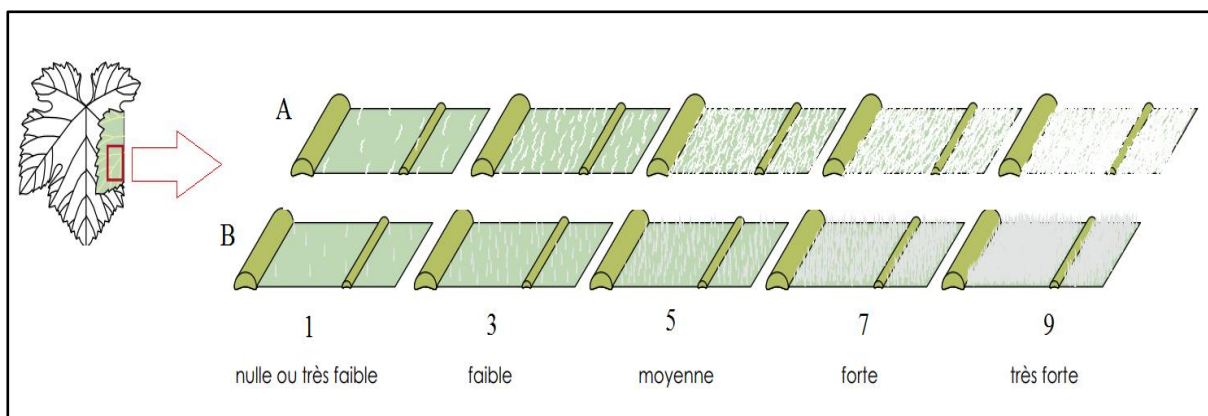
**Figure 22.** Schéma représente la densité des poils couchés (A) / dressés (B) sur les nervures principales (extrait de site : <https://www.plantgrape.fr/fr>).

#### B. Etude de la densité des poils couchés (OIV 084) /dressés (OIV 085) entre les nervures principales de la face inférieure du limbe

La densité des deux poils couchés (OIV 084) ou dressés (OIV 085) entre les nervures principales de la face inférieure du limbe est exprimée sur la même échelle à cinq niveaux selon la méthode de l'OIV (2009) (Figure 23). Le premier niveau (1) exprime l'absence ou une très faible densité de poils entre les nervures principales, tandis que le deuxième niveau (3) indique une faible densité de poils. Le troisième niveau (5) correspond à une présence moyenne des

poils. Le quatrième niveau (7) désigne une forte présence de poils, et le cinquième (9) une très forte présence de poils.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux observés sur la face supérieure du limbe. Presque toutes les nouvelles variétés se caractérisent par l'absence de poils couchés et dressés entre les nervures principales de la face inférieure du limbe, à l'exception de la variété « Ineb ELDjebel » qui présente une densité moyenne de poils dressés.



**Figure 23.** Schéma représente la densité des poils couchés (A) / dressés (B) entre les nervures principales sur la face inférieure du limbe (<https://www.plantgrape.fr/fr>).

### C. Etude de la densité des poils couchés (OIV 090) /dressés (OIV 091) sur le pétiole

Selon le catalogue OIV (2009), le critère de la densité des poils couchés (OIV 090) et dressés (OIV 091) sur le pétiole comporte cinq niveaux différents. Le premier niveau (1) désigne l'absence ou une très faible densité de poils sur le pétiole, le deuxième niveau (3) représente une faible densité de poils, le troisième niveau (5) correspond à une densité moyenne de poils, le quatrième niveau (7) indique une densité élevée, alors que le cinquième niveau (9) exprime une très forte densité de poils.

Selon les résultats obtenus (Tableau 20), montre que l'absence des poils couchés dans tous les cultivars étudiés, à l'exception la variété « Bayedha d'El-Kantara » représente des poils couchés sur le pétiole.

Concernant la présence de poils dressés sur le pétiole, les résultats des observations varient considérablement plus que pour le critère précédent. Nous avons remarqué que cinq

variétés ne présentent pas de poils dressés : « Aïn Taher, Ineb ganteri, Seouikiya, Ineb Elzitouna et Bayedha d'El-Kantara », alors que la variété « Datté ganteri » présente une densité faible à moyenne de poils dressés sur le pétiole. La variété « Ineb EIDjebel » se caractérise, quant à elle, par une faible densité de poils dressés sur le pétiole.

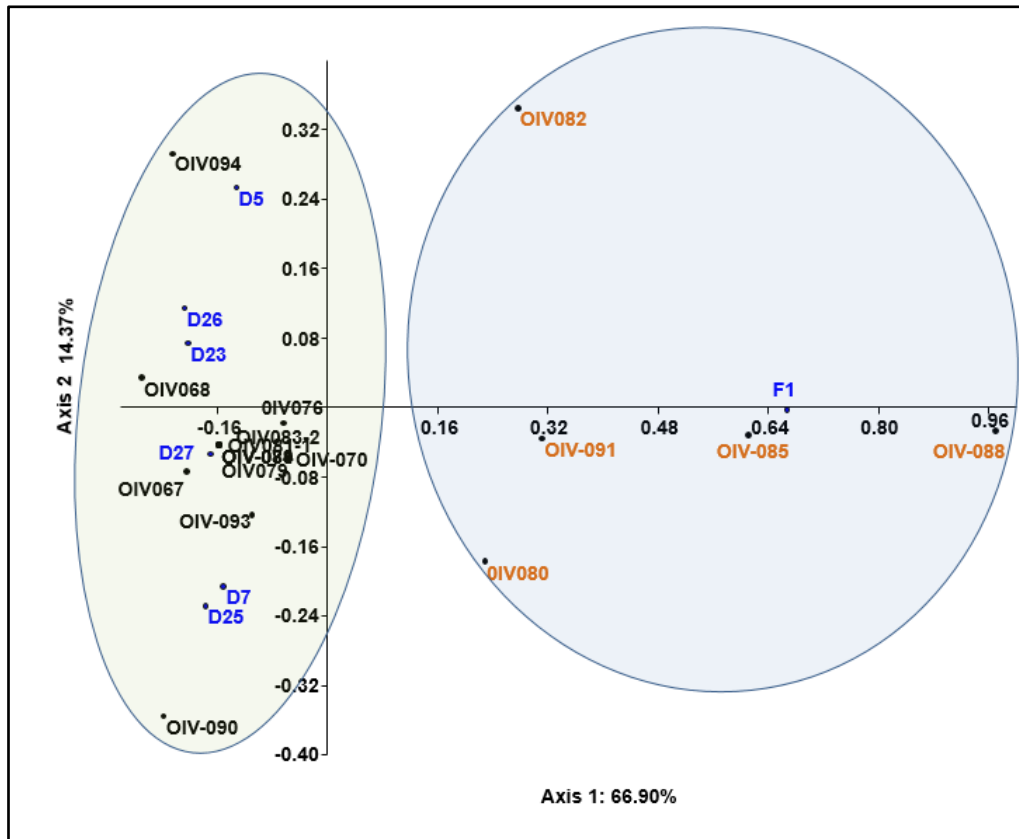
### III.3.2.2. Reconnaissance des assemblages des variétés nouvellement identifiées par l'AFC et CAH

Dans le cadre de notre étude, nous avons opté pour une approche méthodologique rigoureuse, impliquant l'utilisation de la méthode factorielle des correspondances multiples (AFCM ou AFC). Cette approche nous permet d'effectuer une analyse multidimensionnelle approfondie, et de décrire les relations et les oppositions entre les différentes variables étudiées. Nous avons pris dans cette analyse 18 variables qualitatives (voir le tableau 20).

L'axe F1 détient 66,90 % de l'inertie totale. L'axe F2 exprime quant à lui 14,37 % de l'information totale. L'analyse AFC révèle un nuage de points plus ou moins structuré en deux entités (voir la figure 24) :

**L'ensemble 1** est situé du côté droit de la projection. Il est composé de la seule variété F1 (Ineb EIDjebel) qui se caractérise par des critères qualitatifs totalement différents des autres variétés, surtout les deux descripteurs OIV085 et OIV088 qui sont la présence de poils couchés ou dressés sur la face inférieure ou supérieure du limbe.

**L'ensemble 2** mélange toutes les autres variétés (Bayedha d'El-Kantara, Datté ganteri, Ineb elzitouna, Ineb ganteri, Seouikiya et Aïn Taher) qui sont concentrées dans la partie gauche de la projection, montrant leur forte homogénéité.



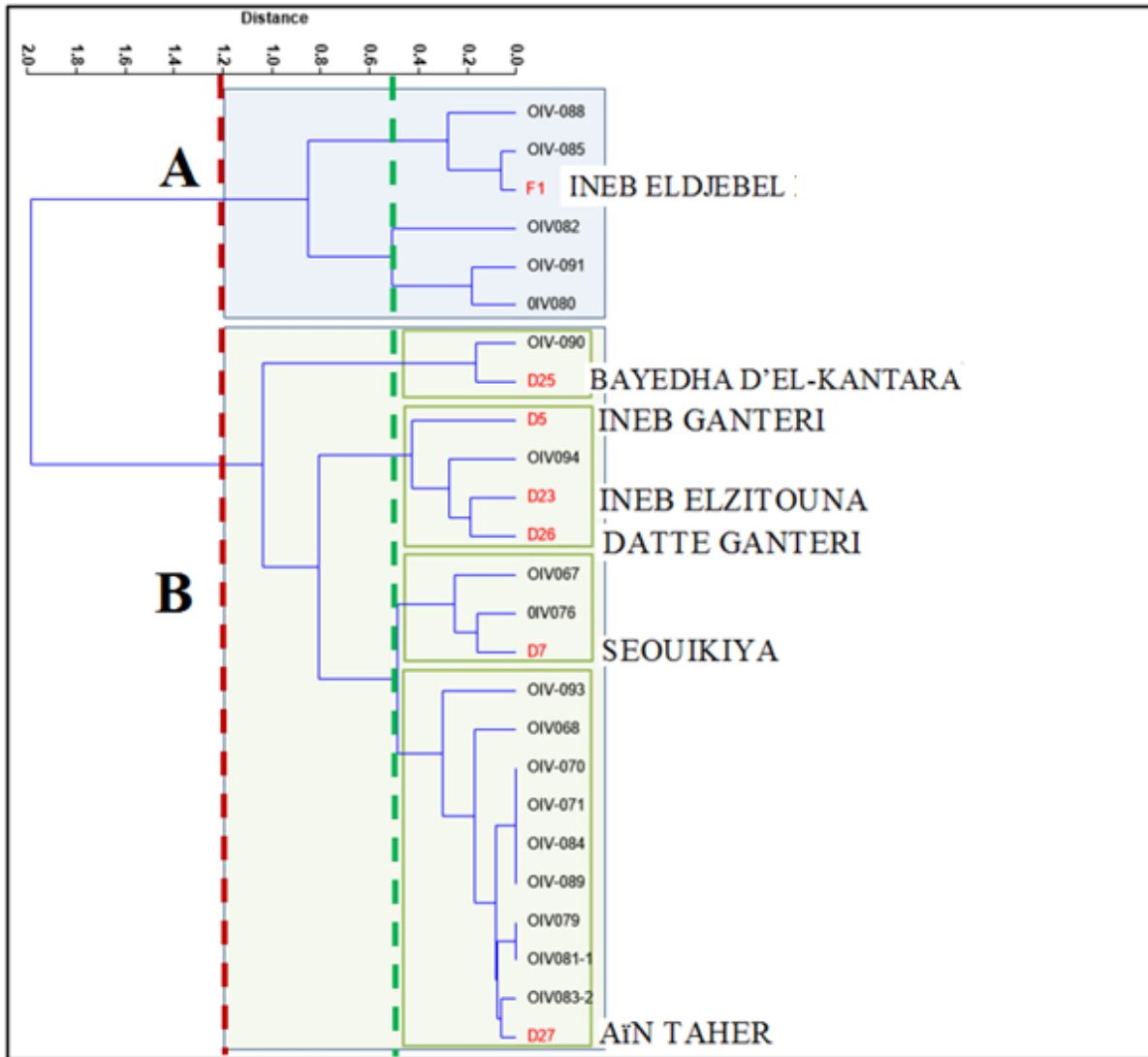
**Figure 24.** Représentation graphique des cépages nouvellement identifiés en AFC. F1 : Ineb EIDjebel, D5 : Ineb ganteri, D7 : Seouikiya, D25 : Bayedha d'El-Kantara, D23 : Ineb elzitouna, D26 : Datté ganteri, D27 : Aïn Taher.

