

UNIVERSITE MOHAMMED V-AGDAL  
FACULTE DES SCIENCES  
RABAT



N° d'ordre: 2353

## THESE DE DOCTORAT

Présentée par

**Ibrahim KONATE**

Discipline : Biologie

Spécialité : Biotechnologie et Biologie Moléculaire

*Diversité Phénotypique et Moléculaire du Caroubier  
(*Ceratonia siliqua* L.)  
et des Bactéries Endophytes qui lui sont Associées*

Soutenue le 14 Juillet 2007

Devant le jury :

Pr. Abdelkaim FILALI-MALTOUF

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

Pr. El Bekkay BERRAHO

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

Pr. Ahmed LAMARTI

Professeur à la Faculté des Sciences de Tétouan

Dr Mohamed ABOUROUH

Chef du Centre de Recherches Forestières (CRF)

Pr. Mustapha ARAHOU

Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat

**Président**

**Examineurs**

*A l'Etat marocain et particulièrement à Sa Majesté le Roi Mohammed VI, que Dieu le protège, pour sa noble politique du développement humain et de coopération Sud-Sud dont bénéficie la jeunesse africaine sub-saharienne pour y acquérir de bonnes formations universitaires et professionnelles.*

*A l'Etat ivoirien et principalement au Ministère de l'Enseignement Supérieur pour l'octroi d'une bourse d'étude durant mes cinq années de Thèse.*

## *DEDICACES*

Cette thèse est un Hommage à mon regretté père

*El Haj KONATE Lassina*

Il était un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon parcours  
estudiantin, qu'il se repose en paix du Dieu, amen !!!

Ma profonde reconnaissance à ma chère épouse pour son soutien sans faille, sa  
grande indulgence, sa compréhension et surtout sa contribution dans le partage de  
stress de la recherche et de la vie quotidienne de l'étranger.

Enfin, mes vifs remerciements à ma chère mère, à mon oncle KONATE Mamadou et  
son ami COULIBALY Abdourahaman, à mes frères et sœurs, KONATE Broulaye, K.  
Salia, K. Arna, K. Djamal dine, K. Aboubakar, K. Abasse, K. Mamadou, K. Brahim, K.  
Sarata, K. Zakaria, pour leur soutien moral et financier.

## *AVANT PROPOS*

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (L.M.B.M.) de la Faculté des Sciences, Université Mohammed V- Agdal, Rabat.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Mr. El Bekkay BERRAHO, Professeur de Microbiologie à la Faculté des sciences de Rabat. Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour mon sujet de recherche.

Mes remerciements les plus chaleureux et fraternels au président du jury, le Professeur Abdelkarim FILALI-MALTOUF, directeur de recherche et responsable du Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (L.M.B.M.). Ses apports scientifiques et logistiques ainsi que ses rapports humains dans le suivi et la réalisation de mes travaux de recherche ont été d'une qualité supérieure et fructueuse.

Mes remerciements vont aussi à Mr Mustapha ARAHOU, Professeur à la faculté des Sciences de Rabat, d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de critiquer et de juger ce travail. Je suis particulièrement reconnaissant et honoré par sa participation au jury de cette thèse.

Je tiens à remercier également Mr Ahmed LAMARTI, Professeur à la Faculté des Sciences de Tétouan, d'avoir accepté, malgré ses préoccupations et ses tâches d'enseignement et d'encadrement, de lire et de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Que Mr Mohamed ABOUROUH, Docteur d'Etat et Chef du Centre de Recherches Forestières (CRF), trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail.

Au Personnel de l'Ambassade de la Côte d'Ivoire à Rabat (Maroc), notamment S. Ex. Daouda DIABATE, S. Ex. Sia Bi SEI, S. Ex. Atchimon AKE C.D., Mr. Kouadio Bi Gole MICHEL, Mr. Check Ibrahim BAKAYOKO, Mahi ROLALD, ....., pour leur politique de proximité et leur compétence.

Au Pr. Jamal AURAG que j'apprécie et admire beaucoup et à tous les enseignants chercheurs du L. M. B. M., Fatiha BRHADA, Jamila MAÂTALLAH, Bouchra BELKADI et Ilham BOUHMOUCH, pour leur soutien et les conseils scientifiques prodigués.

Mes sentiments les plus profonds et remerciements infinis à mes collègues et amis du L. M. B. M., pour les relations amicales, conviviales, fraternelles et professionnelles qu'ils ont su tisser en dehors et au sein du laboratoire. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Ibtissam EL-HILALI qui est exceptionnelle, Jamal Eddine EL JAMALI, Amal BERKIA, Leila MEDRAOUI, Laila SBABOU, Amina SOROURI, Bouchra MOUHCINE, Loubna TEMSAMANI, Nargisse BENNANI, Najla ELAAFI, Farah AITOUNMANE, Siham BRHADA et Salwa MOUSSAD.

Enfin à tous mes compatriotes et amis qui ont rendu mon séjour au Maroc si agréable, plein d'encouragement, d'espoir et de compréhensions.

## *Préambule*

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation du caroubier, essence forestière vigoureusement recommandée dans les programmes de reboisement aussi bien pour ses performances écologiques que pour son importance économique pour les populations rurales. Il a bénéficié du soutien financier de la part de :

- Projet PROTAS I, P2T2/24 (2001-2004) : Valorisation de la culture du caroubier dans les régions nord du Maroc par le biais de la multiplication *in vitro* et l'exploitation de la fixation biologique de l'azote.
- Aire développement (2002- 2006) : IRD n° 01-2-MAR-28-1 : « Diversité phénotypique et moléculaire des accessions de caroubier provenant de différentes régions du Maroc ».

Les travaux effectués au cours de cette Thèse ont contribué aux publications et communications orales et affichées suivantes:

### **Publications:**

- Ibrahim Konaté, Abdelkarim Filali-Maltouf and El Bekkay Berraho\*, (2007). Diversity analysis of Moroccan carob (*Ceratonia siliqua* L.) accessions using phenotypic traits and RAPD markers. Acta Botanica Malacitana, vol. x, 2007 (Sous press).

- Ibrahim KONATE, El Bekkay BERRAHO, and Abdelkarim FILALI-MALTOUF. 2007. Phenotypic and molecular diversity among *Ceratonia siliqua* L. accessions originating from different areas of Morocco. (à soumettre)

### **Communication orale:**

- Ibrahim KONATE, El. BERRAHO, M. ABOUROUH, H. SBAI et A. FILALI-MALTOUF: Valorisation, conservation et amélioration de la culture du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.): Culture *in vitro* et étude de la diversité morphologique et moléculaire du caroubier et de bactéries hébergées par la plante. *Première Rencontre du Pôle de Compétence MisoBio, Fès (Maroc) 10- 11 décembre 2004.*

### **Communications affichées**

- Ibrahim KONATE, Amina SOROURI, El Bekkay BERRAHO and Abdelkarim FILALI-MALTOUF: Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with root and epicotyls of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *7<sup>th</sup> European Nitrogen Fixation Conference. University of Ararhus – Denmark. 22- 26: July 2006.*

- Ibrahim KONATE, B. BERRAHO, M. ABOUROUH, H. SBAI et A. FILALI-MALTOUF: Etude de la diversité morphologique et moléculaire du caroubier (*Ceratonia siliqua L.*). *Première Rencontre du Pôle de Compétence MisoBio, Fès (Maroc) 10- 11 décembre 2004*
- Ibrahim KONATE, B. BERRAHO, M. ABOUROUH, H. SBAI et A. FILALI-MALTOUF: Molecular characterization of the carob tree (*Ceratonia siliqua L.*) using RAPD marker. *7<sup>o</sup> National Biotechnology Congress, University of Catania (Italia) 8- 10 September 2004.*
- Ibrahim KONATE, B. BERRAHO, M. ABOUROUH, H. SBAI et A. FILALI-MALTOUF: Diversity among carob (*Ceratonia siliqua L.*) accessions from different areas of Morocco. *6<sup>ème</sup> Congrès Européen sur la Fixation de l'Azote, Toulouse (France) 24- 27 juillet 2004*
- Ibrahim KONATE, B. BERRAHO, M. ABOUROUH, H. SBAI et A. FILALI-MALTOUF: Identification du polymorphisme moléculaire chez le caroubier (*Ceratonia siliqua L.*): utilisation des marqueurs RAPD. *3<sup>ème</sup> Congrès National de Génétique et Biologie Moléculaire, Tanger (Maroc) 18- 20 décembre 2003*
- Ibrahim KONATE, B. BERRAHO, M. ABOUROUH, H. SBAI et A. FILALI-MALTOUF: Contribution à l'amélioration de la culture du caroubier (*Ceratonia siliqua L.*) via la multiplication végétative *in vitro*. *VIII<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies, Amélioration des Plantes et Sécurité Alimentaire, Marrakech (Maroc) 7 au 9 octobre 2002.*

## Résumé

L'étude de la diversité du caroubier, collecté de différentes régions du Maroc, a révélé un polymorphisme élevé. L'analyse des caractères morpho-agronomiques ainsi que l'analyse de la variabilité tégumentaire des graines, ont permis d'identifier 3 groupes distincts au sein des accessions étudiées.

Par ailleurs, nous avons mis au point un protocole d'extraction de l'ADN génomique du caroubier, déterminé les conditions optimales pour l'amplification par PCR et évalué la diversité génétique par deux techniques: RAPD et ISSR. La RAPD, plus discriminante, a permis de montrer un polymorphisme génétique inter accessions très élevé. En outre, l'analyse cumulant les données ISSR, RAPD et dureté tégumentaire, a généré une phylogénie analogue à celle révélée par la RAPD.

Concernant la caractérisation des bactéries endophytes du caroubier, une grande variabilité génétique a été révélée par Rep-PCR. L'analyse du gène ADNr 16S des souches représentants les groupes Rep, a permis d'identifier 6 groupes dont deux sont rapprochés aux souches de référence du genre *Rhizobium*. Phénotypiquement, ces bactéries présentent des caractères morphologiques et physiologiques semblables à ceux des rhizobia.

**Mot clés:** Caroubier, bactéries endophytes, polymorphisme génétique, diversité phénotypique.



## *ABRÉVIATION*

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	ADN dont la transcription donne lieu à l'ARN ribosomal
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomale
dNTP	Désoxyribonucleide triphosphate
ARNase	Enzyme qui digère l'ARN
Taq	De <i>Thermus aquaticus</i> (bactérie qui vit dans les sources chaudes)
°C	Degré Celsius
%	Pourcentage
g	Gramme
mg	Milligramme
µg	Microgramme
ng	Nano gramme
ml	Millilitre
µl	Microlitre
M	Molaire
mM	Millimolaire
µmol	Micromole
pmol	Pico mole
cm	Centimètre
mm	Millimètre
µm	Micromètre
h	Heure
min	Minute
s	Seconde
U	Unité
DO	Densité optique
pb	Paire de base
kb	Kilo base
UV	Ultra violet
V	Volt
rpm	Rotation par minute
TH	Température d'hybridation
bv	biovar

Ty	Tryptone Yest Extract
YEM	Yest Extract Mannito
<hr/>	
Mg Cl <sub>2</sub>	Chlorure de Magnesium
BSA	Bovine Serum Albumin
EDTA	Ethyl Diamine Tétra acétyle
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
PEG	Polyéthylène glycol
MES	Acide sulfonique 2N-Morpholino-éthane
MOPS	Acide sulfonique 3N-Morpholino-propane
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBE	Tampon Tris - Borate- EDTA
TE	Tris - EDTA
BET	Bromure d'Ethidium
AlCl <sub>3</sub>	Chlorure d'aluminium
CdCl <sub>2</sub>	Chlorure de cadmium
CoCl <sub>2</sub>	Chlorure de cobalt
HgCl <sub>2</sub>	Chlorure de mercure
MnCl <sub>2</sub>	Chlorure de manganèse
ZnCl <sub>2</sub>	Chlorure de zinc
NaCl <sub>2</sub>	Chlorure de sodium
<hr/>	
AFLP	Polymorphisme de Longueur de Fragments Amplifiés
ARDRA	De 'Amplified Ribosomal DNA – Restriction Analysis'
PCR	Reaction de Polymerisation en Chaine
RAPD	Polymorphisme de l'ADN Amplifié au Hasard
PFLP	Polymorphisme de Longueur de Fragments de Restriction
PEP/PCR	De 'Repetitive Extragenetic Palindromic – PCR'
SSR	Séquences Simples Répétées ou Microsatellites
ISSR	De 'Inter – Simple Sequence Repeat'
<hr/>	
D	Diversité
P	Polymorphe
M	Monomorphe

## *SOMMAIRE*

<i>Introduction Générale</i>	17
<i>Chapitre I: Revue bibliographique</i>	
<b>1. PRESENTATION DU CAROUBIER: <i>Ceratonia siliqua</i> L.</b>	20
1. 1. Taxonomie	20
1. 2. <i>Données botaniques</i>	20
1. 3. Reproduction biologique	23
<b>2. ORIGINE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE</b>	23
2. 1. Origine du caroubier	23
2. 2. Distribution géographique du caroubier	24
<b>3. PROPRIETES ET UTILISATIONS</b>	25
3. 1. Propriétés	25
3. 2. Utilisations du caroubier	27
3. 2. 1. Arbre	27
3. 2. 2. Fruit	28
3. 2. 2. 1. Pulpe	28
3. 2. 2. 2. Graines	29
3. 2. 3. Feuilles	30
3. 2. 4. Ecorce	30
<b>4. AIRE DE PRODUCTION</b>	30
<b>5. PROPAGATION DU CAROUBIER ET CONCEPTION DU VERGER</b>	31
5. 1. Propagation du caroubier	32
5. 1. 1. Germination des graines	32
5. 1. 2. Propagation végétative: bouturage	32
5. 2. Conception du verger	35
<b>6. RESSOURCES ET DIVERSITE GENETIQUE</b>	35
6. 1. Ressource et variabilité génétique	35
6. 2. Amélioration génétique	35
6. 3. Quelques outils pour l'amélioration des ressources génétiques	37
6. 3. 1. Polymorphisme de plante	38
6. 3. 1. 1. Polymorphisme phénotypique	38

6. 3. 1. 1. 1. Polymorphisme agronomique	39
6. 3. 1. 1. 2. Variabilité de la taille du génome ou polyploïdie	39
6. 3. 1. 2. Polymorphisme biochimique	41
6. 3. 1. 3. Polymorphisme moléculaire	41
6. 3. 1. 3. 1. RFLP: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	42
6. 3. 1. 3. 2. RAPD: <i>Random Amplified Polymorphic ADN</i>	42
6. 3. 1. 3. 3. Microsatellites ou <i>SSR (Simple Sequence Repeats)</i>	44
6. 3. 1. 3. 4. ISSR: <i>Inter-Simple Sequence Repeat</i>	45
6. 3. 1. 2. 5. AFLP: <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>	45
<b>7. CONSERVATION DU CAROUBIER</b>	46

## *Chapitre II: Etude du polymorphisme phénotypique du caroubier*

<b>1. INTRODUCTION</b>	49
<b>2. MATERIEL ET METHODES</b>	49
2. 1. Matériel végétal	49
2. 2. Marqueurs morfo-agronomiques	50
2. 3. Variabilité dans la dureté tégumentaire des graines	51
2. 3. 1. Scarification à l'aide de l'acide sulfurique	51
2. 3. 2. Scarification par l'eau bouillante	51
2. 3. 3. Analyse des données	51
<b>4. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	52
4. 1. Diversité agro-morphologique inter-accession	52
4. 1. 1. Observation de l'aspect des gousses	52
4. 1. 2. Mesure des variables agro-morphologiques	55
4. 1. 3. Relation génétique inter-accession	60
4. 2. Variabilité de la dureté tégumentaire des graines	62
4. 2. 1. Aspect des graines	62
4. 2. 2. Différence dans la dureté du manteau des graines	62

## *Chapitre III: Etude du polymorphisme moléculaire*

1. INTRODUCTION	68
<b>2. MISE AU POINT DE DIFFERENTS PROTOCOLES</b>	68
2. 1. Matériel végétal	68
2. 2. Protocoles d'extraction de l'ADN génomique, testés et/ou modifiés	68
2. 2. 1. Protocole de Ouenzar et al. (1998) modifié et adapté au caroubier	69

2. 2. 2. Evaluation de la qualité et de la quantité de l'ADN extraite	69
2. 3. Procédures d'amplification de l'ADN du caroubier par PCR	70
2. 3. 1. Mise au point de la réaction PCR/ISSR	70
2. 3. 1. 1. Mélange réactionnel	70
2. 3. 1. 2. Amplification d'ADN de caroubier par PCR/ISSR	70
2. 3. 2. Mise au point de la réaction PCR/RAPD	71
2. 3. 2. 1. Mélange réactionnel	71
2. 3. 2. 2. Amplification d'ADN de caroube par PCR/RAPD	72
2. 3. 3. Mise au point de la technique AFLP	72
2. 3. 3. 1. Etape 1: Digestion totale de l'ADN par deux endonucléases	72
2. 3. 3. 2. Etape 2: Ligation des produits digérés	73
2. 3. 3. 3. Etape 3: Amplification d'ADN <i>via</i> PCR	73
2. 3. 3. 3. 1. Pré-amplification: PCR1	73
2. 3. 3. 3. 2. Amplification sélective: PCR2	74
<b>3. ETUDE DE POLYMORPHISME MOLECULAIRE DES ACCESSIONS DU CAROUBIER</b>	75
3. 1. Matériel végétal et extraction de l'ADN génomique	75
3. 2. Analyse génétique du caroubier <i>via</i> PCR/ISSR	75
3. 2. 1. Amplification par PCR	75
3. 2. 2. Analyse des données ISSR	76
3. 3. Caractérisation génétique du caroubier <i>via</i> PCR/RAPD	76
3. 3. 1. Amplification par PCR	76
3. 3. 2. Analyse des données RAPD	76
3. 4. Somme des analyses: physiologique (dureté tégumentaire) et moléculaires	76
<b>4. RESULTAS ET DISCUSSION</b>	77
4. 1. Extraction de l'ADN génomique du caroubier	77
4. 2. Tests d'amplification de l'ADN <i>via</i> PCR	78
4. 2. 1. Mise au point et optimisation de la réaction PCR/ISSR	78
4. 2. 2. Mise au point et optimisation de la réaction PCR/RAPD	80
4. 2. 3. Mise au point de la technique AFLP	82
4. 3. Caractérisation moléculaire des accessions du caroubier <i>via</i> ISSR	82
4. 3. 1. Caractérisation des amorces ISSR	84
4. 3. 2. Caractérisation des marqueurs ISSR	85
4. 3. 3. Classification des accessions selon ISSR	87
4. 4. Caractérisation moléculaire des accessions du caroubier <i>via</i> RAPD	88
4. 4. 1. Choix des amorces	88
4. 4. 2. Caractérisation des marqueurs RAPD	90

4. 4. 3. Classification selon RAPD	92
4. 5. Classification générale des accessions du caroubier	93
Chapitre IV: Revue bibliographique sur les bactéries endophytes	
<b>1. RHIZOSPHERE ET BACTÉRIES RHIZOSPHERIQUES</b>	95
1.1. La rhizosphère	95
1. 2. La communauté microbienne de la rhizosphère	95
<b>2. LES SYSTÈMES DIAZOTROPHIQUES</b>	96
2. 1. Les systèmes diazotrophiques exophytes	97
2. 1. 1. Le système diazotrophique exophyte libre	97
2. 1. 2. Le système diazotrophe exophyte associative	97
<b>3. LES SYSTÈMES DIAZOTROPHES ENDOPHYTIQUES</b>	98
3. 1. Les systèmes diazotrophique endophytes symbiotiques	98
3. 1. 1. L'infection et colonisation des plantes hôtes par les endophytes symbiotiques	98
3. 1. 2. les diazotrophes symbiotiques rhizobiens : <i>Rhizobium</i>	99
3. 1. 3. Les diazotrophes symbiotiques actinorhiziens : <i>Frankia</i>	102
3. 2. Systèmes diazotrophiques endophytes associatives	102
3. 2. 3. Infection et colonisation de la plante hôte par les endophytes associatives	103
3. 2. 4. La diversité des bactéries endophytes associatives	105
a. Le genre <i>Azospirillum</i>	105
b. Le genre <i>Azoarcus</i>	106
c. Le genre <i>Bacillus</i>	106
d. Le genre <i>Beijerinckia</i>	106
e. Le genre <i>Gluconacetobacteres</i> , espèce: <i>G. diazotrophicus</i>	108
f. Le genre <i>Herbaspirillum</i>	108
g. Les Rhizobia	108
3. 2. 5. Importance des bactéries endophytes associatives	109
3. 2. 5. 1. La fixation biologique de nitrogène (FBN) par endophytes associatives	109
a. Activité de la réduction d'acétylène (ARA)	110
b. Capacité métabolique des endophytes associatives	110
c. Détection des gènes <i>nif</i> et <i>fix</i> chez les endophytes associatives par PCR	112
3. 2. 5. 2. Solubilisation des phosphates	113
3. 2. 5. 3. Production des phytohormones par endophytes associatives	114
3. 2. 5. 4. Bio-protection des plantes par des bactéries endophytes associatives	115
<b>4. APPROCHES D'ÉTUDES DES ENDOPHYTES ASSOCIATIVES</b>	116
4.1. Les approches phénotypiques	116
a. La tolérance aux pHs	117

b. La tolérance à la salinité	117
c. la résistance intrinsèque aux antibiotiques	118
d. Résistance intrinsèque aux métaux lourds	118
4.2. Les approches moléculaires	118
4. 2. 1. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction	119
4. 2. 2. Les méthodes d'amplification génomique	119
a. La PCR/RFLP des gènes ribosomiques	119
b. PCR/RFLP des gènes symbiotiques	120
4. 2. 3. La PCR des séquences répétées	120