À la suite de l'AFC, une classification ascendante hiérarchique (CAH) est appliquée. Les scores obtenus pour les trois premiers axes sont utilisés pour calculer les distances euclidiennes entre les variétés identifiées (voir la figure 25). Cette approche méthodologique est conçue pour générer des groupes organisés en fonction de variables ou de caractères qualitatifs (Martikainen et *al.*, 2000).

La classification ascendante hiérarchique (CAH) permet de reconnaître deux groupes selon la droite de troncature choisie (à la distance 1,2) :

**Le premier groupe (A)** comprend la seule variété (Ineb EIDjebel).

**Le second groupe (B)** concerne les autres variétés. Même si l'on déplace la droite de troncature vers la droite sur la CAH (à la distance  $\approx 0.5$ ), on peut discriminer à nouveau quatre sous-groupes au sein du clade B.



**Figure 25.** Classification ascendante hiérarchique sur les 3 premiers axes de l'AFC. Les cinq groupes sont représentés par des encadrés.

D'après la présentation, les principales relations remarquées sont les suivantes :

**Clade (A)** se présente par la seule variété « Ineb ELDjebel » qui se caractérise par la présence de poils dressés entre les nervures principales de la face inférieure du limbe (OIV085), ainsi que par la présence de poils couchés sur sa face supérieure (OIV088).

**Le clade (B)** se divise quant à lui en quatre sous-groupes distincts, dont la variété « Bayedha d'El-Kantara » qui se caractérise par des feuilles avec des poils couchés sur le pétiole (OIV 090).

Cependant, le deuxième sous-groupe se compose de trois variétés : les variétés Datté ganteri et Ineb elzitouna, qui sont semblables et pour lesquelles la distance euclidienne est faible



( $\approx 0,2$ ). Ces deux cépages se ressemblent aussi à la variété Ineb ganteri, dont la distance euclidienne est proche de 0,4. Les feuilles de ces cépages présentent des sinus (OIV 094) peu ou moyennement profonds. Le troisième sous groupe : on trouve la variété Seouikiya qui se caractérise par deux critères qualitatifs importants (OIV067 et **OIV076**) : les feuilles de cette variété sont de forme pentagonale et ont des dents à faces convexes.

Le dernier sous-groupe représente la seule variété Aïn Taher qui se caractérise par plusieurs caractères faibles : l'absence de pigmentation anthocyannique (OIV70/OIV71) sur les nervures principales des deux faces du limbe, l'absence de dents dans les sinus latéraux supérieurs (OIV083-2) et dans le sinus pétiolaire (OIV081-1), ainsi que l'absence de poils couchés et dressés entre/sur les nervures principales des deux faces inférieure et supérieure du limbe.

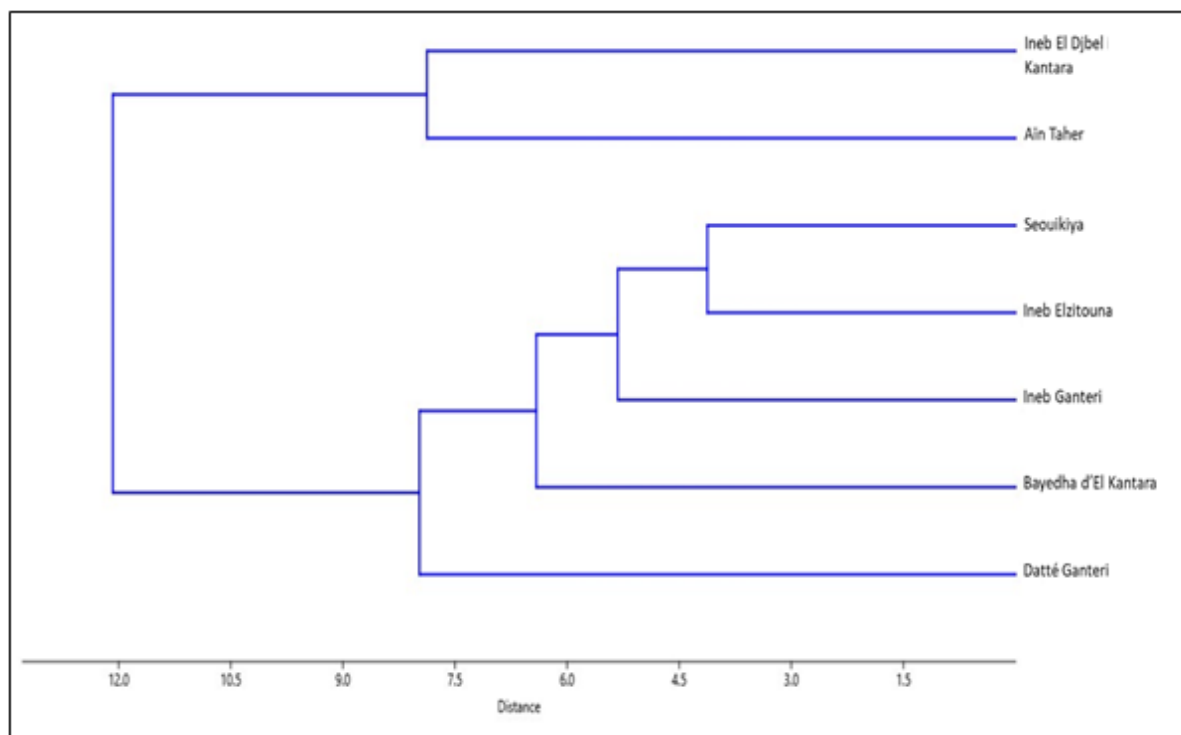
Suite à l'examen détaillé des critères qualitatifs, une diversité significative a été constatée entre les caractères des variétés examinées. L'analyse factorielle suivie de CAH des variables qualitatives a révélé que les caractéristiques les plus discriminantes entre les variétés locales analysées sont liées au sinus pétiolaire (forme et profondeur), au degré d'ouverture des sinus latéraux supérieurs, ainsi qu'à la forme du limbe et des dents, ce qui corrobore les résultats obtenus par Hamama et *al.* (2014). En outre, la présence de poils dressés ou couchés sur le limbe ou le pétiole constitue un caractère très distinctif entre les variétés étudiées, donnant une dispersion plus ou moins importante des cépages étudiés.

### III.3.3. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) et relations parentales entre les cépages

Dans cette partie, nous avons examiné 30 critères codifiés, quantitatifs et qualitatifs, permettant d'évaluer la similarité entre les nouvelles variétés découvertes dans cette région. Ce nombre de descripteurs est supérieur à ceux mentionnés précédemment par l'étude de Laidi et *al.* (2013) qui ont utilisé 20 descripteurs.

La classification ascendante hiérarchique (CAH) a été utilisée pour analyser les relations entre les différents cépages. Le dendrogramme obtenu (Figure 26) a clairement permis de distinguer les sept nouveaux génotypes en deux groupes majeurs, révélant des schémas distincts de variation morphologique. Il est intéressant de noter que la classification ampélographique basée sur 35 caractères de l'OIV (Annexe 5), utilisant la méthode de regroupement UPGMA, a produit un dendrogramme présentant une forte concordance avec le regroupement basé sur les

marqueurs SSR (Figure 08) et s'alignant dans une certaine mesure avec les résultats de l'ACP. De plus, une observation importante issue de ce regroupement est que les sept nouveaux génotypes sont regroupés dans un cluster majeur monophylétique. Cette observation correspond aux résultats obtenus par Yahiaoui et *al.* (2024) avec les variétés nouvellement identifiées comme étant spécifiques à la région des Aurès.



**Figure 26.** Dendrogramme décrivant les relations phénotypiques entre les nouveaux génotypes de vigne à l'aide de la méthode de regroupement UPGMA et des distances euclidiennes.

Selon le dendrogramme ampélographique, les valeurs de similarité exprimées en distances euclidiennes varient entre 1,5 et 12 unités, les valeurs les plus faibles indiquant une plus grande similarité phénotypique entre les cultivars. Notamment, les cultivars Seouikiya et Ineb Elzitouna ont montré le plus haut degré de similarité (environ 4,5 unités de distance), indiquant une forte ressemblance phénotypique dans 15 caractères quantitatifs, notant que les cultivars Seouikiya et Ineb Elzitouna sont les plus similaires : OIV 601- OIV 603, OIV 605- OIV 609, OIV 611- OIV 617, ainsi que dans 15 caractères qualitatifs tels que : OIV 068, OIV 070, OIV 071, OIV 076, OIV 079, OIV 081-1, OIV 082, OIV 083-2, OIV 084, OIV 085, OIV 088- OIV 091, OIV 093. Ces variétés ont ensuite été rejointes par Ineb Ganteri à environ 6,0 unités de distance, ce qui indique que ce cultivar présente des caractéristiques phénotypiques

similaires à celles des autres génotypes. Les variétés sont également regroupées dans l'ACP, comme l'indique la Figure (12).

D'autre part, les cultivars Bayedha d'El Kantara et Datté Ganteri ont formé un sous-groupe spécifique, qui s'est fusionné avec le sous-cluster mentionné précédemment, indiquant ainsi que ces groupes sont phénotypiquement plus différents les uns des autres. Cette conclusion s'aligne sur les résultats de Sabir et *al.* (2009), qui ont observé que dans le dendrogramme ampélographique, de nombreux génotypes avaient tendance à sortir des groupes établis, probablement en raison de leur sensibilité aux facteurs environnementaux, qui peuvent entraîner des variations au cours des différentes saisons.