## *Chapitre V: Diversité moléculaire des endophytes de Ceratonia siliqua*

<b>1. INTRODUCTION</b>	121
<b>2. MATERIEL ET METHODES</b>	121
2. 1. Matériel végétal	121
2.2. Isolement des bactéries endophytes	122
2. 2. 1. Isolement à partir des racines	122
2. 2. 2. Isolement à partir des épicotyles	123
2.3. Etude de la diversité génétique par PCR/REP	123
2.3. 1. Souches bactériennes	124
2.3. 2. Extraction d'ADN	124
2. 3. 3. Condition d'amplification	125
2. 3. 4. Analyse numérique	126
<b>3. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	126
3.1. Isolement de bactéries endophytes à partir des racines et épicotyles	126
3.2. Diversité génétique des isolats endophytes <i>via</i> la REP	129

## *Chapitre VI: Etude phylogénétique des endophytes du caroubier par analyse du segment 16S ADNr*

<b>1. INTRODUCTION</b>	137
<b>2. MATÉRIEL ET METHODES</b>	138
2. 1. Souches bactériennes et milieu de culture	138
2. 2. Extraction de l'ADN génomique	138
2. 3. Amplification du segment d'ADNr 16S par PCR	140
2. 3. 1. Amorces d'amplification	140
2. 3. 2. Conditions d'amplification	140

2. 3. 3. Digestion enzymatique du segment ADN amplifié	141
2. 3. 4. Analyse numérique	141
<b>3. RÉSULTATS ET DISCUSSION</b>	141

## *Chapitre VII: Caractérisation phénotypique des bactéries endophytes du caroubier*

<b>1. INTRODUCTION</b>	150
<b>2. MATERIEL ET METHODES</b>	150
2. 1. Souches bactériennes et milieu de culture	150
2. 2. Tolérance à la salinité	150
2. 3. Tolérance aux pHs	151
2. 4. Résistance intrinsèque aux antibiotiques	151
2. 5. Résistance aux métaux lourds	151
2. 6. Solubilisation de phosphate	151
<b>3. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	151
3. 1. Tolérance à la salinité	151
3. 2. Tolérance aux pHs	154
3. 3. Résistance intrinsèque aux antibiotiques	157
3. 4. Résistance aux métaux lourds	160
3. 5. Solubilisation de phosphate	162
Conclusion générale et perspectives	165
<i>Références bibliographiques</i>	169



## *Introduction Générale*

Les écosystèmes méditerranéens sont sujets à l'effet des conditions climatiques particulières caractérisées par des précipitations rares ou irrégulières et par de longues périodes estivales sèches. Ces contraintes climatiques combinées avec une pression anthropique, conduisent généralement à une perturbation du couvert végétal couplée avec une érosion rapide des sols. En conséquence, une désertification progressive s'installe, se traduisant par un appauvrissement des sols en nutriments et en matière organique et par la perte ou la diminution de la densité et de l'activité microbienne du sol. Il est connu que ces microorganismes contribuent efficacement à l'agrégation de la structure du sol, à l'établissement des plantes par l'amélioration de leur nutrition et leur protection contre les pathogènes et les stress abiotiques.

Afin de pallier à ces problèmes et sauvegarder la fertilité des sols, plusieurs programmes de développement forestier ont été entrepris dans de nombreuses régions du monde. L'utilisation des espèces arborescentes pionnières, adaptées aux aléas climatiques et pouvant s'installer sur les sols érodés, reste la solution la plus préconisée. Ainsi, certains pays ont opté pour l'usage des arbres et arbustes appartenant à la famille de légumineuse (Nutti, 1989; Brewbaker et al. 1990). Ces espèces ont le privilège d'assimiler biologiquement l'azote moléculaire à travers les relations qu'elles tissent avec des bactéries endophytes de la famille des *Rhizobiaceae* et /ou des bactéries dites endophytes associatives qui jouent des rôles importants dans l'amélioration de leur croissance *via* l'apport des phytohormones, la solubilisation et libération des éléments nutritifs tels les phosphates, ainsi que *via* leur rôle bioprotecteur contre des agents pathogènes (Gaur, 1990; Chaintreuil et al. 2000; Baldani et Baldani, 2005; Li et al. 2005).

Au Maroc, les phénomènes d'érosion et de désertification causent annuellement une perte d'environ 31.000 hectares de terre. Pour contrecarrer ces derniers problèmes et satisfaire les besoins des populations rurales en produits de forêt, des efforts considérables sont consacrés au reboisement (10 à 15. 000 hectares/an). Cependant, d'après les inventaires effectués par le Ministère chargé des Eaux et des Forêts, les échecs de reboisement sont très fréquents. L'utilisation d'espèces endémiques du Maroc pourrait améliorer le taux de réussite des opérations de reforestation.

Le caroubier fait partie de ces espèces à grand potentiel mais très peu utilisé dans les efforts de reboisement entrepris dans notre pays. C'est une légumineuse typiquement méditerranéenne, largement repartie au Maroc sous forme de peuplements spontanés ou artificiels (Emberger, 1938; Ouchkif, 1988). C'est une espèce agro-sylvo-pastorale ayant

d'énormes intérêts socio-économiques et écologiques (Batlle et Tous, 1997; Gharnit et al. 2001). Vu sa capacité de développer des stratégies d'adaptation morphologique, physiologique et biochimique vis à vis de différents degrés de contraintes hydriques, le caroubier s'installe favorablement dans les zones côtières, semi-arides et arides, d'où l'importance de son utilisation dans les programmes de reforestation et de reboisement est de plus en plus conseillée (Rejeb, 1995; Batlle et Tous, 1997). Par ailleurs, cet arbre est d'une importance économique considérable ; ses gousses, plus riches en sucre que la canne à sucre et la betterave sucrière, sont utilisées en industrie alimentaire et pharmacologique (NAS, 1979; Batlle, 1997; Markis et Kefalas, 2004).

Malgré son appartenance aux légumineuses, le caroubier a suscité des débats et des positions divergentes en ce qui concerne son rapport avec les rhizobiums. Il a été considéré par Martins-Loução et Rodriguez-Barrouceco (1982), Martins-Loução (1985) et Martins-Loução et al. (1996b) non nodulable par rhizobia, donc incapable de fixer en symbiose l'azote atmosphérique. Par contre, Missbah et al. (1996) ont rapporté sa nodulation, en caractérisant phénotypiquement les rhizobiums isolés à partir des nodosités racinaires des plantes natives de la région d'Oujda. Dans la même période, Bryan et al. (1996) ont rapporté la détection de l'activité de la nitrogénase dans les racines et bourgeons du caroubier. Récemment, il a été affirmativement révélé susceptible d'abriter des bactéries endophytes au niveau des tissus racinaires et même épicotylaires (Konaté, 2001).

Les traits morphologiques et physiologiques ont été traditionnellement utilisés pour l'identification et la gestion des cultivars du caroubier (Tous et Batlle, 1990). Au Maroc, ils ont constitué l'unique outil discriminant les différents types de caroubier, surtout dans la région de Chefchaouen et de Bab Taza (Gharnit et al. 2001, 2004). Cependant, ces caractères sont souvent influencés par les facteurs environnementaux tels le froid, et la sécheresse, ce qui entraînerait souvent des erreurs dans le choix et la sélection des cultivars. Par ailleurs, l'utilisation de critères liés aux fleurs et fruits qui sont aussi importants dans la détermination d'un cultivars, peut être limitée seulement aux arbres adultes et exclure les jeunes plantes dont le sexe n'est défini qu'après 6 ans de développement. Récemment, la technique protéique (Isozyme) a été développée et appliquée comme moyen de différenciation entre les cultivars du caroubier. Toutefois, elle n'a pu révéler que de très faibles niveaux de polymorphisme entre les cultivars (Barracosa et al. 1996; Batlle et al. 1996).

Jusqu'à nos jours, aucune information n'est disponible sur la caractérisation moléculaire de cette espèce végétale. Vu l'importance de l'analyse moléculaire dans les études de diversité, d'identification des cultivars et de détermination du sexe d'une plante notamment les arbres, nous avons entrepris dans le cadre de ce travail une étude moléculaire.

Dans le cadre de contribuer à l'amélioration et à la gestion de cette ressource génétique, une caractérisation adéquate de différentes accessions de caroubier provenant de différentes régions du Maroc ainsi que de leurs bactéries endophytes associatives, a été menée au cours de ces travaux. Les principaux objectifs du présent travail étaient:

1. Evaluer la diversité des accessions marocaines de caroubier par différentes approches phénotypiques et moléculaires, afin d'établir les relations phylogénétiques inter-accessions.
2. Constituer une collection de bactéries endophytes associatives isolées à partir des organes végétatifs du caroubier et évaluer sa diversité génétique et phénotypique, afin d'identifier la phylogénie des ces bactéries « spécifiques » au caroubier.

Le premier chapitre de ce mémoire est consacré à une synthèse bibliographique sur l'espèce de *Ceratonia siliqua* ou caroubier, sa taxonomie, sa répartition géographique, ses propriétés, ses intérêts et les techniques utilisées dans sa différenciation et les études de sa diversité.

Dans le deuxième chapitre, une caractérisation phénotypique basée sur l'analyse des caractères morfo-agronomiques liés aux fruits et sur l'aspect lié à la dureté tégumentaire des graines, a été menée afin de discriminer entre les neuf accessions du caroubier.

Le troisième chapitre a pour objectif, d'une part, la mise au point d'une méthode d'extraction d'ADN génomique du caroubier et d'autre part de trois protocoles moléculaires: PCR/ISSR, RAPD et AFLP, afin d'évaluer le polymorphisme moléculaire entre dix accessions marocaines de caroubier et établir leur phylogénie.

Le chapitre IV comporte également une synthèse bibliographique consacrée aux bactéries du sol pouvant vivre en tant qu'endophytes symbiotiques ou associatives avec diverses plantes, ainsi qu'aux différentes méthodes phénotypiques et génétiques utilisées dans les études de la biodiversité des bactéries.

Le cinquième chapitre a abordé l'isolement des endophytes et l'application de la technique moléculaire PCR/REP pour une première évaluation de la diversité et un premier regroupement génétique de ces bactéries.

Le chapitre VI est axé sur l'identification préliminaire de la position taxonomique des différentes souches du caroubier *via* l'analyse du gène ribosomal ADNr 16S par la technique ARDRA.

Le dernier chapitre est consacré à une caractérisation phénotypique de ces endophytes afin d'évaluer leur biodiversité physiologique et repérer les souches les mieux adaptées aux divers stress environnementaux.

## Chapitre I: Revue bibliographique

### 1. PRESENTATION DU CAROUBIER: *Ceratonia siliqua* L.

#### 1. 1. Taxonomie

Scientifiquement, le caroubier est appelé *Ceratonia siliqua*. Ce nom dérive du grec *keras* et du latin *siliqua*, faisant allusion à la forme de son fruit qui ressemble à la 'corne' de bouc (Bolonos, 1955). Par ailleurs, le nom dialectal *kharouf*, originaire d'hébreu, a donné lieu à plusieurs dérivés tels *Kharroub* en arabe, *algarrobo* en espagnol, *carroubo* en italien, *caroubier* en français, etc... En outre, les graines de caroube, vu leur uniformité, sont appelées 'carats' et ont servi pendant longtemps aux joailliers comme unité de poids pour peser les diamants, les perles et d'autres pierres précieuses (1 carat = 205,3mg) (Rejeb, 1995).

Le genre *Ceratonia* appartient à la famille des *Leguminosae* (*Fabaceae*) de l'ordre des *Rosales*. Toute fois, cette position taxonomique reste litigieuse. Il est généralement placé dans la tribu des *Cassieae*, sous famille des *Cesalpinoïdæ*. Cependant, certains auteurs tels que Irwin et Barneby (1981) et Tucker (1992a et b), ont émis des réserves en ce qui concerne la véracité de ce positionnement. Par ailleurs, des études cytologiques ont révélé que le genre *Ceratonia* qui possède un nombre total du chromosome  $2n=24$  est éloigné des autres membres des *Cassieae* dont le nombre du chromosome est  $2n=28$  (Goldblatt, 1981; Bureš et al., 2004). En plus, certains auteurs ont désigné *Ceratonia* comme étant l'un des genres les plus archaïques des légumineuses (Tucker, 1992a) et qui serait complètement isolé des autres genres de sa famille (Zohary, 1973).

La seconde espèce du genre, *Ceratonia oreothauma* décrite par Hillocot et al., (1980), contient selon leurs origines deux sous-espèces distinctes: la sous-espèce *oreothauma* qui est native d'Arabie (Oumane) et la sous-espèce *somalensis* qui est native du nord de la Somalie (Batlle et Tous, 1997).

#### 1. 2. Données botaniques

Le caroubier est un arbre à croissance lente, pouvant atteindre une quinzaine de mètres de hauteur (Quezel et Santa, 1962/63). Il possède une cime très étalée et un tronc dont la base peut atteindre 2 à 3 mètres de circonférence (Fig. I. 1). Sa longévité est importante, dépassant souvent les 200 ans (Rejeb et al., 1991). Ses feuilles, de 10 à 20 cm de longueur, sont persistantes, composées (4 à 10 folioles glabres), vertes, luisantes sur la face dorsale, plus claires et mates sur la face ventrale, à folioles ovales entières, légèrement échancrées au sommet et paripennées (Diamantoglou et Mitrakos, 1981; Rejeb, 1995).



**Figure I. 1:** L'arbre du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.)

L'arbre est dioïque, parfois hermaphrodite et rarement monoïque (Linskens and Scholten, 1980; Batlle et Tous, 1988). Les pieds mâles sont stériles et improductifs (Rejeb, 1995). Les fleurs mâles, femelles et hermaphrodites poussent sur des pieds différents. D'après Tucker (1992a), les fleurs sont initialement bi-sexes et au cours de leur développement, l'une des fonctions sexuelle mâle ou femelle est supprimée.

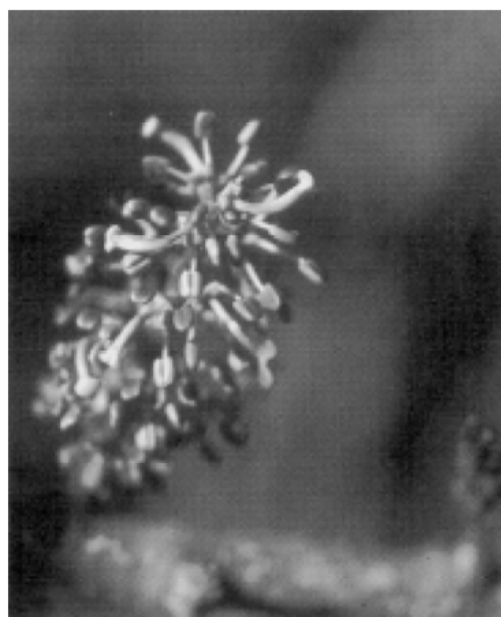
Les fleurs sont verdâtres, de petite taille (6 à 16 mm de longueur), spiralées et réunies en un grand nombre pour former des grappes droites et axillaires plus courtes que les feuilles à l'aisselle desquelles sont développées (Fig. I. 2) (Batlle et Tous, 1997). Les fleurs femelles sont constituées d'un pistil court et recourbé avec un petit ovaire (5 à 7mm) bi-carpelle. Les stigmates sont bilobés et couvertes par des papilles. A la base, le disque nectarifère est entouré de 5 à 6 sépales rudimentaires. Par contre, la corolle est absente et les fleurs mâles portent 5 étamines (Aafi, 1996).



a



b



c

**Figure I. 2:** Inflorescence mâle (a), fleurs femelles et gousses (b) et fleurs hermaphrodites (c) (Batlle et Tous, 1997)

Les grains de pollen sont ellipsoïdes avec aux pôles 28 à 29  $\mu\text{m}$  de diamètre et à l'équateur 25 à 28  $\mu\text{m}$  (Ferguson, 1980; Linskens et Scholten, 1980) et peuvent germer facilement (Sfakiotakis, 1978).

Le fruit du caroubier se développe très lentement nécessitant 9 à 10 mois pour atteindre la maturité. Il est de grande taille, 10 à 30 cm de longueur et 2 à 3.5 cm de largeur et indéhiscent après maturité. Il est vert puis brun et au moment de la maturité, brun foncé à noir. Il est sinueux sur les bords, aplati, droit ou arqué et présente un tissu pulpeux sucré et

rafraîchissant. La gousse est séparée à l'intérieur par des cloisons pulpeuses et renferme 12 à 16 graines brunes dont la longueur et la largeur sont respectivement de 8 à 10 mm et de 7 à 8 mm (Batlle et Tous, 1997).

### **1. 3. Reproduction biologique**

De nombreux aspects liés à la reproduction biologique du caroubier, tel que la floraison, la pollinisation, la compatibilité entre les différents sexes ou encore entre les cultivars, ainsi que la fructification, restent largement inconnus (Batlle et Tous, 1997). Le caroubier est considéré comme le seul arbre méditerranéen qui fleurisse en été : d'août à octobre (Aafi 1996) ou en automne : de septembre à novembre (Fournier 1977). Cependant, le temps et la durée de période de la floraison dépendent des conditions climatiques (Batlle et Tous, 1997). Quatre types d'inflorescence décrits par Schroeder (1959) peuvent occasionnellement être rencontrés sur un même arbre:

- les fleurs pistillées,
- les fleurs pistillées avec parfois des fleurs parfaites ou staminées (l'arbre se comporte comme un pied femelle),
- les fleurs parfaites avec parfois des fleurs staminées,
- les fleurs staminées ; la fleur peut démarrer hermaphrodite puis il y a une chute des pistils et la fleur devient staminée du point de vue structure et fonction.

La pollinisation des fleurs du caroubier est, en grande partie, assurée par les insectes (Retana et *al.*, 1990, 1994; Rejeb et *al.*, 1991; Ortiz et *al.*, 1996) mais aussi par le vent (Passos de Carvalho, 1988; Tous et Batlle, 1990). Les trois sexes de fleur, sécrètent des substances nectarifères dont la quantité et la contenance en sucre sont élevées dans la fleur femelle par rapport à son homologue mâle (Ortiz et *al.*, 1996).

La fructification, chez le caroubier, se situe entre juillet et décembre de l'année qui suit la floraison, selon les régions et les cultivars (Aafi, 1996). D'après Haselberg (1996), la variation dans l'intensité d'inflorescence et la production des gousses, est plutôt liée à des facteurs endogènes qu'aux aléas climatiques. Toutefois, des conditions défavorables de l'environnement peuvent entraver, d'une manière significative, la production des fruits (Batlle et Tous, 1997).

## **2. ORIGINE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE**

### **2. 1. Origine du caroubier**

Le lieu d'origine du caroubier demeure aberrant. Toutefois, De Candolle (1983) et Vavilov (1951) ont rapporté qu'il serait native de la région Est méditerranéenne (Turquie et Syrie).

Par contre, Schweinfurth (1894) a insinué qu'il est originaire des pays montagneux du Sud d'Arabie (Yémen). Tardivement, il a été considéré, par Zohary (1973), comme originaire de la flore d'Indo-Malaisie, groupé avec *Olea*, *Laurus*, *Myrtus* et d'autres plantes. Par ailleurs, *Ceratonia oreoethauma* est la seule espèce connue et originaire du Sud-est d'Arabie (Oumane) et des bordures de la corne africaine (Nord de Somalie) (Hillcoat et *al.*, 1980).