En revanche, des autres variétés se distinguent de tous ces groupes. C'est le cas d'Ineb El Djbel et d'Ain Taher qui présentent des distances importantes indiquant qu'ils divergent complètement des autres cultivars (regroupement à environ 7,5 unités de distance). Lors de l'examen de leurs caractéristiques ampélographiques, ces variétés coïncident sur 10 caractères quantitatifs relatifs à la longueur des nervures (OIV 601, OIV 611), aux angles des nervures (OIV 607, OIV 608, OIV 609, OIV 610), à la longueur/largeur des dents (OIV 612, OIV 613, OIV 614, OIV 614), ainsi qu'à d'autres caractères notables : OIV 616 et OIV 617. De plus, 14 caractères qualitatifs tels que : OIV 067, OIV 068, OIV 070, OIV 071, OIV 076, OIV 079, OIV 081-1, OIV 082, OIV 083-2, OIV 084, OIV 89, OIV 90, OIV 93 et OIV 094.

Cette variation de similarité dans le dendrogramme révèle un ensemble de caractéristiques ampélographiques distinctes, reflétant probablement de légères variations dans la morphologie des feuilles, telles que décrites dans plusieurs études caractérisant la morphologie des feuilles de vigne en Algérie (Bounab et Laiadi, 2019), en Tunisie (Lamine et *al.*, 2014), au Maroc (Hbyaj et *al.*, 2024), en Égypte (Mahmoud et *al.*, 2023), au Liban (Chehade et *al.*, 2022), en Turquie (Ates et *al.*, 2011), en Grèce (Avramidou et *al.*, 2023) et en Espagne (Jiménez-Cantizano et *al.*, 2020).

D'après cette caractérisation ampélographique, nous avons constaté que la feuille mature était très informative pour discriminer les génotypes de vigne. Cette conclusion a également été rapportée par Santiago et *al.* (2007) ; Ates et *al.* (2011), Bodor et *al.* (2014) qui ont constaté que la feuille mature était également plus stable et plus objective que les autres caractères.

# Conclusion

## Conclusion

La vigne (*Vitis vinifera* L.) occupe une place centrale dans le patrimoine culturel et génétique de l'Algérie, notamment en raison de la richesse de sa biodiversité pédoclimatique et historique. La région d'El-Kantara, située dans le sud de l'Aurès et le nord du Sahara, se distingue par son histoire ancienne marquée par de nombreuses conquêtes, ce qui explique la différenciation génétique des cultivars dans cette région.

Cette étude constitue une contribution à la caractérisation des variétés de la vigne dans un agroécosystème traditionnel d'oasis d'El-Kantara, en utilisant des analyses moléculaires et des paramètres ampélographiques et ampélogométriques. Ces approches sont complémentaires et permettent une meilleure compréhension de la diversité des variétés locales de vignes. Cette étude nous a permis de recueillir des données préliminaires concernant les caractéristiques phénotypiques des variétés de raisin traditionnelles. Il ressort que la majorité des paramètres quantitatifs et qualitatifs utilisés démontrent l'existence de variabilité intra-variétale chez les individus étudiés.

D'après les résultats statistiques de la diversité génétique, les hétérozygoties moyennes observées et attendues ( $H_o$  et  $H_e$ ) étaient respectivement de 0,806 et 0,771.  $H_e$  est inférieur à  $H_o$  pour la plupart des loci, indiquant que la diversité génétique observée est globalement cohérente avec celle attendue. Dont, le nombre des allèles observés aux 12 loci SSR analysés était acceptable (87), ce qui pourrait suggérer une diversité génétique relative au sein de la population étudiée.

En effet, les analyses moléculaires ont permis d'identifier une présence notable de cultivars de raisin étrangers originaires de Méditerranée orientale : « Dabouki, Afus Ali, Rassegui, Muscat of Alexandria, Danugue et Dattier de ST. Vallier, etc », Cette diversité des cultivars confirme les données historiques qui faisant l'état d'introductions successives de multiples variétés à El-Kantara à partir de diverses régions au fil du temps.

Par ailleurs, nous avons identifié des variétés autochtones algériennes identifiées, telles que « Amokrane, Ahmers Bou Ahmers et Louali ».

Les marqueurs microsatellites (SSR) ont également permis d'identifier des génotypes uniques parmi les cépages algériens. Sept cépages pourraient correspondre à des variétés

algériennes uniques propres à la région d'El-Kantara. On pourrait supposer que les trois nouveaux cultivars identifiés « Datté ganteri, Ineb Elzitouna et Bayedha d'El-Kantara » », sont issus d'une descendance parentale avec la variété « Louali Blanc ». Concernant les deux variétés « Ineb ganteri, Seouikiya », qui présentent une forte liaison génétique avec la variété « Taferielt ou Farana noir », il pourrait s'agir de la progéniture de cette dernière. Cependant ces analyses génétiques révèlent une relation pertinente entre les variétés locales « Aïn Taher et Ineb El Djebel » avec la variété française « Danugue ». De plus, le positionnement de Danugue au cœur du groupe de variétés locales nouvellement identifiées suggère une origine véritablement algérienne. Par conséquent, la culture de la vigne dans notre pays a pu contribuer à l'expansion d'autres variétés, notamment le long des régions méditerranéenne, nord-africaine, ibérique et même au centre de l'Europe.

D'après les données ampélographiques, les traits tels que la longueur des nervures, les dimensions des dents et les caractéristiques des sinus se sont avérés particulièrement pertinents pour la discrimination variétale. Il y a une bonne cohérence entre les données moléculaires et ampélographiques.

Cette étude a également souligné l'importance d'optimiser les protocoles d'extraction d'ADN en tenant compte des conditions locales, ce qui permet de simplifier les méthodes tout en garantissant des résultats fiables et économiques.

Ces avancées méthodologiques, associées aux résultats phénotypiques et moléculaires, constituent une base solide pour la conservation et la valorisation des ressources génétiques locales. Elles ouvrent la voie à une gestion durable de la viticulture dans cette région historique et favorisent la redynamisation de ce secteur, tout en contribuant à la préservation du patrimoine viticole algérien face aux menaces de l'érosion génétique.

Sur la base de ces résultats, il est légitime d'envisager dans l'avenir :

- Une analyse de la parenté fondée sur les SNP pourrait révéler des liens de parenté notables entre ces cépages algériens. Cette analyse a également fourni des indices précieux pour retracer l'origine de ces cultivars non identifiés et établir des liens avec des variétés d'origine connue, enrichissant ainsi notre compréhension du patrimoine viticole algérien.

- Une étude plus approfondie du polymorphisme de séquence associé à d'autres caractères d'intérêt pourrait être réalisée sur le même échantillon. Par exemple, cela pourrait porter sur les gènes impliqués dans le contrôle du sexe de la vigne ou même sur des gènes qui pourraient être impliqués dans l'augmentation de la taille des baies au cours de la sélection.
- Une évaluation des capacités productives, des résistances aux stress biotiques et abiotiques, ainsi que des autres caractéristiques agronomiques ou économiques des génotypes nouvellement identifiés.
- Une étude de la résilience aux maladies et aux parasites surtout pour les génotypes locaux nouvellement identifiés.
- Il faut mettre en œuvre des politiques rigoureuses de conservation et de valorisation des ressources génétiques locales pour préserver ce patrimoine exceptionnel face aux défis contemporains. La conservation des ressources végétales spontanées repose sur la constitution de banques de gènes au sein des instituts techniques et centres de recherche. Et même créer des collections ex-situ des cépages autochtones pour préserver le patrimoine viticole.
- Mettre en place des politiques gouvernementales visant à encourager et financer la recherche génétique.

# **Références bibliographiques**



## Références bibliographiques

- Abdel-Hameed, Usama K. Abdel, Khawla Abdelaziz, and Nahla El Sherif.** (2020). Genetic diversity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars in Al-Madinah Al-Munawara based on molecular markers and morphological traits. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy* 27 (1), 113.
- Abdelkader, F., Laiadi, Z., Boso, S., Santiago, J. L., Gago, P., and Martínez, M. C.** (2023). Algerian Fig Trees: Botanical and Morphometric Leaf Characterization. *Horticulturae*, 9(5), 612.
- Aboul-Maaty, N. A. F. and Oraby, H. A. S.** (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*. 43(1), 1-10.
- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J.** (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, 11(7), 36-42.
- Achoura, A., & Belhamra, M.** (2010). Aperçu sur la faune arthropodologique des palmeraies d'El-Kantara. *Courr. Du Savoir*, 10, 93–101.
- Akkak, A., Boccacci, P., Lacombe, T., & Botta, R.** (2005). Relationships and genetic diversity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) grown in Algeria and in Mediterranean basin. In *International Workshop "The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources"* (146-147).
- Akkak, A., Boccacci, P., & Botta, R.** (2007). 'Cardinal' grape parentage: a case of a breeding mistake. *Genome*, 50(3), 325-328.
- Akram, M. T., Qadri, R., Khan, M. A., Hafiz, I. A., Nisar, N., Khan, M. M., Feroze M. A., and Hussain, K.** (2021). Morpho-phenological characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) germplasm grown in northern zones of Punjab, Pakistan. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 58(4).
- Alba, V., Bergamini, C., Cardone, M. F., Gasparro, M., Perniola, R., Genghi, R., and Antonacci, D.** (2014). Morphological variability in leaves and molecular characterization of novel table grape candidate cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Molecular biotechnology*, 56(6), 557-570.
- Alba, V., Bergamini, C., Genghi, R., Gasparro, M., Perniola, R., & Antonacci, D.** (2015). Ampelometric leaf trait and SSR loci selection for a multivariate statistical approach in *Vitis vinifera* L. biodiversity management. *Molecular Biotechnology*, 57(8), 709-719.