## 2. 2. Distribution géographique du caroubier

Selon Hillcoat et *al.*, (1980), le caroubier est étendu, à l'état sauvage, en Turquie, Chypre, Syrie, Liban, Israël, Sud de Jordanie, Egypte, Arabie, Tunisie et Libye avant d'atteindre l'Ouest de la méditerranéen. Il a été disséminé par les grecs en Grèce et en Italie et par les arabes le long de la côte Nord de l'Afrique, au Sud et à l'Est de l'Espagne. Dès lors, il a été diffusé au Sud du Portugal et au Sud-Est de France.



**Figure I. 3:** Centre d'origine et distribution du caroubier dans le monde (Batlle et Tous, 1997)

Le caroubier a été également, introduit avec succès dans plusieurs autres pays ayant un climat méditerranéen. C'est le cas en Australie, en Afrique du Sud, aux Etats Unis (Fig. I. 3) (Arizona, Californie du Sud), aux Philippines et en Iran (Evreinoff, 1947; dans Batlle et Tous, 1997). Généralement, la distribution des espèces arborescentes, telle que *C. siliqua* est limitée par des stress liés aux froids (Mitrakos, 1981). En effet, l'espèce *C. oreoethauma* qui semble être plus sensible au froid a une répartition restreinte et limitée seulement à Omane et au Somalie (Hillcoat et *al.*, 1980). Dans les zones basses méditerranéennes (0-500m,



rarement 900m d'altitude), le caroubier constitue une essence dominante et caractéristique du maquis des arbres sclérophylles (Zohary et Orsham 1959; Folch i Guillen, 1981).

Au Maroc, le caroubier est présent, sous forme des plantations naturelles ou artificielles, dans l'ensemble du pays jusqu'à 1150m d'altitude à l'exception des zones très arides (Emberger et Maire, 1941; Metro et Sauvage, 1955; Quezel et Santa, 1962/63; Guinochet et Vilmorin, 1984). Il est rencontré dans le Rif occidental et oriental, le pré-Rif, le Rharb, le Saïs, l'Anti Atlas, le Haut Atlas septentrional et le Plateau Central (Aafi, 1996). Les peuplements de caroubier s'intègrent dans l'ordre des *Pistacio-Rhamnalia* (Achhal et al., 1980), qui englobe des groupements de matorrals arborés claires ou arbustifs et qui sont soit naturels soit introduits en tant qu'essences régénératrices de forêts.

### 3. PROPRIETES ET UTILISATIONS

#### 3. 1. Propriétés

La pulpe et les graines sont les deux principaux constituants de la gousse du caroubier et représentent respectivement 90% et 10% de son poids total. Selon plusieurs auteurs, la composition chimique de la pulpe dépend, en générale, du cultivar, de l'origine et parfois de la période de récolte (Orphanos et Papaconstantinou, 1969; Vardar et al., 1972; Calixto et Cañellas, 1982; Albanell et al., 1991).

La pulpe est très utilisée soit comme aliment diététique, soit comme remplaçant du chocolat, ou encore en alimentation animale. Elle est très riche en sucre (48- 56%), en particulier, sucrose, glucose, fructose et maltose (Tableau I. 1), mais pauvre en protéines (2- 6%) et en lipides (0.4- 0.6%) dont les acides saturés et insaturés sont en proportions égales (Leroy, 1929; Puhan et Wieling, 1996). A partir d'extrait de gousses, cinq acides aminés, en l'occurrence, alanine, glycine, leucine, proline et valine, ont été isolés par Vardar et al., (1972) et deux autres composés, tyrosine et phénylamine, ont été rapporté par Charalambous et Paconstantinou (1966). En plus, la pulpe présente également une teneur très élevée en fibres (27- 50%) et une quantité non négligeable en tanins (18- 20%) (Saura-Calixto, 1987; Puhan et Wielinga, 1996). Par ailleurs, l'analyse minéralogique faite, par Puhan et Wielinga (1996), sur la pulpe, a révélé une composition (en mg/100g de pulpe) de: K= 1100, Ca= 307, Mg= 42, Na= 13, Cu= 0.23, Fe= 104, Mn= 0.4, Zn= 0.59.

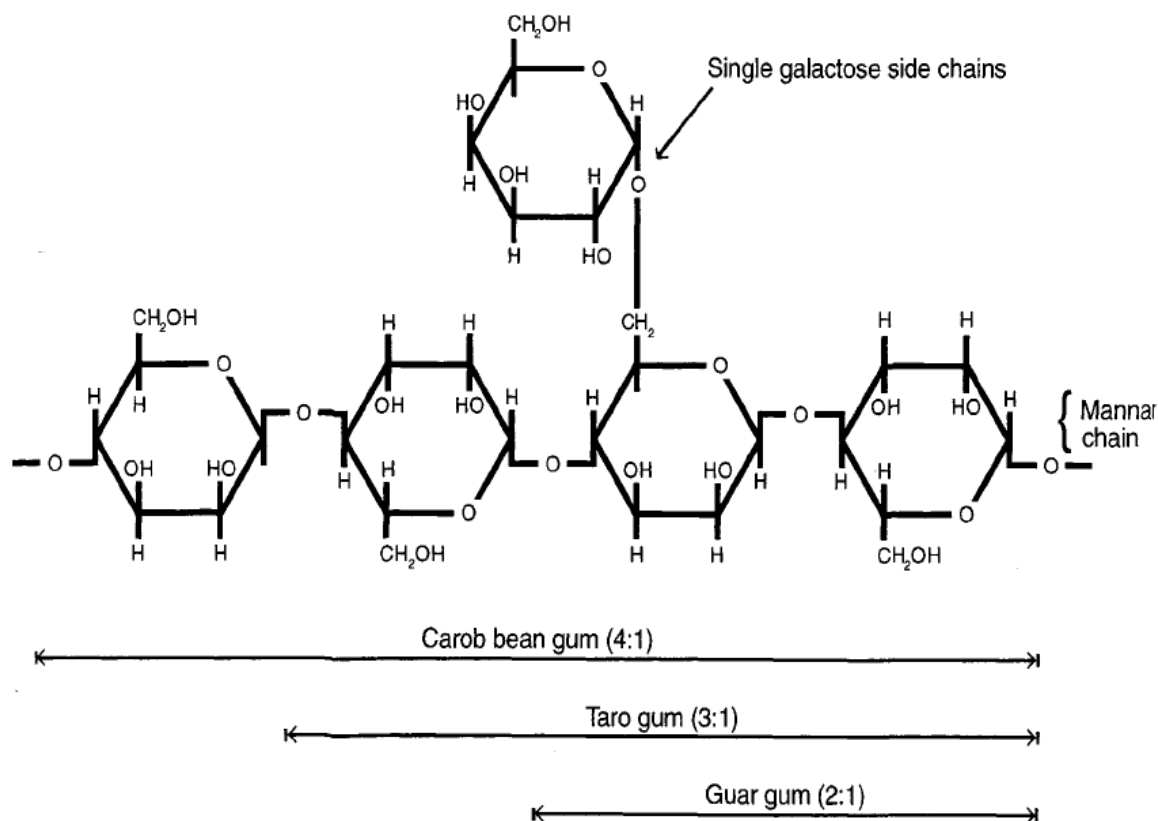
**Tableau I. 1:** Composition moyenne de la pulpe de caroube

Constituant	%
Sucres totaux	48 – 56
Sucrose	32 – 38
Glucose	5 – 6
Fructose	5 – 7
Pintol	5 – 7
Tannins	18 – 20
Polysaccharides non amines	18
Cendre	2 – 3
Lipides	0.2 – 0.6

Puhan et Wielinga (1996; cité dans Batlle et Tous, 1997)

La graine est composée de 30 à 33% d'enveloppe tégumentaire, de 42 à 46% de l'albumen et de 23 à 25% d'embryon (Neukom 1988). L'enveloppe tégumentaire est considérée comme étant une source naturelle pour la production de polyphénol antioxydant (Batista et al., 1996; Makris et Keflas, 2004). L'albumen est essentiellement constitué de gomme ou galactomannane, qui est une molécule polysaccharidique composée de deux unités de sucre, mannose et galactose, à une proportion de 4:1, peu similaire à la gomme de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) (2:1) et celle de Tara (*Colosasia esculenta* L.) (3:1) (Fig. I. 4). Ce polysaccharide naturel est doté de diverses propriétés importantes, à savoir une haute viscosité dans l'eau, même à température et à pH variables (García-Ochao et Casas 1992), une capacité de former à partir d'une solution très diluée de stable solution visqueuse et une haute potentialité de réagir avec d'autres polysaccharides induisant ainsi un effet de synergie (Puhan et Wielinga, 1996).

La valeur nutritionnelle de la gousse du caroubier est considérée similaire à celle de la plupart de céréales (Coit 1962; NAS 1979). Selon Noblet et al., (1989), la valeur d'énergie métabolique (EM) de la farine de caroube est estimée à 13.1MJ EM/kg de produit frais.



**Figure I. 4:** Gomme de caroube, de Taro (*Colosasia esculenta* L.) et de Guar (*Cyamopsis tetagonolobus*) (de Puhan et Wiellinga (1996) rapporté par Batlle et Tous, 1997).

### 3. 2. Utilisations du caroubier

Le caroubier se présente comme une essence à la foie forestière et arboricole. Il est d'une grande importance économique, écologique et sociale. Son utilisation est multiple.

#### 3. 2. 1. Arbre

L'arbre isolé peut être utilisé comme plante ornementale ou pour son ombre au bord des routes, c'est le cas en Californie, Australie et ailleurs. Les pieds mâles, qui ne fournissent pas de gousses sont les plus préférés dans le domaine d'ornementation (Batlle et Tous, 1997). Il peut être également utilisé en verger comme plantation homogène destinée à la production commerciale (Espagne, Portugal et Grèce).

Basé sur sa faible exigence en culture, sa grande tolérance vis-à-vis des sols pauvres, le caroubier est de plus en plus recommandé pour la reforestation des zones côtières dégradées sous l'effet d'érosion ou de désertification (Batlle et Tous, 1997). Actuellement, il est considéré comme l'un des arbres fruitiers et forestiers le plus performant; puisque toutes ses parties (feuilles, fleurs, fruits, bois, écorces et racines) sont utiles et ont des valeurs dans plusieurs domaines (Aafi, 1996).

### 3. 2. 2. Fruit

Dans les pays producteurs, les gousses de caroube ont été, traditionnellement, utilisées non seulement en alimentation des animaux ruminants (Louca et Papas, 1973) ou non ruminants (Sahle et *al.*, 1992), mais aussi en alimentation humaine. Après l'écrasement des gousses et séparation de pulpe et des graines, les produits dérivés de ces deux éléments sont principalement utilisés dans plusieurs domaines (Tableau I. 2).

#### 3. 2. 2. 1. Pulpe

La farine issue de pulpe peut servir comme ingrédient de certains menus de pâtisseries: gâteau, pain, bonbon, crème glacée, boisson (NAS, 1979; Vidal, 1985) ou utiliser comme substituant du cacao dans le chocolat, car elle est moins calorifique et ne contient ni caféine ni théobromine (Whiteside, 1981; Craig et Nguyen, 1984). Par ailleurs, la pulpe a été le premier produit d'horticulture utilisé en fermentation, dans plusieurs pays méditerranéens, pour la production d'alcool industriel (Merwin, 1981). En Egypte, les sirops à base de fruits de caroube constituent une boisson populaire (Batlle et Tous, 1997).

Selon certains auteurs, les organismes unicellulaires jouent un rôle important dans l'amélioration et la conversion de la pulpe en fourrage hautement riche en protéines. En effet, les extraits de sucres des gousses ont fourni un excellent substrat pour la culture fongique tel que *Aspergillus niger* et *Fusarium moniliforme*. Les mycéliums, une fois, séchés ont donné du fourrage agréable et nutritif, contenant plus de 38% de protéines brutes par rapport à leur poids (Imrie, 1973; Sekeri-Pataras et *al.*, 1973).

De nombreuses études ont démontré l'influence positive de la farine de caroube sur la performance et la santé des animaux soumis à un régime alimentaire (Lizardo et *al.*, 2002). Par ailleurs, elle joue un rôle effectif dans la suppression des parasites intestinaux (Min et Hart 2003) et dans le traitement de diarrhée (Serairi-Béji et *al.*, 2000). Les tanins, pectine et  $\beta$ -carotène ont été, jadis, utilisés en Egypte dans la médecine «traditionnelle» pour traiter la diarrhée (Hamed et *al.*, 2003). Selon certains auteurs, les fibres solubles de la pulpe peuvent avoir un effet préventif ou curatif sur la santé humaine et animale, grâce à la réduction du risque de thrombose par *biais* de la diminution de pression sanguine et le niveau de cholestérol dans le sérum (Williams et *al.*, 1995; Beaggar et *al.*, 1996).

**Tableau I. 2:** Principaux produits dérivés de la gousse (pulpe et graines) et quelques majeures utilisations (Batlle et Tous, 1997)

Produit	Traitement subi	Usage
<i>Pulpe</i>		
Brute	Aucun	alimentation animale (chevaux et ruminants)
	Moulu	alimentation humaine et animale
	extraction et purification	Sucre
	fermentation et distillation	production d'alcool et protéine bactérienne
Poudre	Lavage, séchage, torréfié et moulu	Ingrédient d'aliment; substituant de cacao; préparation des produits diététiques et pharmaceutiques
<i>Graines</i>		
Endosperme	meuler	additives d'aliments; fibres diététiques; aliments choyé; produits pharmaceutiques et cosmétiques
Embryon	Meuler	Substrat microbien; nutrition humaine et animale
Enveloppe tégumentaire	extraction	Tannins pour tanner les cuirs

### 3. 2. 2. 2. Graines

Les graines de caroube sont bien appréciées et recherchées pour leurs qualités et multiples usages industriels. L'utilisation possible, dans l'industrie alimentaire, de polyphénol antioxydant contenu naturellement dans l'enveloppe tégumentaire (Makris et Kafalas, 2004) a soulevé d'énormes intérêts au même titre que la production industrielle de gomme de caroube (Batista et *al.*, 1996). La gomme issue de l'endosperme constitue le 1/3 du poids total de graine et 100kg de graines produisent en moyenne 20kg de gomme pure et sèche (Jones, 1953).

Cette gomme mucilagineuse est utilisée dans plusieurs produits commerciaux comme agent stabilisateur, épaississeur, agglomérant et gélifiant (Batlle, 1997). En plus, elle est utilisée en industrie alimentaire pour la fabrication d'un grand nombre de denrées alimentaires: crème glacée, soupe, sauce, biscuit, tourte, confiserie, produits de boulangerie et nourriture des animaux. Par ailleurs, son application dans les domaines techniques est large. Elle est utilisée en imprimerie, photographie, textile, matière plastique, encre, cirage, matière adhésive et pharmaceutique et cosmétique (Johnson et *al.*, 1988; Neukom, 1988; Tous et Batlle, 1990).

### **3. 2. 3. Feuilles**

Dans les domaines forestiers, les pieds mâles sont souvent taillés pour le fourrage. Plusieurs études ont montré que l'utilisation des feuilles associées avec le polyéthylène glycol (PEG) améliore la digestibilité et la qualité nutritive des tanins contenus dans les feuilles (Silanikove et al., 1996; Priolo et al., 2000). Rejeb et al., (1991) ont estimé la valeur nutritive des feuilles du caroubier à 0.25uf/kg de matière sèche. Les extraits des feuilles qui contiennent de tanins ont été, en Turquie, utilisés dans la médecine 'traditionnelle' pour traiter la diarrhée et dans l'alimentation diététique (Baytop, 1984). Ces extraits foliaires ont été également désignés comme étant porteurs des activités cytotoxiques et antimicrobiennes (Kivçak et Mart, 2002).

### **3. 2. 4. Ecorce**

L'écorce du caroubier a été toujours utilisée en tannerie, particulièrement dans l'achèvement et l'émaillage des peaux (Batlle, 1997). En Turquie, elle a été également utilisée par la médecine 'traditionnelle' comme remède anti-diarrhée (Baytop, 1984).

## **4. AIRE DE PRODUCTION**

Selon Batlle et Tous (1997), l'aire totale de la production mondiale du caroubier est estimée à 210.000ha (Tableau I. 3). La plus grande superficie, 148.000 ha, se trouve dans les pays méridionaux de l'Union Européenne (Espagne, Italie, Portugal et Grèce) qui comptent 74% des superficies plantées et 70% de la production mondiale des fruits.

La production mondiale de caroube est estimée à 310.000 tonnes. Elle est essentiellement concentrée en Espagne, en Italie, au Portugal, au Maroc, en Grèce, au Chypre, en Turquie, en Algérie et autres (Tableau I. 3). Par ailleurs, de faibles productions ont été enregistrées en Croatie, en Tunisie, à Malte, en Australie, en Californie et en Afrique du sud.

**Tableau I. 3:** Superficies occupées par le caroubier et production mondiale (Batlle et Tous, 1997).

Pays	Superficie (ha)	Production de gousses		Production de graines	
		t	%	t	%
Espagne	82 000	135 000	43.5	12 000	37.5
Italie	30 000	45 000	14.5	4 000	12.5
Portugal	21 000	30 000	9.7	3 600	11.3
Maroc	25 000	26 000	8.4	4 800	15.0
Grèce	15 000	20 000	6.5	1 800	5.6
Chypre	12 000	17 000	5.5	1 700	5.3
Turquie	≈10 000	15 000	4.8	1 800	5.6
Algérie	≈5 000	7 000	2.3	800	2.5
Autres*	≈10 000	15 000	4.8	1 500	4.7
<b>Total</b>	<b>210 000</b>	<b>310 000</b>	<b>100</b>	<b>32 000</b>	<b>100</b>

\* Australie, Afrique du Sud, USA, etc.

Durant le siècle dernier, la production mondiale de caroube a connu une chute dramatique, elle est passée de 650.000t en 1945 (Orphanos et Papaconstantinou 1969) à 310.000t en 1997. La grande perte a été enregistrée en Espagne où la production a chuté de 400.000t en 1930 à 150.000t en 1990 (MAPA, 1994). Selon Batlle (1997), la régression accusée dans la production du caroubier, a été principalement liée à la baisse des prix et aux programmes du développement des zones côtières au dépend des plantations de caroubier.

Contrairement au Maroc, cette production a connu une augmentation significative ; elle est passée de 19.248t en 1981 à 24.000t en 1986 (Ouchkif, 1988b) puis à 26000t en 1997 (Batlle, 1997) et elle est estimée à 45000-50000t (Gharnit et *al.*, 2001). Les principales populations spontanées sont concentrées dans les régions de Tafechma au Nord et Ait Ishaq au Sud et à Agadir (Ouchkif, 1988a). Cependant, les trois domaines d'exploitation, commercialement connus, sont Fès, Marrakech et Agadir. La superficie occupée par le caroubier spontané, est estimée à 25000ha, mais de nouveaux vergers ont été plantés dans différentes régions du Maroc, ce qui laisse à prévoir, pour les années à venir, une hausse modérée dans la production nationale.

## 5. PROPAGATION DU CAROUBIER ET CONCEPTION DU VERGER

D'après Zohary (1973,1996), la région méditerranéenne serait le centre de la domestication du caroubier. Se basant sur les données de littérature et archéologiques, il a rapporté que le

caroubier était, tardivement, introduit dans la culture en tant qu'arbre fruitier. Il a attribué ces retards accusés dans la domestication, à la difficulté de propager le caroubier par voie végétative. Par contre, l'olivier, la vigne, le palmier dattier et le figuier ont été les premiers corps d'horticulture dans la région méditerranéenne.

Pour les cultivateurs, la propagation végétative constitue une des solutions aux problèmes liés à la grande diversité qui caractérise la reproduction sexuée. Ainsi, les plantes juvéniles de caroubier possédant des caractéristiques supérieures et prometteuses, ont été empiriquement choisies et propagées par clonage (Batlle et Tous, 1997).

## **5. 1. Propagation du caroubier**

Les donneurs potentiels de greffon sont des plantules issues de graines et qui varient largement dans leur vigueur et leur aptitude à résister au froid. Actuellement, aucun procès et ni collection sélectionnée ne sont disponibles en tant que donneurs de greffons. Toutefois, ils sont essentiellement reconnus par leur système racinaire bien développé. Les plantules sont greffées 1 ou 2 ans après leur germination dans une pépinière, puis transplantées dans les vergers (Batlle et Tous, 1997).

### **5. 1. 1. Germination des graines**

Bien que les graines de caroubier peuvent se maintenir intactes, pendant plusieurs années et à basse température, il serait judicieux d'utiliser celles provenant de la dernière récolte et de semer très tôt, au début du printemps (Goor et Barney, 1968; Hong et *al.*, 1996).

Les graines sont dotées d'une enveloppe tégumentaire épaisse et dure, ce qui nécessite une scarification préalable pour faciliter la germination. Un prétraitement avec de l'eau bouillante, l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) ou l'acide gibberelline ( $AG_3$ ) peut améliorer considérablement le taux de germination (Batlle et Tous, 1997). Avec l'acide sulfurique, le résultat de la germination est spectaculaire (Frutos, 1988), mais la durée de scarification est variable en fonction des cultivars et des provenances des graines (Konaté, 2001).

### **5. 1. 2. Propagation végétative: bouturage**

Le caroubier a été décrit par Lee et *al.*, (1977) et Hartmann et Kester (1983), comme une espèce capricieuse, très difficile à enraciner et à bouturer. Ses potentiels d'enracinements adventifs sont jugés très faibles. Cependant, Alorda et *al.*, (1987) ont pu, *in vitro* et après stérilisation et traitement hormonal (IBA), enraciner des explants composés de coupes sub-terminales de plantules âgées de 2 à 3 ans. Trois critères semblent être importants à en tenir compte pour réussir l'induction d'une rhizogénèse: la période du prélèvement de l'explant, le type de bouture (âge et position) et le génotype du donneur (potentiel d'enracinement) (Batlle et Tous, 1997). Cependant, la transplantation au champ des

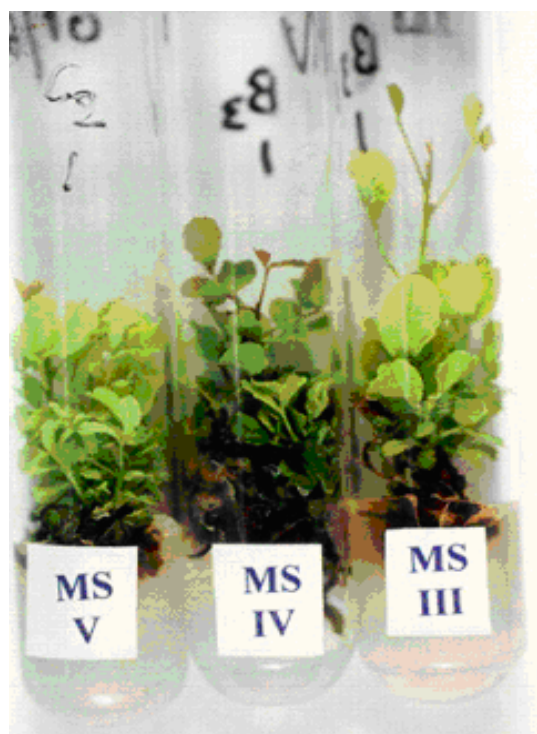


boutures enracinées *in vitro* est problématique ; son taux de réussite est satisfaisant selon Alorda et Medra (1988), trop faible selon Cabrita et *al.*, (1988).

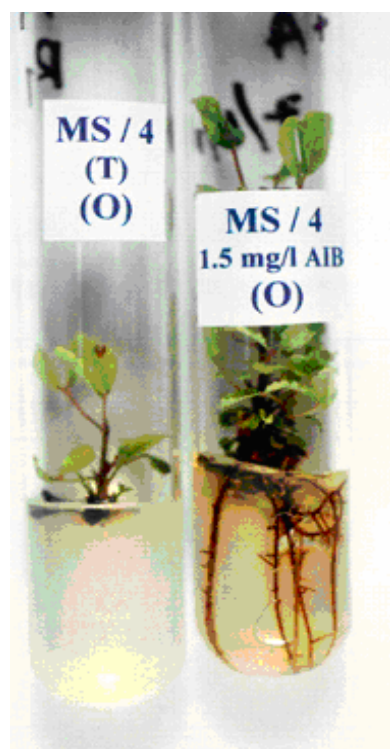
Par ailleurs, de nombreux travaux et essais, utilisant des explants juvéniles et adultes, ont été réalisés, afin d'améliorer la micro-propagation du caroubier (Martins-Loução et Rodriguez-Barrueco, 1982; Sebastian et McComb, 1986; Vinterhater et *al.*, 1992; Belaizi et *al.*, 1994; Alorda et Medrano, 1996; Gharnit, 1997). Des tentatives d'enraciner, au laboratoire, de coupes faites au dessus des cotylédons des plantules âgées de 2 et 12 mois, ont été concluantes (Konaté, 2001). Après stérilisation et traitement hormonal (5 mg/L d'AIB), 30% des deux types d'explants ont été enracinés (Fig. I. 5d). Pourtant, les coupes provenant des plantules néoformées à partir de culture d'apex *in vitro* (Fig. I. 5 a et b) et traitées avec 1.5mg/L d'AIB, ont enregistré 80% de rhizogénèse (Fig. I. 5c) (Konaté, 2001). Cependant, nous ne disposons d'aucune information sur la réussite et la stabilisation des vitroplants transférés au champ.



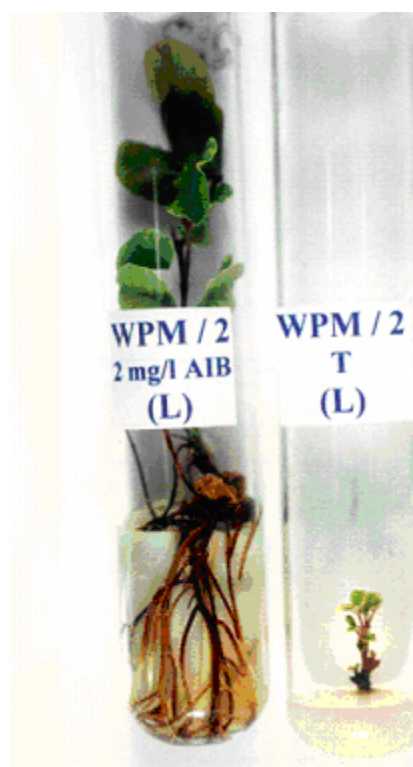
a



b



c



d

**Figure I. 7:** Micro-propagation de caroube *via* culture d'apex *in vitro* (a et b) et enracinement de vitroplant (c) et d'expant issu de plantule de 12 mois (d).

## 5. 2. Conception du verger

Dans les pays méditerranéens, la densité des arbres de caroubier dans les vergers est, généralement, basse et variable. Elle est environ de 25 à 45 arbres/ha, espacés de 15x15m à 20x20m (Batlle et Tous, 1997). Au Maroc, cette densité est évaluée à 15-45 arbre/ha (Gharnit et *al.*, 2001). Communément, ces plantations ont une conception triangulaire et sont fréquemment inter-mêlées par des oliviers, des vignes et des amandiers. Dans les vergers modernes, l'espacement entre les arbres a été réduit afin d'intensifier la récolte (Batlle et Tous, 1997). Actuellement, pour les vergers situés sur les sols secs et pauvres, notamment dans le pourtour méditerranéen, la densité recommandée est de 100 et 175 arbres/ha avec un espacement de 9x9m à 7x8m entre les arbres (Tous et Batlle, 1990).

L'arrangement des pieds pollinisateurs (males et/ou hermaphrodites) dans le verger a été ignoré par beaucoup de planteurs, ce qui pourrait soit diminuer la production soit contribuer à l'abondance de la récolte (Sfakiotakis, 1978; Batlle et Tous, 1997). Ces pollinisateurs, doivent, cependant, être parsemés en modèle régulier, aux alentours et à l'intérieur du verger. Leur proportion dans le verger dépend vraisemblablement de l'activité des insectes et du vent, notamment durant la période de pollinisation, et aussi du pollen apte à germer (Russo, 1954). Cette proportion varie de 4% selon Coit (1949) à 20% selon Merwin (1981). Néanmoins, il serait suffisant de planter environ 12% d'arbres pollinisateurs, soit environ 1 pied mâle pour 8 pieds femelles (Tous et Batlle, 1990).

## 6. RESSOURCES ET DIVERSITE GENETIQUES

### 6. 1. Ressource et variabilité génétique

Le caroubier a été, depuis des siècles, propagé en culture par semis et plus tard par bouturage et greffage. Ainsi, les plantes choisies au hasard, dans les populations locales, ont été à la base de la sélection des cultivars et l'établissement des vergers commerciaux (Batlle et Tous 1997). De ce fait, le caroubier cultivé ne diverge pas beaucoup de son ancêtre sauvage (Zohary, 1973). Toutefois, les différents cultivars recensés actuellement dans le monde se distinguent entre eux par leur vigueur, leur taille, leur qualité de gousses, leur graines, leur productivité et leur résistance aux maladies (Batlle et Tous, 1997).

Cependant, des études basées sur l'analyse enzymatique (Isozymes), ont révélé de très faible niveau de polymorphisme entre les cultivars de différentes origines (Tous et *al.*, 1992; Batlle et *al.*, 1996) et de même origine (Barracosa et *al.*, 1996). Ce dernier type d'analyse, a montré une grande similarité entre les caroubiers de type sauvage et cultivé (Batlle et *al.*, 1996). Par contre, l'analyse cytologique et particulièrement la taille du chromosome, des caroubiers présents dans la réserve 'Evolution Canyon d'Israel', a révélé une large variabilité

intra-spécifique par la présence d'individus diploïdes, triploïdes et tétraploïdes (Bureš et al., 2004).

Par ailleurs, les dérives génétiques et la pression sélective provoquées par le phénomène d'érosion génétique ont occasionné d'énormes inconvénients dans la conservation des variétés génétiques de cette espèce (Batlle et Tous, 1997).

Les cultivars communément connus dans les vergers commerciaux sont essentiellement composés de femelles sélectionnées et quelques pieds males et/ou hermaphrodites éparpillés. La sélection a été traditionnellement basée sur la qualité du fruit notamment la grandeur de la gousse, le poids de pulpe et la teneur en sucre. Sachant que la quantité de la pulpe et le nombre de graines d'une gousse sont corrélés négativement, les planteurs se sont plus penchés sur le critère de rendement des gousses en graines qui est actuellement plus valable et rentable sur le plan commercial.

**Tableau I. 4:** Les principaux cultivars de caroubier dans le monde (Batlle et Tous, 1997)

<b>Pays</b>	<b>Région ou district</b>	<b>Cultivar ou type</b>
<b>Espagne</b>	Tarragona, Castellón, Barcelone, Valence, Alicante, Majorque, Murcia, Málaga	'Negra', 'Matalafera', 'Duraio', 'Rojal', 'Bugadera', 'Costella d'Ase', 'Mollar', 'Lindar', 'Melera', 'Sayalonga', 'Comuna', 'Boval', 'Del Pom', 'Banyeta', 'Borrera', 'Cacha', 'Banya de Cabra', 'Casuda'
<b>Italie</b>	Sicile, Apulia	'Gibiliana', 'Racemosa', 'Saccarata', 'Amele di Bari'
<b>Portugal</b>	Algarve, Alentej	'Mulata', 'Galhosa', 'Canela', 'AIDA'
<b>Maroc</b>	Fès, Marrakech, Mokrisset, Bab Taza	Agadir, 'Lanta', 'dkar: types sauvages non greffés'
<b>Grèce</b>	Crète	'Hemere', 'Tylliria'
<b>Chypre</b>	Toutes les îles	'Tylliria'
<b>Turquie</b>	Côte méditerranéenne, Izmir	Type 'sauvage' et 'charnu', type 'Sisam'
<b>Tunisie</b>	Tabarka, Beni-Khiar, Sfax	'Sfax'
<b>Israël</b>		'Tylliria', 'Sandalawi', 'Habati', 'Aaronsohn nos'
<b>USA</b>	Californie	'Santa Fe', 'Clifford', 'Bolser', 'Grantham'
<b>Australie</b>	Sud et Ouest australien	'Bath', 'Irlam', 'Maitllan', 'KP-1', 'Princess', 'Marshall no. 1'

Les principaux cultivars de caroubier recensés à travers les différents pays du monde, ont été consignés dans le tableau (I. 4). En Espagne, les cultivars sont caractérisés par leur haute teneur en pulpe dans les gousses, avec un rendement moyen en graine de 8 à 10%. En effet, les cultivars des îles Baléares se distinguent par une grande production en graines pouvant atteindre 16%, contrairement aux écotypes spontanés d'Andalousie où le rendement en graines ne dépasse pas 8% (Batlle et Tous, 1997). Au Maroc, il existe deux cultivars, 'lanta' qui est le type greffé et 'dkar' le type sauvage et la production massive de gousse est assurée par des populations spontanées qui ont enregistré un rendement très élevé en graines : 15% selon Ouchkif (1988b) et 12 à 25% selon Gharnit et *al.*, (2001). Ces graines sont caractérisées par des péricardes non charnues (Ouchkif, 1988b).

## **6. 2. Amélioration génétique**

Jusqu'au aujourd'hui, la seule amélioration apportée au caroubier, a été l'oeuvre des planteurs. Ces derniers ont sélectionné par hasard les plantes estimées prometteuses afin de greffer les génotypes les moins fructueux. L'absence d'un programme planifié pour la reproduction et la multiplication du caroubier serait, en grande partie, due à son importance relativement mineure. En effet, un tel programme incluant la reproduction et le choix de la progéniture des futures plantes, est sensiblement coûteux, notamment que plus de 8 années peuvent s'étaler du semis à la fleur, rendant le processus très lent (Batlle et Tous, 1997). L'usage des marqueurs moléculaires, particulièrement pour déterminer le sexe, pourrait non seulement accélérer la première sélection, mais aussi tous les processus. Cependant, le système de reproduction y compris la pollinisation et l'expression du sexe sous les contraintes écologiques, demeure non élucidé. Par ailleurs, divers clones issus des vieux arbres qui ont, dans le temps, accumulé différentes mutations spontanées, peuvent être exploités pour sélectionner les meilleurs clones à des fins commerciales (Batlle et Tous, 1997).

## **6. 3. Quelques outils pour l'amélioration des ressources génétiques**

Des réflexions critiques concernant les stratégies empiriques de l'amélioration génétique des rendements dans les milieux à fortes contraintes, ont abouti à la proposition d'une stratégie globale associant des études conduites à différents niveaux d'intégration (génome, plante, peuplement) et intégrant divers outils physiologiques, génétiques et moléculaires (Monneveux et Depigny-This, 1995).

### **6. 3. 1. Polymorphisme de plante**

Le polymorphisme est une caractéristique souvent étudiée en biologie. Que ce soit pour différencier des populations d'organismes, déterminer les pathovars, cibler des populations naturelles pour en apprécier les relations et donc les distances génétiques ou déterminer

l'écotype (Bertheau et *al.*, 1993). Les critères utilisés peuvent être phénotypiques, biochimiques (capacité à utiliser un substrat, information d'une enzyme) ou moléculaires.

### **6. 3. 1. 1. Polymorphisme phénotypique**

Les caractéristiques phénotypiques constituent un outil incontournable dans la classification et la taxonomie des micro et macro organismes et continue, à nos jours, d'être utilisée (Stuessy, 1990). Elles servent entre autre à repérer d'éventuelle contamination ou encore d'étiquetage ultérieur.

Les caractères morphologiques sont très importants et révèlent de la caractérisation. Ils sont généralement quantitatifs et ont un déterminisme mono et polygénique. Toutefois, ils peuvent être influencés par des facteurs environnementaux et comprennent d'une part des mesures biométriques portant sur la plante (taille et forme des gousses, des feuilles, longueur d'inflorescence, nombre de fleurs, etc.) et d'autre part des données qualitatives comme la couleur des gousses, le taux de graines (Batlle et Tous, 1997; Gharnit et *al.*, 2004).

L'analyse de diverses données morphologiques permet d'identifier et de caractériser des groupes de diversité et de préciser leur constitution. Cette description a été utilisée pour caractériser les types sauvages et cultivés du caroubier (Crossa-Raynaud, 1960; Navarro, 1992; Tous et *al.*, 1996). Elle a été, en grande partie, à la base d'identification et de sélection des cultivars qui constituent le principal gemplasma espagnol (Tous et *al.*, 1996; Batlle et Tous, 1997). Par ailleurs, les traits liés à la taille d'inflorescence et au nombre de fleurs par inflorescence, qui sont indépendants des conditions environnementales, ont servi d'outils, dans plusieurs pays, pour caractériser et étiqueter les pieds mâles et femelles du caroubier (Linskens et Scholten, 1980; Retana et *al.*, 1994; Gharnit et *al.*, 2004).

### **6. 3. 1. 1. 1. Polymorphisme agronomique**

Les caractères agronomiques, à immense intérêt, sont généralement quantitatifs, à contrôle oligo ou polygénique et à «manipulation» complexe. Ils sont souvent soumis aux besoins et choix commerciaux et peuvent être regroupés en plusieurs catégories: caractère lié à la production (précocité, rendement), vigueur de plante, qualité de fruit, résistance aux stress biotiques (maladies et parasites) et abiotiques (stress hydrique, thermique, salinité). En effet, en Espagne et précisément en Andalousie, les types de caroubier locaux non greffés sont plus tolérants au froid par rapport aux cultivars greffés (Tous et *al.*, 1995). Le caractère de la production a été utilisé par Gharnit et *al.*, (2001) pour distinguer 4 variétés de caroubier au Maroc: (i) *lanta* type greffé à moyenne et haute régularité de production; (ii) *dkar* productif type greffé ayant une production variable; (iii) *dkar* improductif type florissant, à fleur mâle, femelle et hermaphrodite, mais qui ne produit pas de fruits; et (iv) variété stérile,

extrêmement rare et non florissante. Par ailleurs, plusieurs auteurs estiment que la production de graines est plus importante chez les caroubiers sauvages que chez les types cultivés (Marakis et al., 1988; Di Lorenzo, 1991; Tous et al., 1995; Gharnit et al., 2001).

### **6. 3. 1. 1. 2. Variabilité de la taille du génome ou polyploïdie**

La caryologie qui est l'étude du génome pendant la phase diploïde de l'individu, permet de distinguer les différents taxons par la taille, la forme et le nombre de leurs chromosomes, incluant le nombre et la taille de satellite (Davis et Heywood, 1973; Stace, 1989). Le nombre de chromosomes est normalement constant au sein d'une espèce et la morphologie de chaque paire chromosomique lui est caractéristique. Toutefois, des conditions éco-géographiques peuvent induire des variations au niveau de la taille du génome dans une même espèce (Bureš et al., 2004). En effet, la variabilité intraspécifique liée au phénomène de polyploïdie et corrélée aux conditions écogéographiques, a été rapporté par certains auteurs chez plusieurs plantes, incluant *Poa annua* (Grime, 1983), *Dactylis glomerata* (Reeve et al., 1998), *Sesleria albicans* (Lysák et al., 2000) et *Ceratonia siliqua* (Bureš et al., 2004).

Cette étude permet d'établir un «caryotype» qui constitue une «carte d'identité chromosomique» ou caryogramme, représentation schématique du génome haploïde. Elle peut être basée sur la technique classique d'observation de caryotype des cellules de pointes racinaires; mais aussi sur les techniques plus récentes de banding (C ou D: coloration chromosomique) ou d'hybridation *in situ* (utilisation de sonde spécifique d'ADN) (Birkam et Kimber, 1974; Teoh et al., 1983; Shang et al., 1988). Actuellement, une nouvelle approche rapide permettant la détermination du niveau de ploïdie d'une espèce, a été élaborée. Il s'agit de la cytométrie en flux (CMF), basée sur la mesure de fluorescences, qui permet l'estimation du contenu en ADN (Arumuganathan et Earle, 1991), sa répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire (Jayat et Ratinaud, 1993) ou simplement la recherche du degré de ploïdie (Brown et al., 1991; dans Belkadi, 2003).

Se basant sur l'utilisation de technique de cytométrie en flux (CMF), Blakesly et al., (2002) ont mis en évidence l'existence d'un niveau naturel de polyploïdie (di, tri et tétraploïde) au sein des plantes légumineuses et en particulier chez le genre *Acacia*. Par ailleurs, l'usage de la même technique a permis à Bureš et al., (2004) de détecter dans la réserve 'Evolution Canyon, Israël (ECI)' et chez *Ceratonia siliqua* L., de diversité intraspécifique par l'obtention des individus di, tri et tétraploïdes.

### **6. 3. 1. 2. Polymorphisme biochimique**

Les protéines, enzymes en occurrence, restent très informatives du fait qu'elles constituent des produits de l'information génétique portée par l'ADN d'un individu. L'ADN, bien qu'il code

pour un même produit, peut porter des variations (mutations) significatives d'un individu (ou d'un groupe) à un autre. L'ensemble des enzymes synthétisées dans l'organisme peut être caractéristique pour un individu donné. L'utilisation de ces marqueurs est fréquente dans la recherche de génotype notamment résistants à de conditions de stress. Ainsi, différentes méthodes sont utilisées selon les produits recherchés.