- Aldebert, P., Orsat, S.** (1959). Le vignoble Algérien. Bull.Techn. Information Ing. Serv. Agric, 142, 447-455.
- Alrashidi, A. H., Jamal, A., Gzara, L., Haddaji, N., Kachout, M., Abdelgadir, A., Badraoui, R., and Elkahoui, S.** (2023). Characterization of palm date varieties (*Phoenix dactylifera* L.) growing in Saudi Arabia: Phenotypic diversity estimated by fruit and seed traits. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 51(1), 12996-12996.
- Alves, F., Eldmann, M., Costa, J., Costa, P., Costa, P. L., & Symington, C.** (2012). Effects of rootstock and environment on the behaviour of autochthone grapevine varieties in the Douro region. In *Proc. of the IXth International Terroirs Congress, Dijon/Reims, France*. 1, 10-13.
- Anđelković, M. Radovanović, B. Anđelković, A. M. and Radovanović, V.** (2015). Phenolic compounds and bioactivity of healthy and infected grapevine leaf extracts from red varieties Merlot and Vranac (*Vitis vinifera* L.). *Plant foods for human nutrition*, 70, 317-323.
- Ates, F., Coban, H., Kara, Z., & Sabir, A.** (2011). Ampelographic characterization of some grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) grown in south-western region of Turkey. *Bulg. J. Agric. Sci*, 17(3), 314-324.
- Aubakirova, K. Omasheva, M. Ryabushkina, N. Tazhibaev, T. Kampitova, G. and Galiakparov, N.** (2014). Evaluation of five protocols for DNA extraction from leaves of *Malus sieversii*, *Vitis vinifera*, and *Armeniaca vulgaris*. *Genetics and Molecular Research*. 13(1), 1278-1287.
- Augusto, D., Ibáñez, J., Pinto-Sintra, A. L., Falco, V., Leal, F., Martínez-Zapater, J. M., Oliveira A.A. & Castro, I.** (2021). Grapevine diversity and genetic relationships in northeast Portugal old vineyards. *Plants*, 10(12), 2755.
- Avramidou, E. V., Masaoutis, I., Pitsoli, T. D., Kapazoglou, A., Pikraki, M., Trantas, E. A., Nikolantonakis, M., and Doulis, A. G.** (2023). Analysis of wine-producing *Vitis vinifera* L. biotypes, autochthonous to Crete (Greece), employing ampelographic and microsatellite markers. *Life*, 13(1), 220.
- Basheer-Salimia, R., Lorenzi, S., Batarseh, F., Moreno-Sanz, P., Emanuelli, F., Grando, M.S.** (2014). Molecular identification and genetic relationships of Palestinian grapevine cultivars. *Molecular biotechnology*, 56, 546-56.
- Benbouza H., Baudoin J.-P. et Mergeai G.** (2006). Amélioration de la méthode d'extraction d'ADN au CTAB appliquée aux feuilles de cotonnier. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10(2), 73–76.
- Ben Sliman H. M.** (2003). Ampélographie des vignes autochtones cultivées et spontanées en Tunisie. *INRAT/IPGRI*, 130.

- BENSEDDIK, N.** (2012). Hercule en Numidie, une image méconnue. In *Ikosim*, 1, pp. 119-124.)
- Berrada, Y.** (1999). Identification et caractérisation des variétés de vigne autochtones marocaines par des techniques de biologie moléculaire. *Mémoire de fin d'études. IAV Hassan II, Rabat.*
- Bešlić, Z., Todić, S., & Rakonjac, V.** (2005). Inheritance of some morphological traits in hybridization of grapevine cultivars Drenak crveni and Afuz-ali. *Genetika*, 37(2), 137-144.
- Bienvenu T., Meunier C., Bousquet S., Chiron S., Richard L., Gautheret-Dejean A., Rouselle J.-F. et Feldmann D.** (1999). Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. *Annales de biologie clinique* 57(1), 77–84.
- Bodor, P., Baranyai, L., Parrag, V., & Bisztray, G.** (2014). Effect of row orientation and elevation on leaf morphology of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv Furmint. *Progress in Agricultural Engineering Sciences*, 10(1), 53-69.
- Bodor-Pesti, P., Taranyi, D., Deák, T., Nyitrainé Sárdy, D. Á., & Varga, Z.** (2023). A Review of ampelometry: Morphometric characterization of the grape. *Vitis*.
- Bokszczanin K. et Przybyla A.A.** (2006). New simple and efficient method of DNA isolation from pear leaves rich in polyphenolic compounds. *International Journal of Horticultural Science*. 12(4), 21-24.
- Borrego, J., De Andrés, M. T., Gómez, J. L., & Ibáñez, J.** (2002). Genetic study of Malvasia and Torrontes groups through molecular markers. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(2), 125-130.
- Bouby, L., Chabal, L., Bonhomme, V., Baly, I., Battentier, J., Makhad, S. B., ... & Matteredne, V.** (2023). The Holocene history of grapevine (*Vitis vinifera*) and viticulture in France retraced from a large-scale archaeobotanical dataset. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 625, 111655.
- Bounab, O., Laiadi, Z.** (2019). A multivariate approach for the ampelographic characterizations of Algerian grapevine genotypes (*Vitis vinifera* L.): Insights into conservation and commercialization. *South African Journal of Botany*, 124, 71-79.
- Bounab, O.** (2020). Etude ampélographique et agronomique des cépages autochtones (*Vitis vinifera* L.) (Thèse de doctorat). Université Mohamed Khider de Biskra, algérie.
- Boursiquot JM, This P** (1999). Essai de définition du cépage. *Progrès Agricole et Viticole* 116 (17), 359-361.
- Bowers, J. E., Dangl, G. S., & Meredith, C. P.** (1993). DNA isolation from difficult plant species for RAPD analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11, 130–141.

- Bowers, J. E. Dangl, G. S. Vignani, R. and Meredith, C. P.** (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39(4), 628-633.
- Bowers, J.E., Dangl, G.S., Meredith, C.P.** (1999). Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am J Enol Vitic*, 50(3), 243-246.
- Boz, Y., Bakir, M. E. L. İ. K. E., Çelikkol, B. P., Kazan, K., Yilmaz, F., Cakir, B., ... & Ergül, A.** (2011). Genetic characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) germplasm from Southeast Anatolia by SSR markers. *Vitis*, 50(3), 99-106.
- Brodeur J. et Toussaint M.** (2007). Biologie moléculaire : Concepts, Techniques, Applications. Centre collégial de développement de matériel didactique. Vol. 8, Canada, 331p.
- Caïd, N., Chachoua, M., & Berrichi, F.** (2019). Analyse spatiale diachronique de l'occupation du vignoble algérien depuis 60 ans : cas de la wilaya de Mostaganem. *Physio-Géo. Géographie physique et environnement*, 13, 53-74.
- Cantu D., Walker, M.A. et Chittaranjan K.** (2019). The Grape Genome. 1er edition. Springer Nature, Switzerland, 385 p. Chase M.W. et Hills H.H. 1991. Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40(2), 215–220.
- Carcopino, J.** (1933). Note complémentaire sur les Numeri syriens de la Numidie romaine. *Syria*, 20-55.
- Cervera, M.T.; Rodreguez, I.; Cabinaz, J.A.; Chavez, J.; Martinez Zapater, J.M.; Cabbelo, F.** (2001). Morphological and molecular caractereization of grapevines accessions known as Albello. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 127–135.
- Chedid, Elsa** (2023). Aptitudes agro-œnologiques des hybrides interspécifiques complexes de vigne : incidence des régions génomiques issues des espèces sauvages du genre *Vitis*. Diss. Université de Strasbourg.
- Chehade, A., Chalak, L., Merheb, J., Elbitar, A., Rmeily, E., Madi, N., and Massaad, M.** (2022). Genetic and ampelographic characterization of grapevine accessions maintained in the Lebanese national collection. *Advances in Horticultural Science*, 36(3), 215-226.
- Chitwood, D. H., Klein, L. L., O'Hanlon, R., Chacko, S., Greg, M., Kitchen, C., Miller, A. J., Londo, J. P., & Sinha, N. R.** (2014). *Latent developmental and evolutionary shapes embedded within the grapevine leaf*. *New Phytologist*, 210(1), 343–355.
- Cipriani G., Spadotto, A., Jurman, I., Di Gaspero, G., Crespan, M., Meneghetti, S., Frare, E., Vignani, R., Cresti, M., Morgante M., Testolin R.** (2010). The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and

parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. *Theoretical and applied genetics*, 121, 1569-1585.

**Crespan, M. (2003).** The parentage of Muscat of Hamburg. *VITIS-GEILWEILERHOF*-, 42(4), 193-198.

**Crespan, M., Migliaro, D., Larger, S., Pindo, M., Palmisano, M., Manni, A., ... & Camilli, G. (2021).** Grapevine (*Vitis vinifera* L.) varietal assortment and evolution in the Marche region (central Italy). *Oeno One*, 55(3), 17-37.

**Cunha, J., Baleiras-Couto, M., Cunha, J. P., Banza, J., Soveral, A., Carneiro, L. C., and Eiras-Dias, J. E. (2007).** Characterization of Portuguese populations of *Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 981-988.

**Dani, C. Oliboni, L. S. Agostini, F. Funchal, C. Serafini, L. Henriques, J. A. and Salvador, M. (2010).** Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicology in Vitro*, 24(1), 148-153.

**Dellaporta, S. L. Wood, J. and Hicks, J. B. (1983).** A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter*. 1, 19-21.

**De Michele, R., La Bella, F., Gristina, A. S., Fontana, I., Pacifico, D., Garfi, G., Carimi, F. (2019).** Phylogenetic relationship among wild and cultivated grapevine in Sicily: A hotspot in the middle of the Mediterranean Basin. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1506.

**Demeke T. et Jenkins G.R. (2010).** Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(6), 1977–1990.

**Dénis T., Stéphanie Jaubert-Possamai, Agnès M. C. (2018).** Principe des techniques de biologie moléculaire et génomique. 3<sup>ème</sup> édition, Quae, France, 47p.

**De Oliveira, G. L., de Souza, A. P., de Oliveira, F. A., Zucchi, M. I., de Souza, L. M., Moura, M. F. (2020).** Genetic structure and molecular diversity of Brazilian grapevine germplasm: Management and use in breeding programs. *PLoS One*, 15(10), e0240665.

**D’Onofrio, C., Tumino, G., Gardiman, M., Crespan, M., Bignami, C., De Palma, L., ... & Terzi, V. (2021).** Parentage atlas of Italian grapevine varieties as inferred from SNP genotyping. *Frontiers in Plant Science*, 11, 605934.

**Doyle, J. J., and Doyle, J. L. (1987).** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*. 19(1), 11-5.

- El Oualkadi, A., Ater, M., Messaoudi, Z., Laucou, V., Boursiquot, J.-M., Lacombe, T., & This, P.** (2009). Molecular characterization of Moroccan grapevine germplasm using SSR markers for the establishment of a reference collection. *OENO One*, 43(3), 135–148.
- El Oualkadi, A., Ater, M., Messaoudi, Z., El Heit, K., Laucou, V., Boursiquot, J. M., This, P.** (2011). Genetic diversity of Moroccan grape accessions conserved *ex situ* compared to Maghreb and European gene pools. *Tree genetics and genomes*, 7(6), 1287-1298.
- Emanuelli, F., Lorenzi, S., Grzeskowiak, L. et al.** (2013). Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. *BMC Plant Biol* 13, 39.
- Engels, J. M. M., & Visser, L.** (2003). *A Guide to Effective Management of Germplasm Collections*. ). Bioversity International (No. 6). 174 p.
- FAO.** (2010). *The Second Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*. Rome : FAO.
- Ferree, D.C.; Streeter, J.G.** (2004). Response of container-growing grapevines to soil compaction. *HortScience*, 39, 1250–1254.
- Fisarakis, I.; Chartzoulakis, D.; Stavrakas, D.** (2001). Response of sultana vines (*V. vinifera* L.) on six rootstocks to NaCl salinity exposure and recovery. *Agric. Water Manag.* 51, 13–27.
- FODIL, O.** (1989). Les cépages autochtones en Algérie. *Algerian Annals of Agronomy*, 13 (1), 235-240.
- Fodor, Agota.**(2013). *La sélection génomique appliquée à l'espece Vitis vinifera L. subsp. vinifera, évaluation et utilisation*. Diss. Ecole nationale supérieure agronomique de montpellier-AGRO M.
- Frankel, O. H., Brown, A. H. D., & Burdon, J. J.** (1995). *The Conservation of Plant Biodiversity*. Cambridge University Press, 299p.
- Friar, E. A.** (2005). Isolation of DNA from plants with large amounts of secondary metabolites. *Methods in enzymology*, 395, 1-12.
- Gago, P., Santiago, J. L., Boso, S., Alonso-Villaverde, V., Grando, M. S., & Martínez, M. C.** (2009). Biodiversity and characterization of twenty-two *Vitis vinifera* L. cultivars in the Northwestern Iberian Peninsula. *American journal of enology and viticulture*, 60(3), 293-301.
- Gago, P., Boso, S., Santiago, J. L., Soler, J. X., Peiró, R., García, J., Jiménez, C., Gisbert, C., and Martínez, M. D. C.** (2022). Characterization of grapevine genetic resources in the comunitat valenciana (Spain). *International Journal of Fruit Science*, 22(1), 287-302.
- Galet, P.** (trans. Morton L.) (1979). *A practical ampelography: Grapevine identification*. Cornell University Press (English translation).



- Galet P** (1988) Cépages et vignobles de France, Tome 1: les vignes américaines, vol 1. Déhan, Montpellier.
- Galet, P.** (2000). *Dictionnaire Encyclopédique des Cépages*. Paris: Hachette.
- Ghaffari S., Hasnaoui N. et Ferchichi A.** (2011). Rapid, High Quality DNA Isolation from Tunisian Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Cultivars and Optimization of the RAPD Marker Technique. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(1), 5881-5890.
- Ghaffari, S., Hasnaoui, N., Zinelabidine, L.H., Ferchichi, A., Martínez-Zapater, J.M., Ibáñez, J.** (2013). Genetic identification and origin of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) in Tunisia. *Am J Enol Vitic*, 64, 538-544.
- Ghaffari, S., Hasnaoui, N., Zinelabidine, L. H., Ferchichi, A., Martínez-Zapater, J. M., & Ibáñez, J.** (2014). Genetic diversity and parentage of Tunisian wild and cultivated grapevines (*Vitis vinifera* L.) as revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Tree Genetics & Genomes*, 10(4), 1103–1112.
- Goto-Yamamoto, N., Azuma, A., Mitani, N., & Kobayashi, S.** (2013). SSR genotyping of wild grape species and grape cultivars of *Vitis vinifera* and *V. vinifera* × *V. labrusca*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 82(2), 125-130.
- Guillon, J. M.** (1896). *Les cépages orientaux*. G. Carré.
- Güler, E., and Karadeniz, T.** (2023). Discrimination of an untouched autochthonous grapevine (*Vitis vinifera* L.) population by morphological markers and multivariate analyses. *Erwerbs-Obstbau*, 65(6), 2075-2084.
- Gsell, S.** (1927). Les royaumes indigènes : organisation sociale, politique et économique.
- Hamama, A., el Heit, K., Meghezzi, S., Sebki, S., Agouazi, O., & Cherfaoui, M. S.** (2014). Étude des caractères ampélographiques et phyllométriques des cépages mineurs du tel Algérien. In 37th World Congress of Vine and Wine and 12th General Assembly of the OIV (Part 2), EDP Sciences, 05001p.
- Hammer, O., Harper D. A. T., Ryan P. D.** (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica*, 4, 9.
- Hamouda A., Outtas S.** (2011). Etude topologique et diachronique de l'habitat rural : Cas d'El-Kantara, Biskra. *Sciences & Technologie D*, (34): 28-37.
- Hamouda A., Outtas S.** (2021). Inhabited space, generativity and conservatism, the case of El Kantara, Biskra. *Architecture et environnement de l'enfant*, Vol.6 (3), p .160-174.
- Hanania, U. Velcheva, M. Sahar, N. and Perl, A.** (2004). An improved method for isolating high-quality DNA from *Vitis vinifera* nuclei. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 173-177.

- Hasan, S. M. Z. Shafie, M. S. B. and Shah, R. M.** (2008). Efficient method for the extraction of genomic DNA from wormwood (*Artemisia capillaris*). *African Journal of Biotechnology*, 7(18).
- Hbyaj, K., Sbaghi, M., & Hmouni, D.** (2024). Criblage Précoce des Cultivars de Vigne Marocains par Ampélographie. *African and Mediterranean Agricultural Journal-Al Awamia*, 144, 81-92.
- Henry R.J.** (2008). Plant genotyping II: SNP technology. CAB International, Wallingford, UK, 296 p.
- Hidalgo L. F.C.** (1991). Communication sur la caractérisation agronomique des variétés de "*Vitis vinifera* L." Institut National de Recherche et Technologie Agricoles et Alimentaires, ISBN : 84-7498-410-6.
- Hvarleva, T., Rusanov, K., Lefort, F., Tsvetkov, I., Atanassov, A., Atanassov, I.** (2004). Genotyping of Bulgarian *Vitis vinifera* L. cultivars by microsatellite analysis. *VITIS-GEILWEILERHOF-*, 43(1), 27-34.
- Ibáñez, J., de Andrés, M. T., Molino, A., & Borrego, J.** (2003). Genetic study of key Spanish grapevine varieties using microsatellite analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(1), 22-30.
- Inglis, P. W. Pappas, M. D. C. R. Resende, L. V. and Grattapaglia, D.** (2018). Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high-quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. *PloS one*. 13(10), e0206085.
- Isnard, H.** (1951). La Vigne en Algérie. Etude géographique. France : Ophrys- Gap.
- Japelaghi, R. H. Haddad, R. and Garoosi, G. A.** (2011). Rapid and efficient isolation of high-quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Molecular biotechnology*. 49, 129-137.
- Jiménez-Cantizano, A., Muñoz-Martín, A., Amores-Arrocha, A., Sancho-Galán, P., Palacios, V.** (2020). Identification of Red Grapevine Cultivars (*Vitis vinifera* L.) Preserved in Ancient Vineyards in Axarquía (Andalusia, Spain). *Plants*, 9, 1572.
- Jobes, D. V., Hurley, D. L., & Thien, L. B.** (1995). Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *Taxon*. 44(3), 379-386.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C.** (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology*, 16(5), 1099-1106.



- Katterman, F. R. H. and Shattuck, V. I.** (1983). An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins. *Preparative Biochemistry*, 13(4), 347-359.
- Kerridge G. and Antchiff A. J.** (1999). Wine grape varieties. *Csiro publishing*, 205p.
- Khalil, S., Tello, J., Hamed, F., & Forneck, A.** (2017). A multivariate approach for the ampelographic discrimination of grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars: application to local Syrian genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64, 1841-1851.
- Khanuja, S. P. Shasany, A. K. Darokar, M. P. and Kumar, S.** (1999). Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17(1), p. 74.
- Khouni S.** (2023). Contribution à la caractérisation moléculaire et évaluation de la situation sanitaire des cépages et porte greffes cultivés dans la collection germoplasmique de l'ITAF, Skikda. Diss. Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie.
- Khouni, S., Laiadi, Z., Bertazzon, N., Angelini, E., & Migliaro, D.** (2023). Preservation and sanitary status of Algerian grapevine germplasm: Management and improvement. *South African Journal of Botany*, 153, 346-356.
- Koleda J.,** (1975). Ergebnisse von Kreuzungen zw. *Vitis amurensis* und *Vitis vinifera* in der Züchtung frostwiderstandsfähiger Reben. *Vitis* 14 : 1-5.
- Labagnara, T., Bergamini, C., Caputo, A. R., & Cirigliano, P.** (2018). *Vitis vinifera* L. germplasm diversity: a genetic and ampelometric study in ancient vineyards in the South of Basilicata region (Italy). *Vitis*, 57(1).
- Lacombe, T.** (2012). Contribution à l'étude de l'histoire évolutive de la vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.) par l'analyse de la diversité génétique neutre et de gènes d'intérêt (Doctoral dissertation, Institut National d'Etudes Supérieures Agronomiques de Montpellier).
- Lacombe, T., Boursiquot, J. M., Laucou, V., Di Vecchi-Staraz, M., Péros, J. P., & This, P.** (2013). Large-scale parentage analysis in an extended set of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 126, 401-414.
- Laiadi, Z. Bentchikou, M. M. Bravo, G. Cabello, F. and Martínez-Zapater, J. M.** (2009). Molecular identification and genetic relationships of Algerian grapevine cultivars maintained at the germplasm collection of Skikda (Algeria). *Vitis*, 48, 25-32.
- Laiadi, Z. Bencharif, S. Lakhrif, Z. Bentchikou, M. M. and Mohand-Larbi, R.** (2013). First ampelometric study of autochthonous grapevines in Algeria: Germplasm collection of Mascara. *Vitis*, 52(1), 21-27.

- Laiadi, Z., Rahali, M., Achour, H.** (2019). Molecular Clarifications of Grapevine Identities in Algerian Germplasm Collections using Microsatellite Markers. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 12(3). 319–322.
- Lamine, M., Zemni, H., Ziadi, S., Chabaane, A., Melki, I., Mejri, S., Zoghlami, N.** (2014). Multivariate analysis and clustering reveal high morphological diversity in Tunisian autochthonous grapes (*Vitis vinifera*): insights into characterization, conservation and commercialization. *Oeno One* 48, 111.
- Larnaude, M.** (1948). La vigne en Algérie d'après H. Isnard. In *Annales de Géographie*, Armand Colin, 57 (308), 356-359.
- Lassère, J. M.** (1965). Un syrien et sa famille à El-Kantara. *Revue des Études Anciennes*, 67(3), 353-367.
- Laucou, V., Launay, A., Bacilieri, R., Lacombe, T., Adam-Blondon, A. F., Bérard, A., ... & Boursiquot, J. M.** (2018). Extended diversity analysis of cultivated grapevine *Vitis vinifera* with 10K genome-wide SNPs. *PloS one*, 13(2), e0192540.
- Lefort, F., and Douglas, G. C.** (1999). An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species Acer, Fraxinus, Prunus and Quercus. *Annals of Forest Science*. 56(3), 259-263.
- Lahmadi, S., Guesmia, H., Zeguerrou, R., Maaoui, M., & Belhamra, M.** (2013). LA CULTURE DU SAFRAN (CROCUS SATIVUS L.) EN REGIONS ARIDES ET SEMI ARIDES CAS DU SUD EST ALGERIEN. *Journal Algérien des Régions Arides*, CRSTRA.
- Levadoux L** (1956) Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera* L. *Annales de l'Amélioration des Plantes* 1, 59-118.
- Levadoux L, Boubals D, Rives M** (1962) Le genre *Vitis* et ses espèces. *Annales de l'Amélioration des Plantes* 12 (1), 19-44.
- Levadoux, L., Benabderrabou, A., & Douaouri, B.** (1971). Ampelographie algérienne ; cépages de cuve et de table cultivés en Algérie.
- Lewinsohn E., Steel C.I. et Croteau R.** (1994). Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:20–25.
- Li, B., Jiang, J., Fan, X., Zhang, Y., Sun, H., Zhang, G., & Liu, C.** (2017). Molecular characterization of Chinese grape landraces (*Vitis* L.) using microsatellite DNA markers. *HortScience*, 52(4), 533-540.
- Li, Z., Parris, S. & Saski, C.A.** (2020). A simple plant high-molecular-weight DNA extraction method suitable for single-molecule technologies. *Plant Methods* 16, 38.