On peut citer en premier lieu, la recherche de composés synthétisés lors d'un stress hydrique (Rejeb et *al.*, 1991; Ledoigh et Courdert, 1992). De composés de métabolisme secondaire (flavone, polyphénol, terpène) ont été trouvés chez *Triticum*, *Aegilops* et *Ceratonia* (Cooper et *al.*, 1994; Min et Hart, 2003; Makris et Kefalas, 2004).

En second lieu, il y a des protéines possédant des propriétés amphotères et qui peuvent être séparées par électrophorèse sur gel. Différentes méthodes d'électrophorèse sont utilisées selon l'espèce: les protéines de réserve, les isozymes ou les empreintes protéiques (Weber et Wirke, 1994).

Les protéines de réserve de graine (gliadines, glutenines) sont facilement séparées par électrophorèse mono-dimensionnelle sur gel de polysaccharide. Souvent polymorphes, elles se sont avérées un moyen rapide d'identification de diverses espèces ou cultivars, en particulier chez les plantes céréalières (Branlard et *al.*, 1989; Metakostvsky et Baboer, 1992). Une autre technique, permettant de séparer les protéines totales par électrophorèse bi-dimensionnelle après dénaturation, a été mise au point par O'Farell (1975). La première migration s'effectue sur un gradient de pH (électrofocalisation) induisant la séparation des protéines selon leur point isoélectrique et la seconde favorise la séparation des protéines selon leur poids moléculaire en présence d'agents dénaturants (SDS et  $\beta$ -mercaptoéthanol) (Gorg et *al.*, 1980; Pernès, 1984). Cette dernière méthode est lourde et coûteuse d'où rarement utilisée pour les études de diversité; mais plutôt complément des techniques moléculaires pour cartographier des gènes de structure exprimés et traduits dans un organe donné (De Vienne et *al.*, 1995; dans Belkadi, 2003).

Les isozymes sont l'ensemble de multiformes, d'une même enzyme résultant génétiquement de différences dans la structure primaire, issues de même organisme. Les échantillons sont déposés sur un gel d'amidon (support poreux) et grâce à un tampon chimique, la migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique, et les enzymes, étant chargées négativement, vont migrer vers le pôle positif. Ainsi, les différentes molécules sont séparées selon leur charge et secondairement selon leur poids moléculaire. Ces isozymes ont les mêmes propriétés catalytiques induisant, après l'addition d'un substrat spécifique naturel ou artificiel, l'apparition d'un produit terminal coloré (visible) et insoluble (Westman et Kresovich, 1997).



Ces marqueurs, bien qu'ils soient co-dominant, sont accusés d'une sous estimation du polymorphisme réel, seule la partie codant est détectable (Gottlieb, 1977).

Les marqueurs enzymatiques ont été utilisés afin de caractériser et comparer le caroubier de types sauvages et cultivars issus de différentes (Tous et *al.*, 1992; Batlle et *al.*, 1996) ou de mêmes origines (Barracosa et *al.*, 1996).

Vu le faible niveau du polymorphisme révélé par les marqueurs biochimiques et sa variabilité en fonction des conditions environnementales, il est souvent nécessaire d'utiliser les marqueurs moléculaires pour compléter l'évaluation et l'étiquetage des ressources génétiques.

### **6. 3. 1. 3. Polymorphisme moléculaire**

L'amélioration des plantes est basée sur une large utilisation de la variabilité génétique naturelle et sur des méthodes d'exploitation rapides et fiables de cette diversité dans les programmes de sélection. Les marqueurs moléculaires permettent à la fois un diagnostic extrêmement fin de la variabilité et la mise en place de stratégies très rapides de création et sélection variétale (Adam et Dron, 1993). Ces marqueurs constitués des acides nucléiques sont utilisés il y a une vingtaine d'année dans le domaine de la connaissance des génomes végétaux et leur application à l'amélioration des plantes (De Vienne, 1990). Ils présentent également différents avantages comparés aux marqueurs morphologiques et protéiques; très nombreux, neutres vis à vis de la sélection, couvrent le génome entier, indépendants de la partie de la plante prélevée et de son stade de développement et indépendants des influences environnementales (FAO, 1996; dans Belkadi, 2003). Il existe plusieurs types de marqueurs moléculaires, mais ce chapitre sera consacré aux RFLP, RAPD, Microsatellites ou SSR, ISSR et AFLP.

#### **6. 3. 1. 3. 1. RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism***

La technique RFLP ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction permet une analyse directe du génotype. Elle réside principalement sur la détection de la variabilité de la taille de séquences nucléotidiques du génome, générées par la digestion enzymatique et révélées par hybridation avec une sonde marquée (ADNc, séquence anonyme, séquence clonée...) (Southern, 1975; Beckmann et Soller, 1986). Le polymorphisme révélé par cette technique peut être illimité et concerne toutes les parties du génome notamment en fonction de diverses enzymes de restriction et des sondes utilisées (Gentzbittel, 1990; Adam et Dron, 1993). Ces sondes peuvent être de différentes natures: ADNc, ADN génomique total et ADN cytoplasmique ou mitochondrial (Pradhan et *al.*, 1992; Karp et Edward, 1997).

De nombreuses études génétiques ont été menées grâce à ce type de marqueur surtout chez plusieurs espèces de plantes (Lefort Buson et *al.*, 1990), comme *Brassica* spp., par

Song et *al.*, (1990) et par Förster et Knaak (1995), la tomate par Miller et Tranksley (1990), le blé (*Triticum*, *Aegilops*) par Gill et *al.*, (1992), Dubcovsky et *al.*, (1996) et par Mingeot et Jacquimin (1999), le tremble (*Populus* spp.) par Liu et Furnier (1993), le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par Cornique et Mercier (1994), et l'olivier (*Olea europaea*) par Khadari et *al.*, (2003).

Cette méthodologie, malgré le progrès présenté dans l'identification et amélioration des variétés, semble devoir être remplacée dans certain nombre de cas par les méthodes d'amplification d'ADN (PCR) et leur adaptation à l'amélioration des plantes plus rapides, plus aisées et faciles à mettre en œuvre (Williams et *al.*, 1990; Adam et Dron, 1993).

### **6. 3. 1. 3. 2. RAPD: *Random Amplified Polymorphic ADN***

Le polymorphisme d'AND amplifié au hasard ou RAPD est produit par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction; Réaction de Polymérisation en Chaîne), utilisant d'ADN génomique, d'une amorce aléatoire courte d'environ 10 nucléotides et d'enzyme *Taq* polymérase (Welsh et McClelland, 1990; Williams et *al.*, 1990). Les fragments générés en nombre quasiment illimité, sont répartis dans tout le génome, non spécifiques de locus et dominants qui ne peuvent donc mettre en évidence l'état hétérozygote. Le polymorphisme observé se traduit par la présence ou l'absence de bande chez les différents génotypes. En effet, l'amplification avec les marqueurs RAPD obéit à la loi de «tout ou rien» mettant en jeu des amorces très spécifiques (Adam et Dron, 1993). Les variations de séquences nucléotidiques entre les génomes, révélées par ces marqueurs, sont le résultat d'une modification (mutation ou insertion) au niveau de site de fixation de l'amorce (Park et *al.*, 1991).

Les marqueurs RAPD ont été utilisés dans l'élaboration des cartes génétiques de plusieurs plantes (MacRobert et *al.*, 1999), notamment *Arabidopsis* (Reiter et *al.*, 1992), Luzerne (Echt et *al.*, 1991) et *Petuni* (Peltier et *al.*, 1994) et dans l'étude de la structuration de la diversité au sein d'un grand nombre d'espèces (Tableau I. 4), particulièrement au niveau inter et intra-spécifique (Thormann et *al.*, 1994; Castragna et *al.*, 1997; Khadari et *al.*, 2003; Chen et Yamaguchi, 2005) et au niveau de cultivars d'olivier (Sanz-Cortés et *al.*, 2001).

**Tableau I. 4:** Technique RAPD utilisée dans l'étude du polymorphisme génétique de différentes espèces de plante

Espèce	Références
<i>Aegilops</i> spp.	Okuno et al., 1998; Monte et al., 1999; Zaharieva et al., 1999
Apricot ( <i>Prunus armenaica</i> L.)	Gogorcena and Parfitt, 1994.
Arabidopsis thaliana	Reiter et al., 1992
Arachis hypogaea	Dwived et al., 2001
Blé ( <i>Triticum</i> spp.)	Devos et Gale, 1992
Bombyx mori	Pradeep et al., 2005
<i>Brassica</i> spp.	Divaret et Thomas, 1998; Geraci et al., 2001; Jain et al., 1994
Caféier ( <i>Coffea</i> spp.)	Lashermes et al., 1993
Cacaoyer ( <i>Theobroma cacao</i> L.)	Wild et al., 1992
Celerie ( <i>Apium graveolens</i> L.)	Yang et Quiros, 1993
Fève ( <i>Vicia faba</i> L.)	Link et al., 1995
Figuier ( <i>Ficus carica</i> L.)	Khadari et al., 1994
Laitue ( <i>Lactuca sativa</i> L.)	Waycott et Fort, 1994
Lentille ( <i>Lens culinaris</i> spp.)	Ahmad et al., 1996
Luzerne	Echt et al., 1991
Maïs ( <i>Zea mais</i> L.)	Welsh et McClelland, 1990
Manguier ( <i>Magifera indica</i> L.)	Schnell et al., 1995
Mil ( <i>Panicum</i> spp.)	M'Ribu et Hilu, 1994
Oignon ( <i>Allium</i> spp.)	Wilki et al., 1993; Friesen et al., 1999
Olivier ( <i>Olea europaea</i> )	Belaj et al., 2001; Khadari et al., 2003; Sanz-Cortés et al., 2001
Orobanche ( <i>Orobanche</i> spp.)	Samec et Nasinec, 1995
Palmier dattier ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.)	Corniquel et Mercier, 1994; Sedra et al., 1998)
Pistacia vera	Hormaza et al., 1994
Populus spp.	Liu et Furnier, 1993
Riz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Virk et al., 1995
Thé ( <i>Camellia</i> spp.)	Chen et Yamaguchi, 2005
Tomate ( <i>Lycopersicon</i> spp.)	Klein-Lankhorst et al., 1991
Soja ( <i>Glycine</i> spp.)	Li et Nelson, 2001; Xu et Gai, 2003
Vigne ( <i>Vigna angularis</i> )	Yee et al., 1999

Source: (Belkadi, 2003) avec actualisation.

Par ailleurs, cette technique a été utilisée pour produire des marqueurs spécifiques aux espèces de figuier et de *Triticeae* (Khadari et al., 1994; Wei et Wang, 1995; Cao et al., 1999), pour gérer des germplasmes (Kresovich et al., 1992; Belaj et al., 2001; Geraci et al., 2001; Sanz-Cortés et al., 2001; Khadari et al., 2003; Chen et Yamaguchi, 2005) et pour établir la phylogénie de 40 cultivars d'olivier (Sanz-Cortés et al., 2001). Selon Cao et al., (1999), ces marqueurs constituent un moyen efficace d'identification d'espèces et de reclassement des accessions mal classées, ce qui diminue le coût de stockage et de régénération des collections.

Des marqueurs RAPD liés aux gènes de résistance à certains agents pathogènes ont été identifiés chez plusieurs plantes. En effet, chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.), 18 marqueurs liés à 11 locus impliqués dans la résistance à la cécidomyidé ou "Hessian fly" ont été caractérisés par Dweiket et al., (1997). Chez les cultivars du blé, des marqueurs RAPD liés aux gènes de résistance à la rouille brune (Lr24) et jaune (Yr17) ont été également identifiés et transformés en marqueurs SCAR "Sequence Characterized Amplified Region" (Dedryver et al., 1996; Rober et al., 1999). En plus, elle a pu produire chez certaines espèces dioïques, telle que les cultivars de *Pistacia vera*, des marqueurs liés au sexe (Hormaza et al., 1994).

### **6. 3. 1. 3. 3. Microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeats)**

Les microsatellites, alternativement connus sous le nom de «séquences simples répétées (SSR) sont des éléments d'ADN répétés dont la taille est généralement moins de 5pb (mono, di, tri et tétra-nucléotidiques), révélés par amplification par PCR de l'ADN génomique (Tautz et Rentz, 1984; Tautz, 1989; Bruford et Wayne, 1993).

Le polymorphisme des SSRs résulte de la différence du nombre d'unité répétée, estimée de 5 à 50 copies chez les plantes (Cardle et al., 2000) et qui émane des erreurs survenues lors de la réplication d'ADN (Jarne et Lagoda, 1996). Ces différences sont révélées sur gel polysaccharide où les motifs en tandem migrent en fonction de leur poids. Par ailleurs, ces marqueurs sont adaptés aux études de populations étroitement apparentées et permettent même les comparaisons entre individus ou cultivars (Takezaki et Nei, 1996; Hokanson et al., 1998; Westman et Kresovich, 1997). Grâce à leur grand contenu informatif, 10 à 20 loci suffisent pour distinguer des génotypes très proches. Ils ont été utilisés aussi bien dans l'étude de la diversité génétique que dans l'élaboration des cartes génétiques du blé, de l'orge et du soja (Röder et al., 1995; Peakall et al., 1998; Ramsay et al., 2000). En plus, ce sont de marqueurs multi-alléliques d'où leur usage dans les études phylogénétiques et de l'évolution des espèces. Ainsi, Mhameed et al., (1997) utilisant ces marqueurs ont pu établir un arbre phylogénétique composé de *Persea americana* et ses espèces sauvages.

#### **6. 3. 1. 4. 4. ISSR: *Inter-Simple Sequence Repeat***

Les marqueurs ISSR, liés aux séquences ou nucléotides de l'espace présent entre les séquences simples répétées (SSRs) dans le génome, sont basés sur le polymorphisme de taille de 200 à 2500pb le long de ces espaces inter-microsatellites amplifiables par une seule amorce PCR (Zietkiewicz et *al.*, 1994). En générale, les locus microsatellites sont régulièrement distribués en grand nombre à travers le génome d'eucaryote, fournissant ainsi un pool riche en potentiels marqueurs ISSR convenables pour révéler la diversité génétique étroitement associée aux accessions (Wiesner et Wiesnerová, 2003).

En effet, cette amplification ISSR est définie par variation des PCR qui utilisent des amorces à simple séquence répétée comme [AC]*n*, pour amplifier les régions situées entre les séquences microsatellites (Kahl, 2001). Selon Zietkiewicz et *al.*, (1994), La production des marqueurs ISSR est, par rapport aux marqueurs AFLP, SSR et RFLP, moins coûteuse, rapide et facile à optimiser. Par ailleurs, ils sont considérés plus reproductibles que ceux de RAPD et détectent un grand polymorphisme génomique que les marqueurs RFLP (Zietkiewicz et *al.*, 1994; Oh et *al.*, 2000).

La technique ISSR a été largement et diversement appliquée dans l'étude de la variabilité génétique des plantes (Godwin et *al.*, 1997) et la caractérisation de certains organismes fongiques (Grunig et *al.*, 2001). Ainsi, elle a été utilisée pour déterminer le polymorphisme génétique des espèces de *Sorghom*, *Ipomoea*, *Eucalyptus*, *Oryza*, *Lupinu*, *Asparagus*, etc (Yang et *al.*, 1996; Prevost et Wilkenson, 1999; Qian et *al.*, 2001; Sica et *al.*, 2005).

#### **6. 3. 1. 3. 5. AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism***

La technique AFLP ou polymorphisme de taille des fragments d'ADN amplifiés, dotée du pouvoir discriminant et révélateur de la diversité génétique, a été développée par Vos et *al.*, (1995). Elle est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires. Cette technique sophistiquée est principalement basée sur la digestion totale d'ADN par deux enzymes, une enzyme (*Msp I*) qui coupe fréquemment l'ADN à 4 bases et une autre (*EcoRI*, *Pst I*,...) qui coupe à 6 bases; puis la ligation des bouts cohésifs avec un adaptateur de séquences connues et spécifique à chaque enzyme, tel que *EcoRI*, qui ajoute 16 bases de part et d'autre des fragments digérés engendrant ainsi le polymorphisme de site de restriction (Vos et *al.*, 1995). Cette étape est secondée par une première PCR dite «pré-amplification», utilisant un seul nucléotide comme amorce correspondante à la séquence de l'adaptateur qui prolonge ce dernier en 3' par 3 bases arbitraires; puis une autre PCR dite «sélective» permettant seulement l'amplification des fragments ayant des bases complémentaires des ces 6 (2x3) bases arbitraires (Vos et *al.*, 1995; Karp et *al.*, 1997; Matthes et *al.*, 1998). Après l'électrophorèse sur gel

d'acrylamide, plusieurs dizaines voire centaines de fragments peuvent être révélés, dont le polymorphisme provient de site de restriction et de bases arbitraires.

La méthode AFLP, donnant de marqueurs dominants, est hautement reproductible et applicable à toutes les espèces (Vos et al., 1995; Karp et Edwards, 1997). Elle a été largement utilisée dans l'étude et l'établissement de carte génétique de diverses espèces de plantes, comme *Petunia* (Geratas et al., 1995), *Cucumis* (Wang et al., 1997), *Glycine* spp. (Keim et al., 1997), *Arabidopsis* (Alonso-Blanco et al., 1998), *Oryza* (Zhu et al., 1984), *Solanum* (Bradshaw et al., 1998), *Zea* (Xu et al., 1999) et *Triticum* (Junhua et al., 2000).

Par ailleurs, certains auteurs qui ont eu recours à son usage dans l'analyse phylogénétique, ont conclu que l'AFLP constitue «une technique efficace et fiable pour les études de l'évolution» (Aggraw et al., 1999; Kardolus et al., 1998). Ainsi, elle a été appliquée pour l'analyse phylogénétique de *Triticum* spp. (*Poaceae*) (Heun et al., 1997), *Solanum* (Kardolus et al., 1998), *Datureae* (Mace et al., 1999), et *Oryza* spp. (Aggawal et al., 1999).

D'autres marqueurs AFLPs spécifiques ont été développés. Ils sont soit liés aux stress biotiques et abiotiques (Meksem et al., 2001), soit associés spécifiquement aux locus déterminant le sexe chez certaines plantes, telle que *Asparagus officinalis* (Reamon-Büttner et Jung, 2000), *Dioscorea tokoro* (Terauchi et Kahl, 1998) et *Cannabis sativa* L. (Flachowsky et al., 2001).

L'avantage majeur de l'AFLP réside dans le grand nombre de marqueurs polymorphes qu'elle génère. Sa capacité de différenciation individuelle dans une population donnée, l'a rendue utile pour l'analyse de paternité (Krauss, 1999), l'expérimentation des intro-gènes et l'enregistrement ou l'étiquetage de Plantes Variétales (Law et al., 1998). Toutefois, elle est confrontée à de problèmes similaires à ceux de la technique SSR: problème pratique (très coûteuse, lourde,...), problème de données (dominance d'où l'hétérozygote non identifié,...), et problème d'analyse de données.

## 7. CONSERVATION DU CAROUBIER

Le but principal de cette conservation est de préserver la diversité d'une large gamme de génotypes de caroubier. Actuellement, il existe dans le monde, huit domaines de collection de caroubier (Tableau I. 7). La plus grande banque de germplasm se trouve en Espagne. Elle est constituée d'environ 280 accessions locales d'une trentaine de provenances étrangères. Ces accessions sont préservées dans 4 régions différentes par leur types de climats méditerranéen (Batlle et Tous, 1997). Par ailleurs, le Portugal dispose de quelques collections composées de 13 cultivars locaux et 2 étrangers. En dehors de ces deux pays,

nous ne disposons d'aucune information sur la conservation du caroubier surtout dans les pays producteurs comme le Maroc, l'Italie, le Chypre et autres.