- Lijavetzky, D., Ruiz-García, L., Cabezas, J. A., De Andrés, M. T., Bravo, G., Ibáñez, A., ... & Martínez-Zapater, J. M.** (2006). Molecular genetics of berry colour variation in table grape. *Molecular Genetics and Genomics*, 276, 427-435.
- Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F., & Reisch, B. I.** (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant molecular biology Reporter*, 12, 6-13.
- Lucas, M. S., Carvalho, C. D. S., Hypolito, G. B., & Côrtes, M. C.** (2019). Optimized protocol to isolate high quality genomic DNA from different tissues of a palm species. *Hoehnea*. 46(02), e942018.
- Maghradze, D., Failla, O., Bacilieri, R., Imazio, S., Vashkidze, L., Chipashvili, R., Scienza, A.** (2010). Georgian *Vitis* germplasm: usage, conservation and investigation. *Bulletin de l'OIV-Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*, 83(956), 485.
- Mahmoud, R. A., Dahab, A. A., Mahmoud, G. A., Abd El, M. A. E. A., El-Bassel, E. H., and Mahdy, E. M. B.** (2023). Ampelographic and genetic diversity assessment of some local grape genotypes under Egyptian conditions. *American Journal of Molecular Biology*, 13(3), 183-196.
- MAP.** (2019) Rapports national sur l'état de la biodiversité pour l'alimentation et l'agriculture en Algérie. Ministère de l'Agriculture, du Développement rural et de la Pêche, 94p.
- Maraš, V., Tello, J., Gazivoda, A., Mugoša, M., Perišić, M., Raičević, J., Štajner N., Ocete R., Božović V., Popović T., García-Escu-dero E., Grbić M., Martínez-Zapater J.M., & Ibáñez, J.** (2020). Population genetic analysis in old Montenegrin vineyards reveals ancient ways currently active to generate diversity in *Vitis vinifera*. *Scientific reports*, 10(1), 15000.
- María Ortiz, J., Pedro Martín, J., Borrego, J., Chávez, J., Rodríguez, I., Muñoz, G., & Cabello, F.** (2004). Molecular and morphological characterization of a *Vitis* gene bank for the establishment of a base collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51, 403-409.
- Margaryan, K., Melyan, G., Röckel, F., Töpfer, R., & Maul, E.** (2021). Genetic diversity of Armenian grapevine (*Vitis vinifera* L.) germplasm: Molecular characterization and parentage analysis. *Biology*, 10(12), 1279.
- Martikainen, P., Siitonen, J., Punttila, P., Kaila, L., & Rauh, J.** (2000). Species richness of Coleoptera in mature managed and old-growth boreal forests in southern Finland. *Biological conservation*, 94(2), 199-209.
- Martínez M. C. Mantilla, J. L. G.** (1993). Descripción y comparación ampelográfica de cepas de *Vitis vinifera* L., cv. Albarino adultas (procedentes de estaquillado de cepas viejas), de propagación in vitro y de semilla, cuando tienen un año. *Vitis* 32, 245-246.

- Martinez M.C. and Grenan S.,** (1999). A graphic reconstruction method of an average leaf of vine. *Agronomie*, 19, 491-507.
- Marsal, G., Baiges, I., Canals, J. M., Zamora, F., & Fort, F.** (2011). A fast, efficient method for extracting DNA from leaves, stems, and seeds of *Vitis vinifera* L. *American journal of enology and viticulture*, 62(3), 376-381.
- Marsal, G. Boronat, N. Canals, J. M. Zamora, F. and Fort, F.** (2013). Comparison of the efficiency of some of the most usual DNA extraction methods for woody plants in different tissues of *Vitis vinifera* L. *OENO One*. 47(4), 227-237.
- Maas, E. V.** (1990). Crop salt tolerance, pp. 262-304. In: Tanji K. K. (Eds.). *Agricultural Salinity Assessment and Management*, ASCE
- McCarthy, M. G., L. D. Jones and G. Due** (1992). Irrigation, principles and practices, In: Coombe B. G. and P. R. Dry (Eds.), *Viticulture. Practices*, Adelaide, Australia. Vol. II, 104-128.
- Mena, A., Martínez, J., & Fernández-González, M.** (2014). Recovery, identification and relationships by microsatellite analysis of ancient grapevine cultivars from Castilla-La Mancha: The largest wine growing region in the world. *Genetic resources and crop evolution*, 61, 625-637.
- Merheb, J., Chalak, L., Roux, C., Laucou, V., Ouaini, N., Beyrouthy, M., Touma J., Lacombe T. et This, P.** (2024). Exploring the genetic diversity of Lebanon's underexploited grapevine resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-23.
- Merkouropoulos G. Michailidou S. Alifragkis A. Zioziou E. Koundouras S. Argiriou A. and Nikolaou N.** (2015). A combined approach involving ampelographic description, berry oenological traits and molecular analysis to study native grapevine varieties of Greece. *Vitis* (54), 99–103.
- Migliaro, D., Morreale, G., Gardiman, M., Landolfo, S., Crespan, M.** (2013). Direct multiplex PCR for grapevine genotyping and varietal identification. *Plant Genetic Resources*, 11(2), 182-185.
- Mihaljevic, M.Z., Simon, S., Pejic, I., Carka, F., Sevo, R., Kojic, A. & Preiner, D.** (2013). Molecular characterization of old local grapevine varieties from South East European countries. *Vitis*, 52(2), 69-76.
- Mittermeier R. A., Gil P. R., Hoffmann M., Pilgrim J., Brooks T., Mittermeier C. G. Lamoreux, G.A.B. Da Fonseca.** (2001). Hotspots: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. *The Quarterly Review of Biology*, 76 (3), 327-330.

- Morales-Castilla, I., García de Cortázar-Atauri, I., Cook, B. I., Lacombe, T., Parker, A., Van Leeuwen, C., ... & Wolkovich, E. M.** (2020). Diversity buffers winegrowing regions from climate change losses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(6), 2864-2869.
- Morizot, P.** (1998). Les voies romaines de Lambèse à Calceus Herculis (El Kantara, Algérie). [Note de synthèse]. *Antiquités africaines*, 34(1), 149-155.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J.** (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Nazhad N.R. et Solouki M.** (2008). Separation of DNA for Molecular Markers Analysis from Leaves of *Vitis Vinifera*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11(11), 1436–1442.
- Németh, M.** (1967) Ampelográfiai album. Termesztett borszőlőfajták 1. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- Nunes C.F., Ferreira J.L., Fernandes M.C.N., Breves S., Generoso A.L., Soares B.D.F., Dias M.S.C., Pasqual M., Borem A. et Cançado G.M.** (2011). An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. *Ciência Rural* 41(8), 1383–1389.
- Öner, T. Ö. Temel, M. Pamay, S. Abacı, A. K. and Akkale, H. B. K.** (2022). An Improved Method for Efficient DNA Extraction from Grapevine. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*. 6(1), 21-36.
- OIV.** (2009). OIV Descriptor List for Grape Varieties and *Vitis* Species. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2<sup>ème</sup> édition, Paris, France: 232p.
- Palomera-Avalos, V. Castro-Felix, P. and Villalobos-Arambula, A. R.** (2008). High yield and high-quality DNA from vegetative and sexual tissues of Mexican white pine (*Pinus ayacahuite*). *African Journal of Biotechnology*. 7(1), 51-54.
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E.** (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I. and Strobeck C.** (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molec. Ecol.*, 4, 347-354
- Piccolo, S. L., Alfonzo, A., Conigliaro, G., Moschetti, G., Burrano, S., & Barone, A.** (2012). A simple and rapid DNA extraction method from leaves of grapevine suitable for polymerase chain reaction analysis. *African Journal of Biotechnology*, 11(45), 10305.
- Pirttilä, A. M. Hirsikorpi, M. Kämäräinen, T. Jaakola, L. and Hohtola, A.** (2001). DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 273-273.
- Pollefeys, P., & Bousquet, J.** (2003). Molecular genetic diversity of the French-American grapevine hybrids cultivated in North America. *Genome*, 46(6), 1037-1048.

- Popescu, C. F., & Crespan, M.** (2018). Combining microsatellite markers and ampelography for better management of romanian grapevine germplasm collections. *Notulae Scientia Biologicae*, 10(2), 193-198.
- Pulliat, V.** (1898). *Les vignobles d'Algérie*. C. Coulet.
- Rahali, M., Migliaro, D., Laiadi, Z., Bertazzon, N., Angelini, E., Crespan, M.** (2019). Genetic identification, origin and sanitary status of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) grown in Babar, Algeria. *Vitis*, 58(4), 153-158.
- Raimondi, S., Ruffa, P., De Lorenzis, G., Imazio, S., Fiori, S., Failla, O., Schneider, A.** (2015). Detection of grapevine synonyms in Lombardy and Piedmont regions (northern Italy). *Vitis*, 54, 31-36.
- Rathnayake, A. S., Allué, J., Llugany, M., Puig-Pujol, A., Hirimburegama, K., & Poschenrieder, C.** (2014). High quality DNA obtained from a single seed of *Vitis vinifera* L. using rapid DNA extraction method. *American Journal of Plant Sciences*. 5, 2023-2030.
- Ravaz, L.** (1902). *Les Vignes Americaines : Porte-Greffes et Producteurs Directs (Caracteres Aptitudes)*; Coulet et Fils, Éditeurs: Montpellier, France ; 390p.
- Reynier, A.** (2007). Manuel de viticulture, 10 ème Edition. *Editions Tec et Doc Lavoisier, Paris*, 532p.
- Riahi, L., Laucou, V., Le Cunff, L., Zoghlami, N., Boursiquot, J.M., Lacombe, T., El-Heit, K., Mliki, A., This, P.** (2010). Genetic structure and differentiation among grapevines (*Vitis vinifera*) accessions from Maghreb region. *Genet. Resour. Crop Evol*, 57, 255-272.
- Riahi, L., Laucou, V., Le Cunff, L., Zoghlami, N., Boursiquot, J. M., Lacombe, T., This, P.** (2012). Highly polymorphic Nssr markers:a useful tool to assessorigin of North African cultivars and to provide additional proofs of secondary grapevine domestication events. *Scientia horticulturae*, 141, 53-60
- Riaz, S., & Kays, S. J.** (2010). "Molecular techniques in grapevine diversity and breeding." *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135(3), 298-309.
- Riaz, S., De Lorenzis, G., Velasco, D., Koehmstedt, A., Maghradze, D., Bobokashvili, Z., Arroyo-Garcia, R.** (2018). Genetic diversity analysis of cultivated and wild grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions around the Mediterranean basin and Central Asia. *BMC plant biology*, 18(1), 1-14.
- Ribeiro R.A. et Lovato M.B.** (2007). Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Genetics and Molecular Research* 6(1), 173–187.