**Tableau I. 7:** Collections et germoplastes mondiales de caroubier

Pays	Place, district*	Aire (ha)	Année de plantation	Accession		Evaluation
				Native	étrangère	
<b>Espagne</b>	Reus, Tarragona	1	1987	52	16	Caractérisation phénotypique, commerciale, agronomique et production
	Tortosa, Tarragona	0.8	1989	59	12	Production;
	Palma, Majorca	0.5	1990	39	1	caractérisation phénotypique; qualité de fruits et production
	Villajo yosa, Aliante	1.5	1986	133	2	Caractérisation agronomique
<b>Portugal</b>	Tavira, Algare	0.5	1988	11	2	Caractérisation phénotypique et production
<b>Tunisie</b>	ariana		1950	10	-	aucune
<b>USA</b>	San Diego, Californie		1960	2	3	aucune
<b>Australie</b>	Loxton, S. Australie	0.3	1985	-	10	Production

\* Pour les adresses complètes, voir annexe II (Batlle et Tous, 1997)

Actuellement, la menace d'érosion génétique qui pesait sur le caroubier semble être modérée. Pourtant, dans certains endroits comme Murcia, Sud-est d'Espagne, il y a eu perte de 37% d'arbres de caroubier au détriment des cultures maraîchères et rentables (Rodriguez et Fruto, 1988). En Croatie, Vinterhalter et *al.*, (1992) ont pratiqué la culture *in vitro* des tissus, pour pouvoir propager les génotypes de caroubier qui étaient presque éteints. La micropropagation *in vitro* a été également développée comme moyen alternatif pour préserver le caroubier en Australie (Sebastian et McComb, 1986), en Espagne (Alorda et Medrano, 1996), en Tunisie (Belaizi et *al.*, 1994) et au Maroc (Gharnit, 1997 ; Konaté, 2001).

Toutefois, cette méthode n'a pas permis d'atteindre les résultats escomptés et la technique de propagation par bouturage végétatif reste meilleure et plus utilisée malgré son taux de réussite qui est encore trop faible.



## *Chapitre II: Etude du polymorphisme phénotypique du caroubier*

### **1. INTRODUCTION**

Le caroubier se rencontre au Maroc sous forme de peuplements sauvages ou cultivés aussi bien dans les zones côtières, méditerranéennes et atlantiques, que dans les zones continentales (Guinochet et Devilmorin, 1984). Cependant, les principales populations spontanées seraient concentrées dans les régions nord du Maroc (Ouchkif, 1988a).

En dehors de quelques études basées sur des données morphologiques (fruits et fleurs), sociales et économiques menées sur le caroubier dans le cercle de Bab Taza (Gharnit et *al.*, 2001/2004), aucune information officielle concernant les collections ou germoplasmes marocains n'est disponible. Les caractéristiques phénotypiques ont été et continuent d'être utilisées comme étant des éléments indispensables dans la classification définitive des organismes vivants. Jusqu'à nos jours, elles ont constitué le principal outil descriptif utilisé pour caractériser une collection ou germoplasme donné et pour identifier et différencier les types sauvages des cultivars (Crossa-Raynaud, 1960; Navarro, 1992; Tous et *al.*, 1996).

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés, à la fois, aux traits agro-morphologiques liés aux fruits (gousse et graines) ainsi qu'à la variabilité dans la dureté tégumentaire des graines, pour établir une fiche descriptive ou technique et déterminer des relations génétiques préliminaires entre les différentes accessions provenant de certaines régions du Maroc.

### **2. MATERIEL ET METHODES**

#### **2. 1. Matériel végétal**

Le matériel végétal constitué de gousses de caroubier a été collecté de différentes régions du Maroc. Le lot des gousses de chacune des dix régions de provenance est défini en accession. Ainsi, on a recensé les accessions de Taourirt, Al Houceima, Taounate, Aïn Safa, Akchort, Demnate, Ouazzane, Sidi Bou Othmane, Essaouira et de Tétouan (Fig. II. 1). Au total, les fruits de neuf accessions ont fait l'objet d'étude agro-morphologique; tandis que ceux de toutes les dix accessions ont servi d'outil pour évaluer la variabilité dans la dureté de l'enveloppe tégumentaire des graines. L'ensemble de ces régions marocaines donatrices appartient à deux étages bioclimatiques, semi-aride et subhumide dont la pluviométrie est de 350 à 600mm pour le premier et plus de 600mm pour le second.

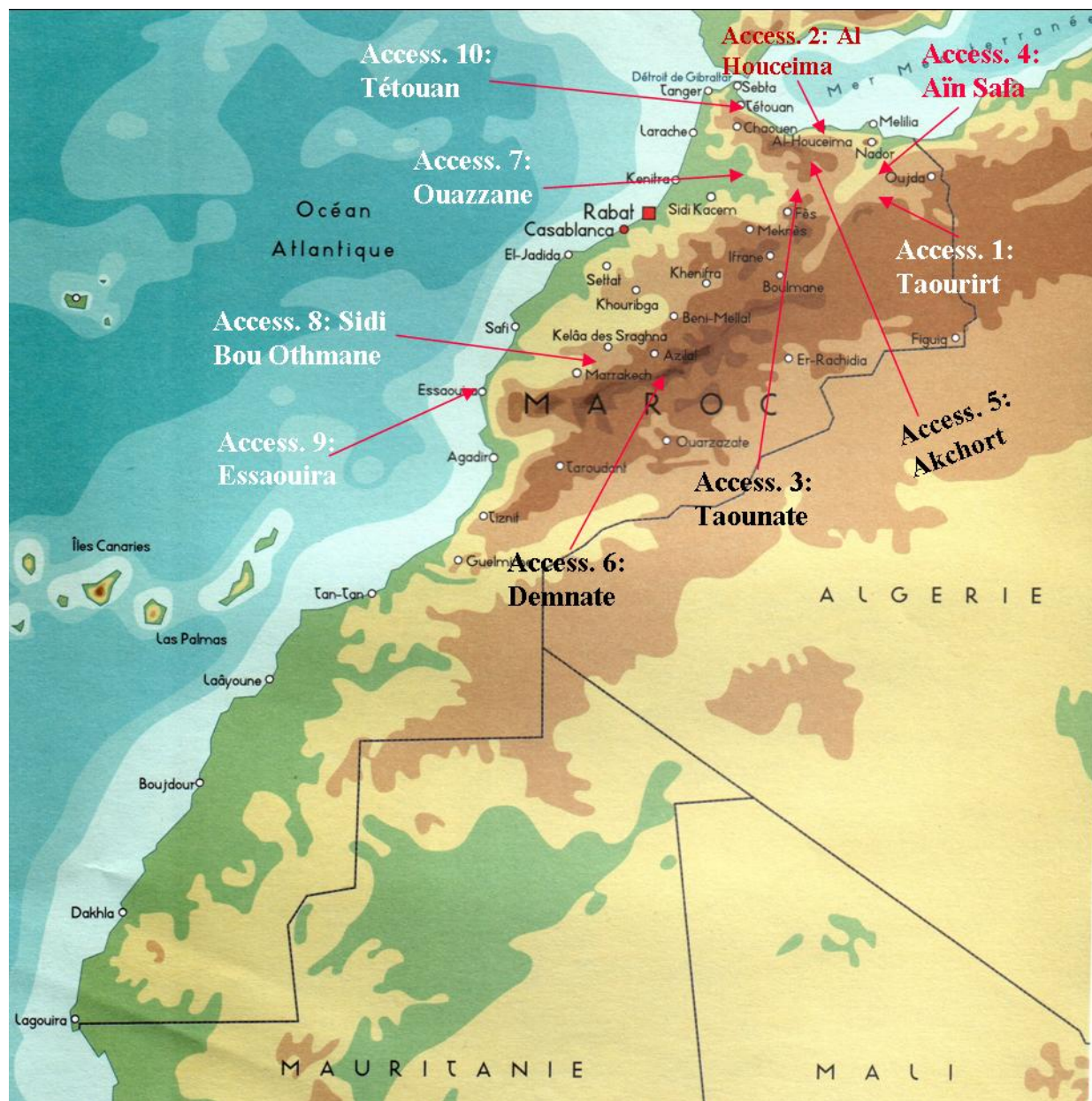


Figure II. 1: Différentes localités marocaines où les accessions ont été collectées

## 2. 2. Marqueurs morpho-agronomiques

Cent gousses ont été prises de manière aléatoire de chacune des neuf accessions (l'accession de Tétouan non incluse par défaut gousses). Dix caractères discriminatifs relatifs aux gousses ont été mesurés à savoir la longueur, la corde, la largeur, l'épaisseur, le poids total frais de la gousse, le nombre total des graines, le nombre des graines avortées, le poids frais des graines, le poids total de pulpe, la garniture de gousse en graines.

Ces prises de mesure ont été exécutées parallèlement à des observations faites à l'œil nu portant sur l'aspect des gousses et des graines.

## **2. 3. Variabilité dans la dureté tégumentaire des graines**

Face à la diversité morphologique notamment dans la couleur et la taille des graines de même ou de différentes accessions et vu que ces graines sont dotées d'un épais et dur tégument, nous avons décidé, à l'aide d'un agent chimique (acide sulfurique) qui digère la paroi tégumentaire des graines, d'examiner la variabilité de la dureté du manteau qui pourrait exister entre les graines de différentes accessions, puis procéder parallèlement à la comparaison du pouvoir scarifiant de l'acide sulfurique et de l'eau bouillante.

### **2. 3. 1. Scarification à l'aide de l'acide sulfurique**

Après l'écrasement des gousses qui ont fait l'objet d'étude morphologique, 400 graines ont été prises au hasard de chaque accession. Chaque lot de graines a été reparti dans quatre fioles stériles de 250ml, à raison de 100 graines par fiole. Après l'ajout d'un volume de 50ml d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) concentré (95%), les fioles ont été soumises à une agitation vigoureuse pendant une durée variable, 25min, 30min, 45min et 60min. L'effet digestif de l'acide sulfurique sur le tégument de graine est stoppé par addition de l'eau distillée stérile, suivie d'une série de rinçage.

Après une nuit d'imbibition à 4°C, les graines sont ensuite mises à germer dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau semi-gélosée (7g d'agar/l), incubées à 28°C et à l'obscurité. La graine est considérée germée quand la radicule perce l'enveloppe tégumentaire. Ainsi, l'observation et la lecture des résultats ont eu lieu après 3 et 7 jours d'incubation.

### **2. 3. 2. Scarification par l'eau bouillante**

Un lot de 100 graines de chaque accession a été cédé au service du Centre de la Recherche Forestière, de M'Khinsa de Rabat pour faire un test de germination dans les conditions naturelles. Après traitement des graines avec l'eau bouillante, elles ont été semées dans des sachets en plastique noir contenant un sol humide. Le recensement du nombre des graines germées par accession a été réalisé un mois après le semis.

### **2. 3. 3. Analyse des données**

Les valeurs numériques obtenues à partir de différents paramètres mesurés, ont été, d'abord, analysées par le logiciel ANOVA, permettant de calculer les moyennes et les écarts types, ce qui a facilité la comparaison des accessions entre elles selon chaque caractère.

Par la suite, ces valeurs numériques brutes ont été converties en classes. Chaque critère de gousse est ainsi noté (1) pour son appartenance à la classe ou (0) pour le cas contraire. Les matrices engendrées pour les différents marqueurs agro-morphologiques sont analysées à

l'aide du logiciel STATISTICA en utilisant la méthode UPGMA (méthode de la classification ascendante hiérarchique non pondérée).

Concernant l'effet de la scarification sur le taux de germination des graines de différentes accessions, les résultats obtenus ont été représentés sous forme d'histogrammes par le biais du logiciel Excelle.

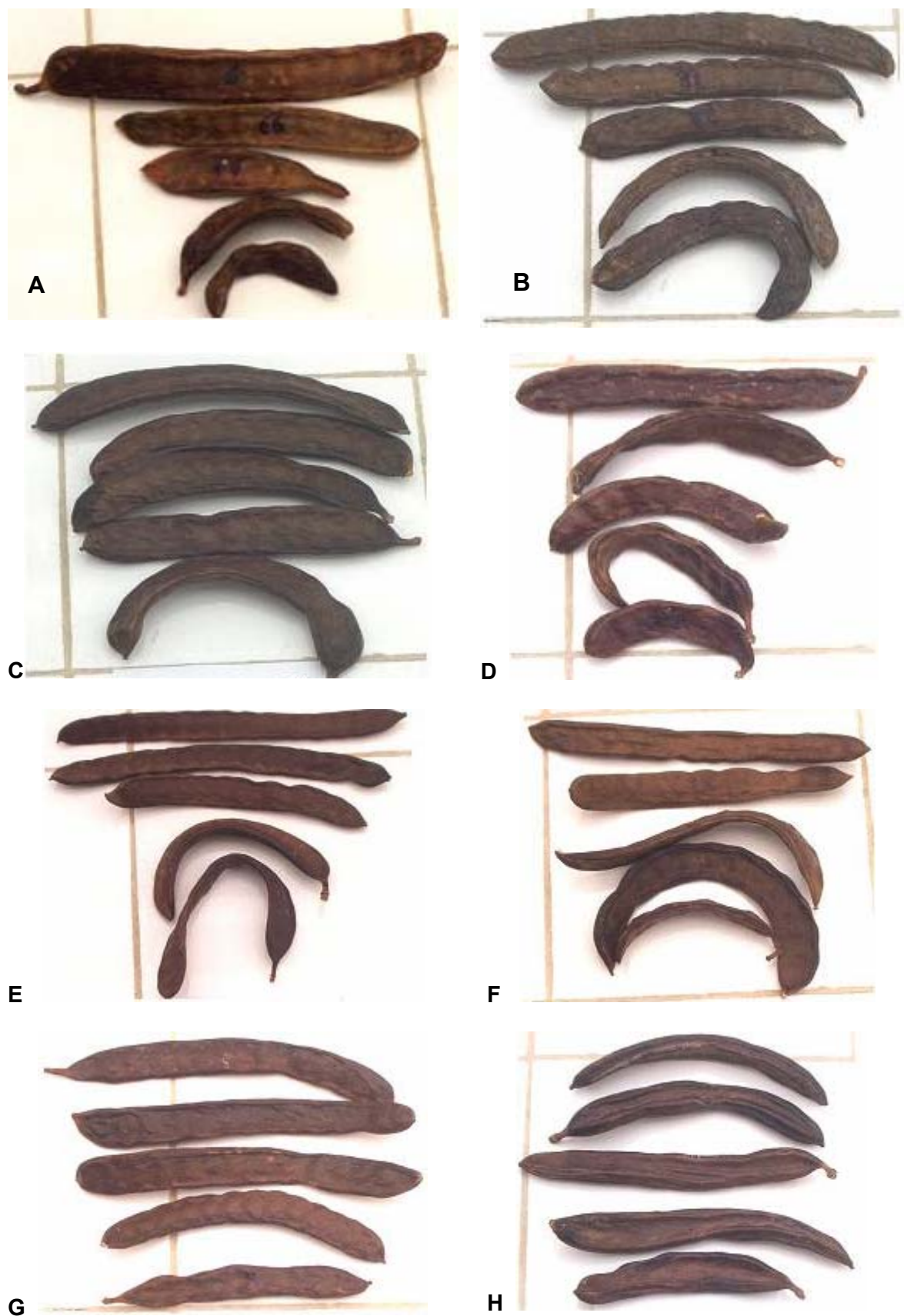
## **4. RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **4. 1. Diversité agro-morphologique inter-accessions**

#### **4. 1. 1. Observation de l'aspect des gousses**

L'observation à l'œil nu des gousses des différentes provenances a permis de déceler un niveau très élevé du polymorphisme morphologique. En effet, un échantillon de cinq gousses représentant chacune des huit accessions, illustre parfaitement l'existence de diverses couleurs et formes des gousses (Fig. II. 2). Nous avons relevé sept différentes couleurs de gousses : marron (gousses de Akchort et Demnate), marron claire (gousses de Taourirt), marron foncé (gousses de Essaouira), brune (gousses de Aïn Safa), brune foncée (gousses de Ouazzane), acajou (gousses de Al Houceima) et chocolatée (gousses de Sidi Bou Othmane).

Par ailleurs, des traits agro-morphologiques liés à la forme des gousses (forme droite, légèrement courbée, courbée et torsadée) ont été observés (Fig. II. 2). Traditionnellement, la production et la qualité des fruits incluant sa forme, ont été largement exploitées comme des critères fondamentaux pour sélectionner le caroubier. Pour les experts, ces traits agro-morphologiques permettent de différencier le caroubier de type sauvage du type cultivar (Marakis et al., 1988; Tous et al., 1995; Tous et al., 1996; Batlle et Tous, 1997; Gharnit et al., 2001). Bien que la forme, la couleur et la grandeur des gousses soient, en générale, influencées par des facteurs environnementaux, les fruits produits par les types cultivées «cultivars» se sont, comparativement aux types sauvages, distingués par leur taille et leurs graines volumineuses (Tous et al., 1996; Batlle et Tous, 1997).



**Figure II. 2:** Variabilité dans la morphologie (forme et couleur) des gousses collectées de: Taourirt (A), Aïn Safa (B), Ouazzane (C), Al Houceima (D), Sidi Bou Othmane (E), Demnate (F), Akchort (G) et Essaouira (H).

Selon certains auteurs, la forme des gousses du caroubier peut être considérée comme le critère agronomique caractéristique des cultivars. Ainsi, en Espagne, trois différentes formes de gousses ont été rencontrées dans la production de certains cultivars, (i) forme droite chez les cultivars 'Negra', 'Matalafera' et 'Duraió', (ii) forme courbée chez les cultivars 'Rojal', 'Saylonga' et 'Ramilleté' et (iii) forme torsadée chez le cultivar 'Banya Cabra' (Tous et *al.*, 1996). En Italie, les gousses caractérisées par les formes droites et courbées ont été respectivement observées chez les cultivars 'Amele di Bari' et 'Gibiliana'. Au Portugal, les gousses des cultivars 'Galhosa' et 'Mulata' ont été respectivement caractérisées par des formes droites et courbées. En Chypre, deux formes de gousses, droite et courbée ont été respectivement rencontrées chez les cultivars 'Koundourka' et 'Tyllira'. Toutefois, la forme courbée a été le seul critère caractérisant les gousses des cultivars 'Hemere' en Grèce, 'Sfax' en Tunisie et 'Santa Fe' en Californie.

Au Maroc, nous avons constaté l'existence de toutes ces trois formes de gousses (droite, courbée et torsadée), mais en fréquence inégale dans les échantillons de nos accessions. Pour mieux cerner ce paramètre et avoir plus d'idée sur la forme de gousses pour chaque lot, nous avons établi un rapport d'évaluation, basé sur les valeurs mesurées de certains critères de gousses, pour calculer l'indice de courbure (IC) ou encore de droiture (ID) selon la formule suivante:  $IC = \text{valeur moyenne de corde (cm)} / \text{valeur moyenne de longueur (cm)}$ . Cet indice qui ne peut mettre en évidence que la forme droite et/ou courbée, nous a permis, en fonction des accessions, de déterminer trois catégories de forme de gousses.

- première catégorie dite forme droite de gousses et définie par  $0.85 \leq IC$ , indique une large dominance de cette forme dans une production donnée. Elle caractérise les accessions de Taourirt, Akchort, Sidi Bou Ohmane et Essaouira dont les IC sont respectivement 0.85, 0.90, 0.90 et 0.92.

- seconde catégorie dite forme légèrement courbée ou intermédiaire et définie par  $0.70 \leq IC < 0.85$ , indique une présence non négligeable de forme courbée dans une collection donnée. Elle caractérise dans notre cas, les accessions de Demnate, Ouazzane, Al Houceima et Aïn Safa, ayant respectivement comme IC: 0.75, 0.75, 0.76 et 0.81.

- troisième catégorie dite forme courbée et déterminée par  $IC < 0.70$ , indique une forte présence de cette forme dans une production donnée. Elle caractérise l'accession de Taounate dont l'IC est de 0.58.

La forme de gousses du caroubier ne comporte pas seulement un intérêt d'ordre morphologique, mais peut aussi avoir un impact positif sur les collections et ses apports commerciaux. Selon Brito de Carvalho (1988a), les gousses ayant une forme droite sont, par rapport à celles qui ont une forme courbée ou torsadée, les plus appréciées et facilement

commercialisées. Par conséquent, nos résultats laissent supposer que la production marocaine serait dotée de fruits de très bon aspect, notamment en ce qui concerne la dominance de la forme droite. Toute fois, ce trait lié à la forme de gousses est très loin d'être le seul critère discriminant et déterminant de la qualité agro-morphologique des fruits.

#### **4. 1. 2. Mesure des variables agro-morphologiques**

Les valeurs moyennes ainsi que les déviations standard (DS) de la totalité des variables mesurés sont assignées dans le tableau (II. 1). D'emblée, nous remarquons que chaque critère de gousse analysé peut être considéré comme un moyen distinctif d'une accession à l'autre. En conséquence, chacun de ces dix caractères pourrait, sur le plan agro-morphologique, discriminer nos accessions de caroubier.

Le choix du fruit pour cette étude n'est pas fortuit ou hasardeux. Il émane de la préférence de plusieurs auteurs qui ont eu recours à l'utilisation de différents types d'organes ou appareils, principalement les gousses, pour identifier, étiqueter ou caractériser les différentes collections ou germoplasmes du caroubier dans le monde. Ainsi, ses fruits ont fait l'objet d'un grand nombre d'études agro-morphologiques et économiques (Crossa-Raynaude, 1960; Marakis et *al.*, 1988; Navarro, 1992; Tous et *al.*, 1996; Batlle et Tous, 1997; Gharnit et *al.*, 2001), au même titre d'intérêt que ses inflorescences et fleurs (Linskens et Schlten, 1980; Retana et *al.*, 1994; Gharnit et *al.*, 2004) pour différencier les collections locales ou les comparer avec celles des autres pays. Chaque caractère de gousse est discriminant et pourrait, en plus de son utilité dans l'étude de la diversité, comporter un intérêt majeur dans le choix empirique pour la sélection du cultivar ou de donneurs de greffon destinés à l'établissement des vergers commerciaux. A travers le tableau (II. 1) et en fonction de chaque variable mesuré, nous pouvons caractériser une telle ou groupe d'accessions.

##### ***Taille des gousses :***

La taille des gousses, définie par la valeur moyenne de sa longueur a donné lieu à la classification de nos accessions en trois catégories: taille légèrement longue ( $15 < L \leq 20$  cm), taille moyenne avec ( $14 \leq L \leq 15$ ) et taille légèrement courte avec ( $10 \leq L < 14$ ). Cette catégorisation de taille a été faite en référence aux travaux de Tutin et *al.*, (1993), de Tous et *al.*, (1996) et de Batlle et Tous (1997) qui ont rapporté que la taille moyenne des gousses peut aller de 10 à 30 cm.

Dans le cas de nos collections, la taille légèrement longue (+ de 16 cm) caractérise les accessions de Aïn Safa, de Ouazzane, de Sidi Bou Othmane et de Akhort ; la taille moyenne (14 - 14,5 cm) caractérise les accessions de Taounate et de Al Houceima. Tandis les accessions de Taourirt de Demnate et d'Essaouira sont caractérisées par des gousses de taille courte (12,5 à 13,5 cm). Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de Gharnit

(1997) qui a eu 14.22cm comme valeur moyenne caractérisant la taille des fruits du caroubier originaire de la région de Tétouan, et témoignent bien de l'existence d'un niveau considérable de variabilité dans la taille des fruits du caroubier au Maroc.

### ***Largeur de gousses***

La largeur des gousses du caroubier a une indication d'ordre agronomique importante. Elle est indépendante de la taille de gousse et peut renseigner non seulement sur son état compressé ou élargi, mais aussi sur le volume des graines et de pulpe. Elle varie de 1.5 à 2.5cm selon Tutin et *al.*, (1993) et de 1.5 à 3.5cm selon Batlle et Tous (1997).

Les accessions de Ouazzane, de Taourirt, de Aïn Safa et d'Essaouira sont distinguées par des gousses assez larges (2. à 2.40cm). Tandis que la plus faible largeur a été enregistrée avec l'accession de Taounate (1.37cm). Par ailleurs, Gharnit (1997) a rapporté que la région de Tétouan est caractérisée par des caroubiers dont les gousses ne sont larges que de 1.66cm.

### ***Épaisseur des gousses***

L'épaisseur des gousses est également très variable d'une accession à l'autre et constitue un critère de distinction entre les gousses comprimées ou volumineuses. Elle peut atteindre 1cm notamment chez les gousses charnues (Batlle et Tous, 1997).

Cette variable nous a permis de distinguer les accessions caractérisées par des gousses charnues et volumineuses à savoir Essaouira, Aïn Safa et Ouazzane (épaisseur > 0.81cm), des autres accessions ayant des gousses aplaties ou comprimées : Taounate, Demnate, Akhort et Sidi Bou Othmane (épaisseur de 0.33 à 0.49cm). Par ailleurs, Gharnit (1997) a rapporté 0.22cm comme valeur moyenne de l'épaisseur des gousses provenant de la région de Tétouan.

### ***Poids de la gousse et de la pulpe***

Les variables mesurées précédemment, longueur, largeur et épaisseur, influencent beaucoup le poids total de la gousse et la quantité de son pulpe. En effet, nous avons observé qu'en général, les accessions ayant un important poids de fruit et de pulpe sont celles qui ont des gousses assez longues, larges et épaisses (Ouazzane, Aïn Safa et Al Houceima).

La pulpe qui est le principal composant de la gousse constitue, en général, 73 à 95% de son poids total (Caja et *al.*, 1988; Crescimanno et *al.*, 1988; Marakis et *al.*, 1988). Selon nos résultats, elle constitue 70 à 90% du poids total de la gousse, elle dépasse les 80% de la gousse dans les accessions de Essaouira (89.6%), Ouazzane (84%), Aïn Safa (84%), Al Houceima (84%) et Taourirt (83%).



**Tableau II. 1:** Caractéristiques agro-morphologiques des gousses de neuf accessions marocaines

Paramètre	Longueur (cm)		Largeur (cm)		Corde (cm)		Epaisseur (cm)		Poids de gousse (g)		Nombre de graine/gousse		Nombre de graine avortée		Poids des gaines (g)		Poids de pulpe (g)		Garniture de gousse (%)		
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	
<b>Taourirte</b>	13.9	2.27	2.20	0.26	11.93	2.41	0.59	0.15	11.41	3.64	9.27	2.44	0.93	1.01	1.81	0.60	9.45	3.20	90.28	10.46	
<b>Al Houceima</b>	14.36	2.34	1.93	0.14	10.89	2.94	0.77	0.12	13.8	3.23	10.06	1.87	1.48	1.2	2.19	0.62	11.52	2.67	83.84	14.70	
<b>Taounate</b>	14.38	1.48	1.37	0.15	8.28	2.06	0.49	0.37	6.13	1.16	10.08	1.75	0.61	0.74	1.75	0.35	4.28	0.86	94.34	6.90	
<b>Aïn Safa</b>	17.27	1.90	2.10	0.13	14.03	2.4	0.84	0.09	15.69	3.3	12.46	1.99	0.6	0.88	2.46	0.5	13.16	2.88	95.39	6.49	
<b>Akchort</b>	16.12	1.04	1.86	0.09	14.35	2.16	0.41	0.09	15.66	1.59	12.75	1.78	1.09	0.79	2.51	0.46	13.05	1.25	91.41	6.29	
<b>Demnate</b>	13.14	2.70	1.75	0.19	9.92	2.66	0.42	0.10	5.25	1.57	9.52	2.70	0.63	0.92	1.42	0.49	3.81	1.28	92.63	10.48	
<b>Ouazzane</b>	16.12	1.31	2.40	0.16	12.63	2.18	0.81	0.07	18.19	2.11	12.27	1.24	0.85	1.01	2.84	0.38	15.25	1.93	91.46	8.09	
<b>S. B.</b>	16.54	1.37	1.69	0.12	14.91	2.81	0.33	0.05	7.89	1.19	12.25	1.46	0.60	0.82	1.81	0.28	6.14	1.52	95.36	6.25	
<b>Othmane</b>																					
<b>Essaouira</b>	12.62	1.28	2.00	0.13	11.66	1.53	0.97	0.16	10.41	1.87	9.51	1.48	2.51	1.41	1.04	0.33	9.33	1.73	73.21	14.88	

M: valeur moyenne de différents variables mesurés (n=100)

DS: déviation standard

Les valeurs agro-alimentaires et industrielles du caroubier résident, principalement, dans la teneur de ses fruits en pulpe, mais aussi dans la composition chimique de cette dernière. Selon Batlle et Tous (1997), les cultivars espagnols sont largement caractérisés par leur grande quantité de pulpe contenue dans la gousse. Cependant, la quantité de pulpe produite au Maroc est significative et son exportation a été estimée, par Ouchkif (1988a; cité dans Gharnit et *al.*, 2001) à 20131 tonnes.

**Graine: nombre total ou avortée et pourcentage**

Comme la plupart des caractères, le nombre moyen des graines par gousse est très variable. Selon nos accessions, nous avons obtenu 9.27 à 12.75 graines par gousse. Les accessions ayant le plus grand nombre de graines par gousse sont celles de Akhort (12.75), Aïn Safa (12.46), Ouazzane (12.27) et Sidi Bou Othmane (12.25). Par contre, celles caractérisées par un faible nombre de graines par gousse sont Taourirt (9.27), Essaouira (9.51) et Demnate (9.52).

Par ailleurs, certains auteurs ont rapporté que la gousse du caroubier peut renfermer entre 12 à 16 graines (Tutin et *al.*, 1993; Gharnit, 1997). L'abondance des graines dans les gousses d'une production de caroubier, serait un caractère distinctif entre les types sauvages et cultivars. En effet, les types sauvages sont connus pour leur grande production de graines qui sont généralement petites et non charnues (Marakis et *al.*, 1988; Ouchkif, 1988; Di Lorenzo, 1991).

Toutefois, les fruits de différentes accessions renferment un nombre variable de graines avortées. Nous avons remarqué que le nombre moyen de graines avortées par gousse varie de 0.6 à 2.51 et le plus grand nombre a été enregistré avec les fruits d' Essaouira (2.51 graines avortées par gousse), mais le plus faible a été observé dans les accessions de Aïn Safa (0.6), Taounate (0.6) et Sid Bou Othmane (0.6). Ce paramètre nous renseigne surtout sur la garniture des gousses en graines, plus il est faible, plus les gousses ne renferment que des graines viables et la production est meilleure.

Le rendement de gousse en graines par accession, estimé selon la formule suivante:  $R (\%) = (\text{poids frais moyen des graines} / \text{poids frais moyen de gousse}) \times 100$ , a permis de révéler que la production de graines varie de 9.99 à 28.57% et leurs valeurs moyennes sont situées entre 14.6 et 25% selon nos accessions. En effet, le rendement de gousse en graines a été très important chez trois accessions, Taounate (28.57%), Demnate (27.04) et Sidi Bou Othmane (23%), moyen chez les cinq autres accessions, Akhort (16.02%), Taourirt (15.86%), Al Houceima (15.86%), Aïn Safa (15.67%) et Ouazzane (15.61%) et faible chez l'accession de Essaouira (9.99%) (Tableau II. 2). Ces données sont en parfaite concordance avec les résultats de certains travaux réalisés au Maroc, qui ont révélé 15% (Ouchkif, 1988a) ou 12 à 25% (Gharnit, 1997; Gharnit et *al.*, 2001) de rendement de gousse en graines.

D'après plusieurs auteurs, le rendement des gousses en graines est sensiblement variable, notamment dans les pays méditerranéens où il est de l'ordre de 5 à 27% (Caja et *al.*, 1988; Crescimanno et *al.*, 1988; Marakis et *al.*, 1988). En Espagne, le rendement moyen en graines est

estimé à 8 - 10%; mais peut être important chez certains cultivars, tel que 'Duraió' (16 à 17%), 'Sayalonga' (13 à 14%) et 'Banya Cabra' (13 à 14%) ou faible comme 'Negra' (7 à 9%) (Tous et *al.*, 1996). En Italie, la production de graines par les cultivars locaux est moyennement faible et estimée à 8% (Tous et *al.*, 1996). Au Portugal, elle est moyenne et peut atteindre 12 à 14% chez le cultivar 'Mulata' ou 14 à 16% chez 'Galhosa' (Tous et *al.*, 1996). En Chypre, elle est moyennement faible (8 à 11%) chez le cultivar 'Tyllirio' ou moyenne (14 à 15%) chez 'Koundourka' (Orphanos et Papacontantinou, 1969; Tous et *al.*, 1996). En Grèce comme en Tunisie, le rendement des gousses en graines est estimé à 9% respectivement chez le cultivar 'Hemere' (Kalaitzakis et *al.*, 1988; Tous et *al.*, 1996) et le cultivar 'Sfax' (Crossa-Raynaud, 1960; Tous et *al.*, 1996). Puis en Californie (USA), la production des graines est estimée à 10 - 12%, notamment chez le cultivar 'Santa Fe' (Tous et *al.*, 1996).

Bien que le fruit soit le principal critère pour sélectionner le caroubier, notamment sa grandeur, le poids de pulpe, rendement en graines et sa teneur en sucre, beaucoup de chercheurs ont démontré que sa contenance en pulpe ou en graines est négativement corrélée. En conséquence, les planteurs se sont plus penchés sur le trait lié au rendement des gousses en graines et surtout sur ses qualités qui sont actuellement plus convoitées et rentables sur le plan économique (Brito de Carvalho, 1988a; Tous et *al.*, 1996; Batlle et Tous, 1997). En effet, la graine par rapport à la pulpe comporte d'autres valeurs ajoutées. Elle est largement et diversement utilisée en industrie alimentaire et technologique (Batlle, 1997).

Se basant sur le fait que la production des graines est plus importante chez le caroubier de types sauvages par rapport aux cultivars sélectionnés (Marakis et *al.*, 1988; Di Lorenza, 1991; Tous et *al.*, 1995; Batlle et Tous, 1997; Gharnit et *al.*, 2001), nous pouvons insinuer que les plantations marocaines, à l'image de nos différentes accessions, manifestent de traits typiquement sauvages. Ceci, confirme les rapports de Ouchkif (1988a), Batlle et Tous (1997) et Gharnit et *al.*, (2001) qui ont souligné que la production massive des gousses et des graines, au Maroc, est assurée par les populations spontanées. Par ailleurs et dans le monde, le Maroc occupe, derrière l'Espagne, l'Italie et le Portugal, le quatrième rang dans la production de gousses avec 26000 tonnes. Tandis qu'il occupe la deuxième place en ce qui concerne la production des graines totalisant ainsi 4360 à 4800 tonnes d'où 15% de la production mondiale en graines (Ouchkif, 1988a; Batlle et Tous, 1997).

A partir des ces différentes analyses, nous avons pu déceler les principaux caractères du fruit qui ont d'énormes valeurs morphologiques et agronomiques, puis les regrouper en fonction de chaque accession dans le tableau (II. 2). Ce regroupement des caractères nous a offert, non seulement un aperçu globale sur la qualité des fruits, mais aussi une opportunité d'établir une première «fiche descriptive agro-morphologique» de nos différentes accessions du caroubier. Ainsi, le premier groupe d'accessions, ayant une qualité notable des fruits et une valeur agronomique appréciable, est composé des accessions de Ouazzane et de Aïn Safa. Le second groupe d'accessions dont les fruits sont d'une qualité acceptable notamment la qualité pondérale des ses graines, est

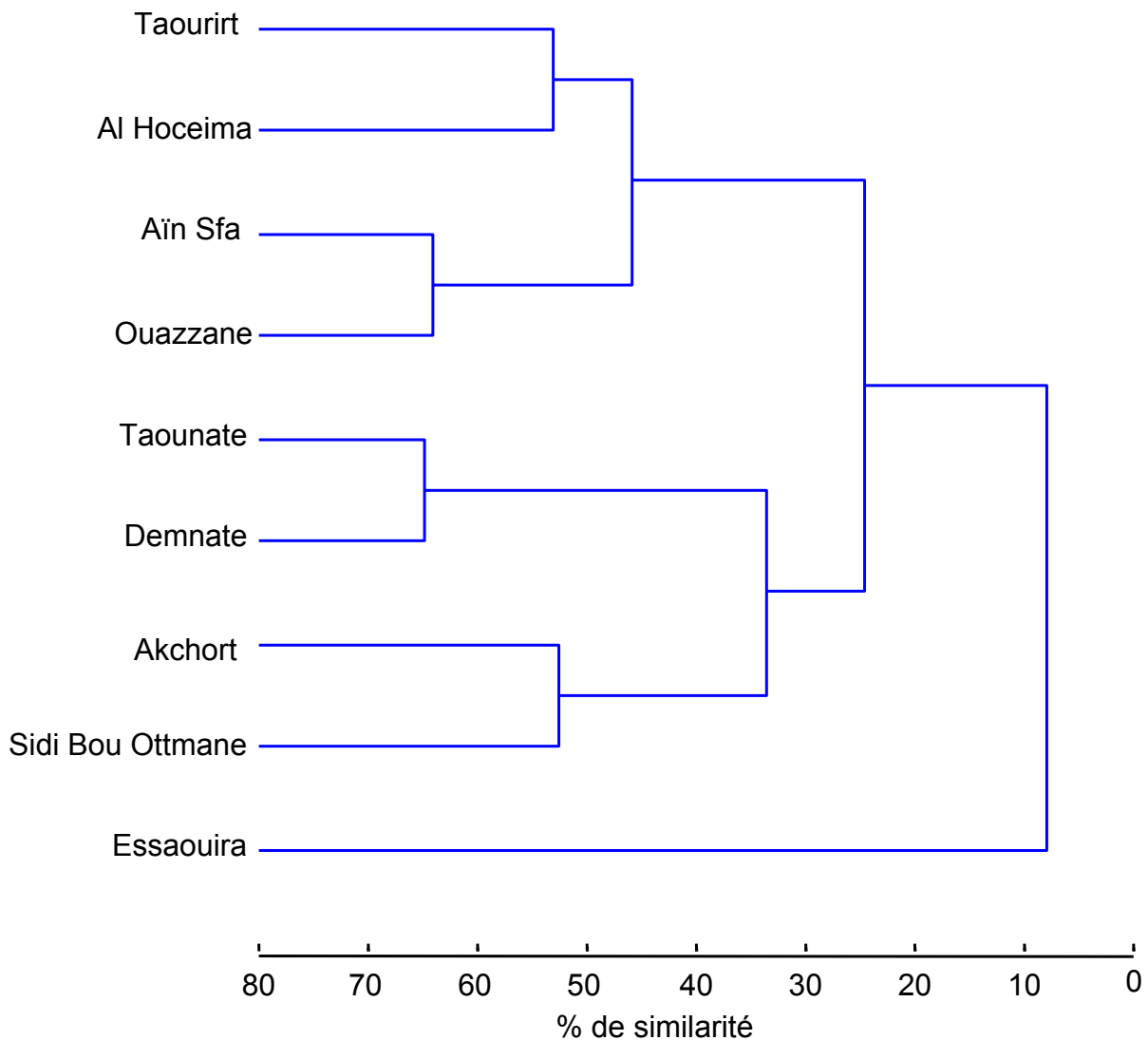
constitué de l'accession de Al Houceima et de Akchourt. Quant à l'accession de Essaouira, elle a tendance à s'individualiser et se positionner d'une manière intermédiaire entre les deux premiers groupes. Bien que ses fruits semblent dotés d'une valeur agronomique notable, ils sont cependant accusés pour leur courte taille et leur teneur significative en graines avortées. Par opposition, le troisième groupe d'accessions ayant une mauvaise qualité de fruit et qui serait de type sauvage, inclus celle de Taounate, Sidi Bou Othmane, Demnate et Taourirt.

**Tableau II. 2:** Principaux caractères morpho-agronomiques des fruits de neuf accessions marocaines de caroubier

<b>Accession</b>	<b>Taille des gousses</b>	<b>Forme des gousses</b>	<b>Aspect des gousses</b>	<b>Rendement en graines (%)</b>
<b>Taourirt</b>	Légèrement courte	Droite	Comprimé	<b>15.86</b>
<b>Al Houceima</b>	Moyenne	Légèrement courbée	Peu volumineux	<b>15.86</b>
<b>Taounate</b>	Moyenne	Courbée	Comprimé	<b>28.54</b>
<b>Aïn Safa</b>	Légèrement longue	Légèrement courbée	Volumineux	<b>15.67</b>
<b>Akchourt</b>	Légèrement longue	Droite	Comprimé	<b>16.02</b>
<b>Demnate</b>	Légèrement courte	Légèrement courbée	Comprimé	<b>27.04</b>
<b>Ouazzane</b>	Légèrement longue	Légèrement courbée	Volumineux	<b>15.61</b>
<b>S. B. Othmane</b>	Légèrement longue	Droite	Très comprimé	<b>23.00</b>
<b>Essaouira</b>	Légèrement courte	droite	volumineux	<b>9.99</b>

#### 4. 1. 3. Relation génétique inter-accession

Les matrices engendrées pour les différents marqueurs agro-morphologiques, analysées par le logiciel STATISTICA *via* la méthode UPGMA, a permis d'établir les premières relations génétiques entre les différentes accessions. En effet, le dendrogramme obtenu (Fig. II. 4) révèle parfaitement l'existence d'un niveau significatif du polymorphisme agro-morphologique inter-accession. Ainsi, en se situant arbitrairement à un niveau de 50% de similitude, nous avons obtenu quatre groupes distincts contenant chacun deux accessions et un alignement constitué d'une seule accession.



**Fig. II. 4:** Dendrogramme généré par UPGMA de l'analyse morpho-agronomique de neuf accessions marocaines du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.).