- Robinson J., Harding J., Vouillamoz J.** (2013). Wine grapes: a complete guide to 1,368 vine varieties, including their origins and flavours. Penguin UK.
- Russell A., Samuel R., Rupp B., Barfuss M.H.J., Šafran M., Besendorfer V. et Chase M.W.** (2010). Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandaeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon* 59(2), 389–404.
- Sabir, A., Tangolar, S., Büyükalaca, S., and Kafkas, S.** (2009). Ampelographic and molecular diversity among grapevine (*Vitis* spp.) cultivars. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 45(4).
- Sahu, S. K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K.** (2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *International Scholarly Research Notices*, 2012(1), 205049.
- Saitou, N., & Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Salayeva, S., Decroocq, S., Mariette, S., & Akhundova, E.** (2010). Comparison of genetic diversity between cultivated and wild grape varieties originating from the Near-Caspian zone of Azerbaijan. *OENO One*, 44(4), 191-200.
- Salemkour, N., Chalabi, K., Farhi, Y., & Belhamra, M.** (2012). Inventaire floristique de la région des Ziban. *Journal Algérien des Régions Arides*, 9(10), 3-16.
- Santiago, J.L., Boso, S., Gago, P., Alonso-Villaverde, V. and Martínez, M.C.** 2007. Molecular and ampelographic characterisation of *Vitis vinifera* L. “Albariño”, “Savagnin Blanc” and “Caíño Blanco” shows that they are different cultivars. *Spanish J. Agric. Res.* 5, 333–340.
- Scaldeferri M.M., Freitas J.S., Santos E.S.L., Vieira J.G.P., Gonçalves Z.S. et Cerqueira-Silva C.B.M.** (2013). Comparison of protocols for genomic DNA extraction from velame pimenta (*Croton linearifolius*), a native species to the Caatinga, Brazil. *African Journal of Biotechnology* 12(30), 4761–4766.
- Schori, M., Appel, M., Kitko, A., & Showalter, A. M.** (2013). Engineered DNA polymerase improves PCR results for plastid DNA. *Applications in Plant Sciences*, 1(2), 1200519.
- Schreiner, R. P., & Scagel, C. F.** (2017). Leaf blade versus petiole nutrient tests as predictors of nitrogen, phosphorus, and potassium status of ‘Pinot noir’ grapevines. *HortScience*, 52(1), 174-184.
- Schreiner, R. P., Lee, J., & Skinkis, P. A.** (2013). N, P, and K supply to Pinot noir grapevines: Impact on vine nutrient status, growth, physiology, and yield. *American Journal of Enology and Viticulture*, 64(1), 26-38.

- Schuck, M. R., Moreira, F. M., Guerra, M. P., Voltolini, J. A., Grando, M. S., Silva, A. L. D.** (2009). Molecular characterization of grapevine from Santa Catarina, Brazil, using microsatellite markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44, 487-495.
- Scobeyeva, V. A. Omelchenko, D. O. Dyakov, L. M. Konovalov, A. S. Speranskaya, A. S. and Krinitsina, A. A.** (2018). Comparison of some plant DNA extraction methods. *Russian Journal of Genetics*. 54, 576-586.
- Sedira, S., & Mazouz, S.** (2018). Effect of urban morphology on thermal comfort in outdoor spaces: the case of the red village-El Kantara-Biskra. *Journal of Applied Engineering Science & Technology*, 4(1), 53-59.
- Sefc, K.M., Regner, F., Turetschek, E., Glössl, J., Steinkellner, H.** (1999). Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome*, 42, 367-373.
- Sefc, K. M., & Lopes, M. S.** (2009). "Genetic diversity in the grapevine collection at the University of California, Davis: The use of molecular markers in the identification and characterization of grapevine cultivars." *Acta Horticulturae*, 827, 231-238.
- Sefc KM, Pejic I, Maletic E, Thomas MR, Lefort F** (2009) Microsatellite markers for grapevine: Tools for cultivar identification and pedigree reconstruction. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed) *Grapevine molecular physiology and biotechnology*. 2 edn. Springer Science, Dordrecht, 565-596.
- Shani, U. and A. Ben-Gal** (2005). Long-term response of grapevines to salinity: Osmotic effects and ion toxicity. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 148-154.
- Sharma A.D., Gill P.K., Singh P.** (2002). DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. 20(4), 415–415.
- Shukla, R., Sharma, D. C., Pathak, N., & Bajpai, P.** (2018). Genomic DNA isolation from high polyphenolic content *Grewia asiatica* L. leaf without using liquid nitrogen. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 42, 347-351.
- Sivritepe, N., Sivritepe, H. O., Celik, H., & KATKAT, A. V.** (2010). Salinity responses of grafted grapevines: Effects of scion and rootstock genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(3), 193-201.
- Snoussi Trifa H, Jedidi E, Ben Slimane Harbi M.** (2015). Le Razzégui: Caractérisation ampélographique, cytogénétique et moléculaire d'un cépage tunisien autochtone. *Journal of New sciences, Agriculture and Biotechnology*, 16, 574–582.



- Sümbül, A., and Yıldız, E.** (2024). Explanation of morphological and biochemical diversity of autochthonous grapes grown in Türkiye (Kelkit Basin) using multivariate analysis. *Turkish Journal of Food and Agriculture Sciences*, 6(2), 160-172.
- Surzycki, S.** (2000). General aspects of DNA isolation and purification. *Basic techniques in molecular biology*, 1-32.
- Surzycki, S.** (2012). *Basic techniques in molecular biology*. Springer Science & Business Media. 444p.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S.** (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Tello, J., Galán, Á., Rodríguez-Torres, I., Martínez-Zapater, J. M., Rubio Casanova, A., & Ibáñez, J.** (2024). Genetic fingerprinting reveals how traditional farming practices aided to preserve ancient table grape varieties in Almería (southeastern Spain). *Plants, People, Planet*, 6(6), 1453-1468.
- This P., Roux C., Parra P., Siret R., Bourse T., Adam A. F., YVON M., LACOMBE T., DAVID J., & Boursiquot, J. M.** (2001). Caractérisation de la diversité d'une population de vignes sauvages du Pic Saint-Loup (Hérault) et relations avec le compartiment cultivé. *Genetics Selection Evolution*, 33(Suppl 1), S289.
- This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., Crespan, M., Dangl, G.S., Eisenheld, C., Ferreira-Monteiro, F., Grando, M.S., Ibañez, J., Lacombe, T., Laucou, V., Magalhaes, M., Meredith, C.P., Milani, N., Peterlunger, E., Regner, F., Zulini, L., Maul, E.,** (2004). Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1448-1458.
- This P, Lacombe T, Thomas MR** (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics* 22, 511-519.
- Thomas, M.R., Matsumoto, S., Cain, P., Scott, N.S.** (1993). Repetitive DNA of grapevine : classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor Appl Genet*, 86,173-180.
- Thomson, D. and Henry, R.** (1995). Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *Biotechniques*. 19(3), 394-7.
- Tiwari, S., Tripathi, M. K., Tomar, R. S., & Ahuja, A.** (2021). Plant Genomic DNA Isolation: An Important Technology for Marker Assisted Selection. *Recent Progress in Plant and Soil Research*, 4, 85-94.

- Tsivelikas, A. L., Avramidou, E. V., Ralli, P. E., Ganopoulos, I. V., Moysiadis, T., Kapazoglou, A., ... & Doulis, A. G.** (2022). Genetic diversity of Greek grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars using ampelographic and microsatellite markers. *Plant Genetic Resources*, 20(2), 124-136.
- Tunç, Y., Yaman, M., and Yilmaz, K. U.** (2024). Elucidating the genetic diversity in wild olive (*Olea europaea* L. subsp. *oleaster*) genotypes from the Mesopotamia region with multivariate analyses. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-12.
- Van Leeuwen, Cornelis, and Jean Philippe Roby.** (2010). "Diversité génétique de la vigne. Promouvoir plusieurs voies de sélection."
- Varma, A. Padh, H. and Shrivastava, N.** (2007). Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*. 2(3), 386-392.
- Vela, E., & Benhouhou, S.** (2007). Assessment of a new hotspot for plant biodiversity in the Mediterranean basin (north Africa). *Comptes rendus biologies*, 330(8), 589-605.
- Viala, P.** (1909). *Traité général de viticulture: ampélographie* (Vol. 7). Masson.
- Wagner HW, Sefc KM .**(1999). Identity 1, Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Science, Vienna.
- Wang, T. Y. Wang, L. Zhang, J. H. and Dong, W. H.** (2011). A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genetics and Molecular Research*. 10(1), 519-525.
- Welter LJ, Gökturk-Baydar N, Akkurt M, Maul E, Eibach R, Topfer R and Zyprian EM.** (2007). Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Molecular Breeding*, 20, 359–374.
- Wolkovich, E. M., García de Cortázar-Atauri, I., Morales-Castilla, I., Nicholas, K. A., Lacombe, T.** (2018). From Pinot to Xinomavro in the world's future wine-growing regions. *Nature Climate Change* 8, 29-37
- Xin, Z. Velten, J. P. Oliver, M. J. and Burke, J. J.** (2003). High-throughput DNA extraction method suitable for PCR. *Biotechniques*. 34(4), 820-826.
- Yahiaoui, W., Laiadi, Z., Fantin, V., Olivotto, I., and Migliaro, D.** (2024). Novel insight into the identification of unexplored table grapes recovered from the Aures (Batna, Algeria): A first ampelographic and molecular characterization. *Vitis*, 63, 1-10.
- Zinelabidine, L. H., Haddioui, A., Bravo, G., Arroyo-García, R., & Zapater, J. M. M.** (2010). Genetic origins of cultivated and wild grapevines from Morocco. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(1), 83-90.

**Zinelabidine, L. H., Laiadi, Z., Benmehaia, R., Gago, P., Boso, S., Santiago, J. L., Haddioui, A., Ibnez, J., Martinez-Zapater, J. M., & Martinez, M. C. (2014).** Comparative ampelographic and genetic analysis of grapevine cultivars from Algeria and Morocco. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(2), 324–333.

**Zombardo, A., Storchi, P., Valentini, P., Ciofini, A., Migliaro, D., Crespan, M. (2021).** Recovery, molecular characterization, and ampelographic assessment of marginal grapevine germplasm from southern umbria (Central Italy). *Plants*, 10(8), 1539p.

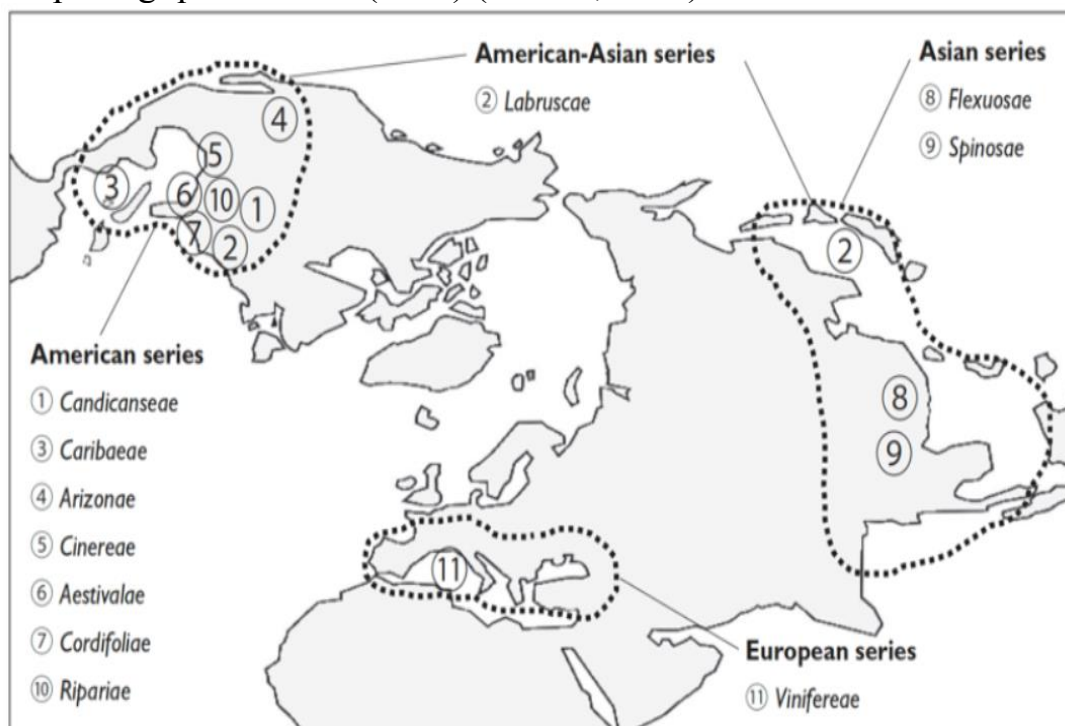
### Sites d'internet importants :

- ✓ <http://www.fao.org> (consulté en janvier 2025).
- ✓ <https://interieur.gov.dz/Monographie/charte.php?lang=fr> (consulté en janvier 2025).
- ✓ Organisation internationale de la vigne et du vin (OIV) <http://www.oiv.int> (consulté en Juin 2025).
- ✓ Italian Catalogue of Grapevine Varieties-Catalogo Nazionale delle Varietà di Vite. Available online: <http://catalogoviti.politicheagricole.it/catalogo.php> (consulté en Juin 2025).
- ✓ *Vitis* International Variety Catalogue *VIVC*. Available online : <https://www.vivc.de/> (consulté en Juin 2025).
- ✓ Cervus vs 3.0 (<http://www.fieldgenetics.com/pages/download.jsp> )
- ✓ GenAlEx release 6.51b2.xla(<http://biologyassets.anu.edu.au/GenAlEx/Welcome.html> )
- ✓ Populations-1.2.32 ([http://bioinformatics.org/populations/#ancree\\_telechargement](http://bioinformatics.org/populations/#ancree_telechargement))
- ✓ <https://www.plantgrape.fr/fr> (consulté en Juin 2025).

# **Annexes**

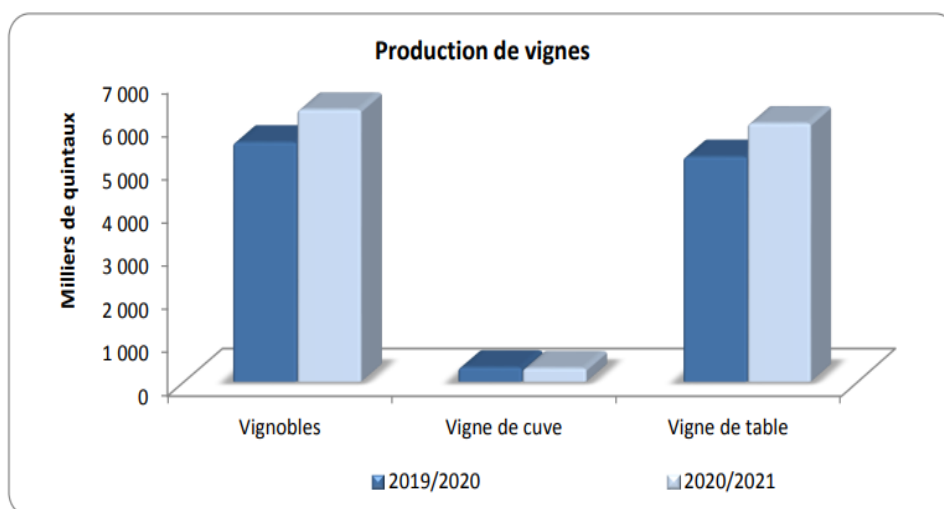
## Annexe 1.

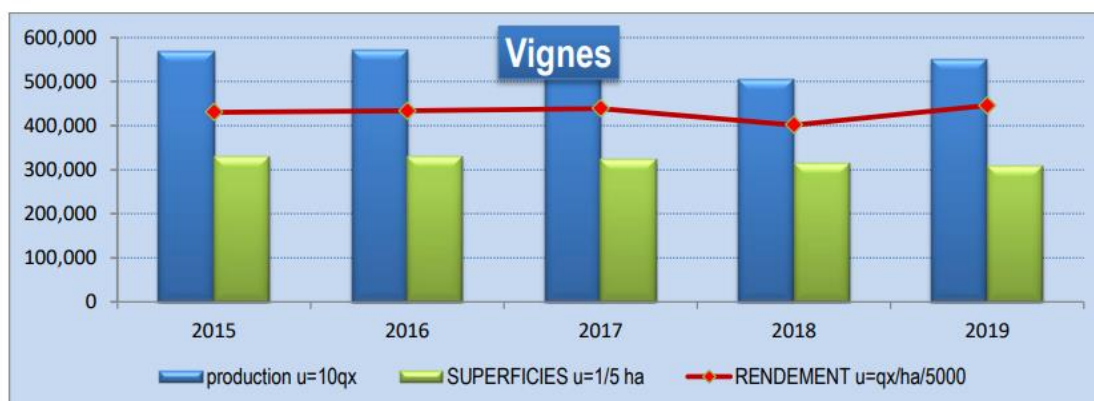
La carte de distribution des séries d'espèce du genre *Vitis* selon la classification morphologique de Galet (1988) (Chedid, 2023).



## Annexe 2.

La quantité de vignoble produite lors de la campagne 2019/2021 (N°990) en Algérie, selon l'Office National des Statistiques (<https://www.ons.dz/>).





Source : Direction des Systèmes d'Information, des Statistiques et de la Prospective. SERIE B 2019.

### Annexe 3.

**Tableau :** Evolution de la production agricole.

	2019/2020	2020/2021*	variation en %
Vignobles	5 542 011	6 299 622	13,7
Vigne de cuve	334 030	316 465	-5,3
Vigne de table	5 207 981	5 983 157	14,9
Vigne à raisin sec	0	0	/

Source : Ministère de l'agriculture et du développement rural. \* : chiffres provisoires.

### Annexe 4.

Pour préparer 250 ml de TAE 50X (pH 8,0), il faut :

- 60,5 mg Tris base.
- 14,27 ml Acide acétique glacial.
- 25 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0)
- Ajuster le volume final avec l'eau distillé à 250 ml.

Préparation de TAE 1X (pH 8,0) :

- 1 volume de TAE 50X (pH 8,0)
- 49 volumes d'eau distillée stérile.

Le bleu de chargement est préparé en mélangeant ces produits :

- 3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.
- 2,4  $\mu$ g bleu de bromophénol.
- 3  $\mu$ l glycérol.

## Annexe 5.

Résultats des paramètres ampélographiques quantitatifs (la moyenne) des 7 nouveaux génotypes identifiés.

	PL	OIV601	OIV605	OIV602	OIV612	OIV613	OIV617	OIV606	OIV603	OIV604	OIV614	OIV615	OIV611	OIV616	OIV607	OIV608	OIV609	OIV610
Génotype 1	5,985	11,555	6,356	9,766	1,031	1,574	5,360	6,006	6,893	3,979	0,613	1,139	1,574	7,045	47,577	46,529	53,784	57,589
Génotype 2	4,290	8,251	3,686	7,165	0,796	1,075	3,836	3,171	5,275	2,703	0,771	1,062	1,046	5,333	45,339	48,200	61,094	55,703
Génotype 3	4,201	8,433	2,913	6,179	0,652	1,132	3,226	3,372	4,110	2,228	0,468	0,685	0,631	5,727	50,759	48,731	58,906	52,387
Génotype 4	4,065	5,756	2,937	4,920	0,519	0,802	2,511	2,544	3,506	2,093	0,480	0,673	0,884	5,182	45,616	50,326	56,789	60,256
Génotype 5	5,5867	9,0476	4,4516	7,6603	0,6816	0,9133	3,8168	4,525	5,7055	3,196	0,5059	0,8194	1,452	7,650	47,497	45,557	54,270	56,060
Génotype 6	4,797	8,634	4,166	7,342	0,616	0,921	3,799	3,952	5,315	3,028	0,505	0,859	1,350	6,889	46,504	46,635	56,194	58,263
Génotype 7	6,043	9,069	4,944	7,485	0,678	1,443	5,033	4,245	5,004	2,677	0,365	0,768	1,199	6,500	50,702	53,440	55,304	64,771



## Annexe 6.

Cosinus carrés des variables quantitatives.

	F1	F2	F3	F4	F5
PL	<b>0,708</b>	0,049	0,033	0,012	0,016
OIV601	<b>0,899</b>	0,011	0,009	0,012	0,003
OIV605	<b>0,630</b>	0,004	0,027	0,113	0,117
OIV602	<b>0,954</b>	0,001	0,009	0,015	0,000
OIV612	<b>0,641</b>	0,070	0,020	0,035	0,123
OIV613	<b>0,671</b>	0,213	0,027	0,014	0,004
OIV617	<b>0,868</b>	0,028	0,004	0,003	0,025
OIV606	<b>0,771</b>	0,032	0,041	0,065	0,059
OIV603	<b>0,902</b>	0,001	0,028	0,018	0,000
OIV604	<b>0,904</b>	0,015	0,022	0,014	0,000
OIV614	<b>0,619</b>	0,071	0,010	0,133	0,024
OIV615	<b>0,884</b>	0,020	0,002	0,007	0,029
OIV611	<b>0,769</b>	0,069	0,002	0,004	0,000
OIV616	0,046	0,191	<b>0,478</b>	0,105	0,107
OIV607	0,071	<b>0,557</b>	0,100	0,022	0,106
OIV608	0,232	<b>0,379</b>	0,194	0,003	0,000
OIV609	0,105	<b>0,482</b>	0,042	0,001	0,184
OIV610	0,085	0,030	0,321	<b>0,451</b>	0,057