Le premier cluster est composé des accessions de Taourirt et d'Al Hoceima et qui n'ont que 53% de similitude entre elle. Le second cluster constitué des provenances de Aïn Sfa et de Ouazzane corrélées entre elles à 63% de ressemblances. Ce même coefficient, rapproche les accessions de Taounate et Demnate du 3<sup>ème</sup> groupe. Akchourt et Sidi Bou Othmane qui ont en commun 53% des variables mesurées, composent le 4<sup>ème</sup> cluster. Par contre, l'accession de Essaouira qui s'individualise des autres accessions surtout sous l'influence de deux variables à savoir le grand nombre de graines avortés par gousse et le faible rendement des gousses en graines.

Cette corrélation génétique basée sur la comparaison de différentes données agromorphologiques, reflète solidement la fiche descriptive et qualitative que nous avons précédemment établi pour caractériser et catégoriser les fruits de ces neuf accessions marocaines.

## **4. 2. Variabilité de la dureté tégumentaire des graines**

### **4. 2. 1. Aspect des graines**

Comme les gousses, l'observation visuelle de l'aspect des graines de différentes accessions, a révélé une grande diversité morphologique. En effet, des échantillons d'une cinquantaine de graines chacun représentant sept accessions (Fig. II. 5), montrent clairement l'existence de diverses couleurs de graines inter et intra-accession.

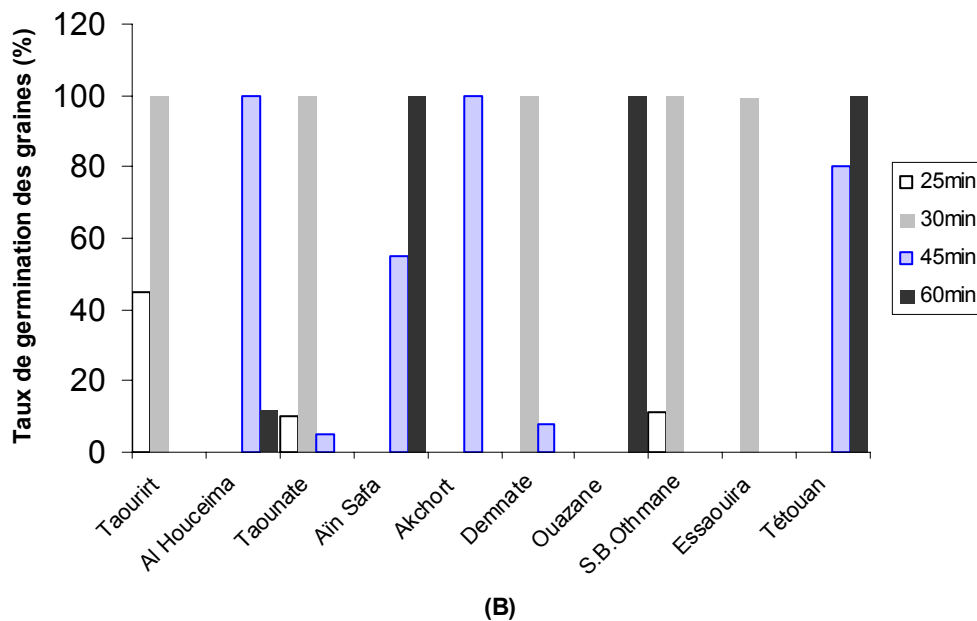
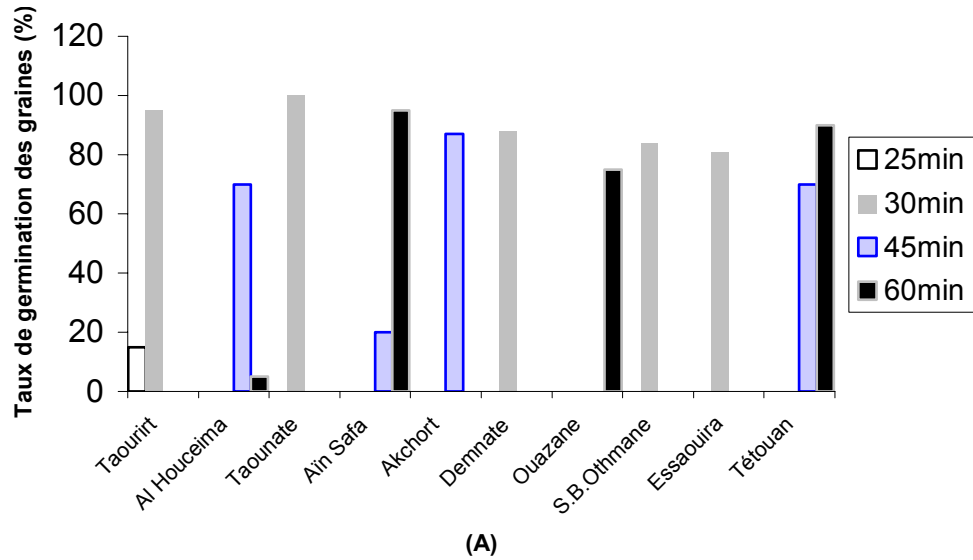
Par ailleurs, nous avons remarqué que la taille des graines est très variable, selon les accessions. Elle est grande comme le cas des graines de Ouazzane, petite telle que celles de Taounate ou intermédiaire comme c'est le cas des graines de Akchourt (Fig. II. C, d et f).

### **4. 2. 2. Différence dans la dureté du manteau des graines**

Les résultats obtenus à partir de la germination des graines du caroubier ayant subies une scarification avec l'acide sulfurique ou traitées avec de l'eau bouillante, sont concluants. Le taux de germination pour l'ensemble des accessions a été meilleur et supérieur pour les lots de graines traités avec l'acide sulfurique concentré (95%). Cependant, une variabilité en fonction des accessions et de la durée du trempage est notable (Fig. II. 6 a et b). Ainsi, nous avons constaté que le taux de germination de graines est, pour chaque accession, intimement lié à la durée d'action de l'acide sulfurique. En conséquence, la durée d'action de l'agent scarifiant a été également exploitée comme étant un caractère important pour différencier chaque lot de graines.



**Figure II. 5:** Variabilité dans la morphologie (couleur et taille) des graines du caroubier provenant de sept accessions du Maroc: Al Houceima (a), Taourirt (b), Akchort (c), Taounate (d), Sidi Bou Othmane (e), Ouazzanz (f) et Demnate (g).



**Figure II. 6:** Influence de la durée de scarification avec l'acide sulfurique (95%) sur le taux de germination des graines du caroubier provenant de différentes régions du Maroc. Résultats récoltés après 3 jours (A) et 7 jours (B) de mis en germination.

Pour une durée idéale de trempage des graines dans l'acide sulfurique, nous avons enregistré plus de 70% de germination juste après 3 jours d'incubation (Fig. II. 6A) et 100% de germination après 7 jours (Fig. II. 6B). A travers cette dernière figure et en fonction de la durée de scarification ainsi que le meilleur taux de germination pour chaque accession, nous avons distingué trois groupes de graines dont la dureté du manteau serait l'unique caractère discriminant.

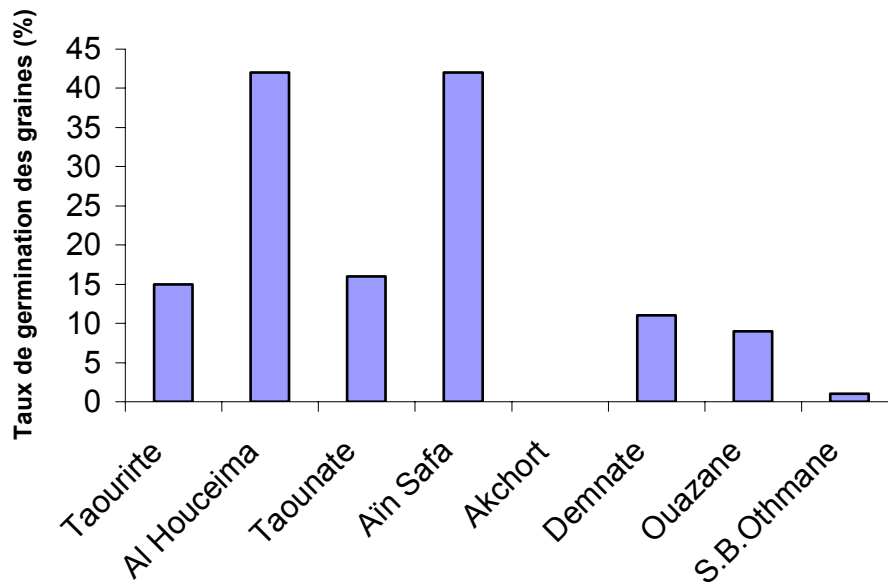
- Le premier groupe incluant les accessions de Sidi Bou Othmane, Taounate, Taourite Demnate et Essaouira, est caractérisé par des graines qui ne nécessitent que 30min de scarification sulfurique.



- Le second groupe, dit intermédiaire et composé des accessions de Al Houceima et de Akchort, est doté de graines qui nécessitent 45min de contact avec l'acide sulfurique pour une bonne germination.

- Le troisième groupe, constitué des accessions de Ouazzane, Ain Safa et de Tétouan, est caractérisé par des graines dont la bonne germination est tributaire à 60min du trempage dans l'acide sulfurique.

Par contre, l'utilisation de l'eau bouillante comme moyen de scarification des graines de huit accessions, a révélé après un mois de semis, un très faible taux de germination (Fig. II. 7). Le taux le plus élevé (42%) a été enregistré seulement dans le cas de deux accessions, Al Houceima et Ain Safa. Cependant, aucune germination n'a été observée dans le cas de Akchort.



**Figure II. 7:** Influence de scarification à l'eau bouillante sur le taux de germination des graines du caroubier provenant de huit régions du Maroc. Résultats récoltés après 30 jours de semis.

Généralement, la graine du caroubier ne souffre aucunement de dormance physiologique (due à des inhibiteurs biochimiques) ou morphologique (embryon immature), mais plutôt de dormance physique causée par la résistance de son enveloppe qui empêche l'absorption de l'eau favorisant ainsi sa conservation qui peut dépasser plus de 5 ans (Coit, 1951; Goor et Barney, 1968). Elle germe facilement sans avoir nécessité un traitement préalable au froid pour lever la dormance embryonnaire (Rhizopoulou et Davies, 1991; Batlle et Tous, 1997). Par ailleurs, la résistance de son enveloppe tégumentaire a fait l'objet de plusieurs études. Ainsi, Ortiz et *al.*, (1995) ont rapporté que malgré son exposition au feu ou son passage dans le système gastrique de certains animaux, la graine du caroubier reste viable.

Pour contourner la dormance tégumentaire, améliorer et rentabiliser la germination des graines dans un temps réduit, plusieurs techniques de pré traitement de graine du caroubier ont été adaptées. En effet, ces graines ont subi des traitements humides, par l'eau bouillante (Batlle et

Tous, 1997), l'acide gebberelline (Frutos, 1988; Batlle et Tous, 1997) et l'acide sulfurique (Karschon, 1960; Goor et Barney, 1968; Frutos, 1988; Missbah et al., 1996; Batlle et Tous, 1997; Cruz et al., 1997; Christodoulakis et al., 2002) ou des traitements mécaniques (Coit, 1951; El-Shartnawi et Ereifej, 2001). Toutefois, leur traitement par l'acide sulfurique a été unanimement reconnu d'être plus efficace par rapport aux autres méthodes (Goor et Barney, 1968; Frutos, 1988).

Selon Bajpai et Totawat (1976), l'accélération de la germination due au traitement à l'acide sulfurique est généralement attribuée à un ramollissement du tégument de la graine par oxydation, augmentant sa perméabilité à l'air et à l'eau. Cependant, sa durée d'application doit être préalablement déterminée pour éviter l'éventuelle lésion de l'embryon (Cavanagh, 1980a). Chez le caroubier, la durée du traitement sulfurique a été, selon les auteurs, très variable. Elle a été déterminée à 10min (Christodoulakis et al., 2002), à 15min (Cruz et al., 1997), à 30min (Frutos, 1988; Konaté, 2001), à 45min (Konaté, 2001) et à 60min (Goor et Barney, 1968; Karschon, 1960; Missbah et al., 1996; Batlle et Tous, 1997; Konaté, 2001).

Ce même phénomène a été remarqué chez d'autres espèces végétales appartenant à la famille de légumineuses, dont les graines ont nécessité une scarification sulfurique. En effet, la durée du trempage des graines dans l'acide sulfurique a été de 15 à 30min pour les graines des espèces appartenant au genre *Prosopis* (Arreghini, 1972; Bajpai et Totawal, 1976) ou de 40 à 120min pour les graines de *Acacia farnesiana* (Kumar et Purkayasha, 1972) et de *Acacia tortillis* (Karshon, 1975; Carr, 1976; Pathak et al., 1980; NAS, 1980).

Cette différence dans la persistance ou dureté de l'enveloppe tégumentaire des graines notamment face à l'action de l'acide sulfurique concentré, et traduit par le taux de germination, constitue un caractère agronomique et morphologique important. Du fait que nos fruits sont récoltés dans dix régions marocaines appartenant essentiellement à deux étages bioclimatiques, semi-aride et subhumide, la variabilité dans la dureté tégumentaire de graines serait probablement attribuée au type du caroubier et sa provenance. D'après Neukom (1988), le poids de l'enveloppe de graine du caroubier est très variable d'un type à l'autre, il est de l'ordre de 30 à 33% du poids total de la graine. Par ailleurs, ce trait lié à la variabilité tégumentaire a également contribué dans la catégorisation et la différenciation de nos accessions et qui est en parfaite concordance avec les résultats obtenus à partir de relations génétiques basées sur les données agro-morphologiques de fruits. En conséquence, nous nous sommes permis en se basant particulièrement sur les principaux résultats obtenus de proposer une fiche technique et descriptive de neuf de nos accessions (Tableau II. 3).

**Tableau II. 3:** Catégorisation et caractérisation morphologique et agronomique des fruits de neuf accessions marocaines du caroubier

Cluster 70% S*	Accession	Etage bioclimatique	Taille de gousse	Forme de gousse	Etat de gousse	Rendement en gaines (%)	Durée de scarification
1	<b>Taourirt</b>	Semi-aride	L. courte	Droite	Comprimé	<b>15.86</b>	30min
	<b>Demnate</b>	Semi-aride	L. courte	L. courbée	Comprimé	<b>27.04</b>	30min
2	<b>Taounate</b>	Subhumide	Moyenne	Courbée	Comprimé	<b>28.54</b>	30min
	<b>S. Othmane</b>	Semi-aride	L. longue	Droite	Très comprimé	<b>23.00</b>	30min
	<b>Aïn Safa</b>	Semi-aride	L. longue	L. courbée	Volumineux	<b>15.67</b>	<b>60min</b>
3	<b>Ouazzane</b>	Subhumide	L. longue	L. courbée	Volumineux	<b>15.61</b>	<b>60min</b>
4	<b>Al Houceima</b>	Subhumide	Moyenne	L. courbée	Peu volumineux	<b>15.86</b>	45min
	<b>Akchort</b>	Subhumide	L. longue	Droite	Comprimé	<b>21.52</b>	45min
linéaire	<b>Essaouira</b>	Semi-aride	L. courte	droite	volumineux	<b>9.99</b>	30min

S\* : % de similarité ; L. : légèrement ; Acide sulfurique concentré (95%)

## Chapitre III: Etude du polymorphisme moléculaire

### 1. INTRODUCTION

Certes, le premier arrangement d'une collection donnée par le *biais* des marqueurs phénotypiques est indispensable; cependant, ces derniers ne suffisent pas pour accomplir une identification ou une classification bien définitive et crédible. D'autant plus que les caractères phénotypiques sont souvent biaisés par les facteurs environnementaux. En conséquence, l'usage de nouvelles approches d'ordre moléculaire, s'est avéré incontournable pour identifier des organismes, étudier leur diversité et établir leurs relations phylogénétiques.

En plus de leur aisance à exécuter au laboratoire et de leur efficacité dans l'étude du polymorphisme et l'élaboration de carte génétique, les marqueurs moléculaires sont dotés d'un pouvoir leur permettant de caractériser des gènes spécifiques à une plante donnée, des gènes étrangers, des gènes liés à certaines maladies, des gènes liés au sexe.... Actuellement, il existe plusieurs types de marqueurs moléculaires et l'utilisation de deux ou plus d'entre eux, amplifie considérablement le degré de la viabilité de l'étude menée. Raison pour laquelle nous avons opté, dans cette étude, pour les marqueurs ISSR, RAPD et AFLP.

Il est très important de signaler que le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.), jusqu'à nos jours, fait partie de plantes largement ignorées et probablement non étudiées sur le plan moléculaire. C'est pour quoi, ce présent travail laisse dégager un parfum d'originalité exigeant l'élaboration ou la mise au point de divers protocoles indispensables pour l'analyse moléculaire de nos différentes accessions.

### 2. MISE AU POINT DES DIFFERENTS PROTOCOLES

#### 2. 1. Matériel végétal

Il s'agit du même matériel végétal précédemment utilisé pour des analyses morpho-agronomiques. Ainsi, après la germination des graines testées pour leur variabilité tégumentaire, elles sont transférées dans des pots contenant du sol fertile et humide. Les pots sont ensuite placés dans une chambre de culture convenablement éclairée. Après six mois de culture, les feuilles sont récoltées et stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  en attendant leur utilisation ultérieure.

#### 2. 2. Protocoles d'extraction de l'ADN génomique, testés et/ou modifiés

Le fait que nous n'avons trouvé, dans la littérature scientifique, aucun rapport faisant allusion à un protocole d'extraction d'ADN adapté à l'espèce de *Ceratonia siliqua*, nous étions dans l'obligation de tester voir modifier certains protocoles déjà adaptés à d'autres plantes. Ainsi, nous avons testé le protocole de Dellaporta et *al.*, (1983), de CTAB (Doyle et Doyle, 1987) et de Ouenzar et *al.*, (1998). Ici, nous ne rapporterons que celui de Ouenzar et *al.*, (1998) modifié et adapté à l'espèce de *Ceratonia siliqua* L.

### 2. 2. 1. Protocole de Ouenzar et *al.*, (1998) modifié et adapté au caroubier

Vu que la reproduction fidèle du protocole de Ouenzar et *al.*, (1998), sur le matériel foliaire du caroubier, a semblé être prometteuse par rapport à celui de Dellaporta et *al.*, (1983) et de CTAB (Doyle et Doyle, 1987), des profondes modifications lui ont été apportées afin de le rentabiliser. Ces modifications ont porté aussi bien sur le tampon de lyse que sur les différentes démarches dans l'exécution du protocole. Ainsi, plusieurs concentrations de EDTA (3, 5, 15, 25 et 50mM), de  $\beta$ -mercaptoéthanol (0.028, 0.1 et 0.5%) et de BSA (0.1 et 0.05) ont été testées. Par ailleurs, le volume du tampon de lyse a été doublé ainsi qu'une 'semi préparation' a été, après de longue période d'essai, minutieusement adaptée au caroubier selon le protocole suivant:

L'extraction de l'ADN bulk, à partir du mélange des feuilles de 50 plantules issues de la germination des graines de chaque accession, a eu lieu sans l'apport de l'azote liquide. En effet, un gramme de feuilles fraîches est finement découpé puis broyé, dans un mortier préalablement refroidi, dans 5ml du tampon de lyse constitué de 50mM Tris-HCl pH<sub>8</sub>, 5mM EDTA pH<sub>8</sub>, 300mM Mannitol, 0.05% BSA, 1% PEG<sub>6000</sub> et 0.5%  $\beta$ -mercaptoéthanol. Le broyat est ensuite transféré dans un tube contenant 600 $\mu$ l de SDS (20%) et 400 $\mu$ l d'Acétate de Sodium (3M, pH<sub>8</sub>) puis incubé à 65°C pendant 30min. Après le refroidissement, la préparation a subi des déprotéinisations par deux lavages avec un volume (v/v) de chloroforme/alcool-isoamylique (24/1), séparés par un autre lavage avec le mélange phénol/chloroforme/iso-amylique (25/24/1). Ce-ci permet la neutralisation ou l'élimination, par chloroforme, de toutes traces de phénol naturellement présent dans les feuilles et synthétique additionné préalablement. Chaque étape de lavage est suivie d'une centrifugation à 10000g pendant 10min à 4°C. Dans le tube où le dernier surnageant est récupéré, un volume (v/v) d'isopropanol froid est additionné puis incubé à -20°C pendant 1 heure. Après centrifugation à 10000g pendant 20min à 4°C, le culot d'ADN est lavé avec l'éthanol froid (70%) puis séché sous vide (Speed Vac). Il est ensuite re-suspendu dans du TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA) pH<sub>7.4</sub>, traité avec la protéinase K (20 $\mu$ g/ml) et incubé à 37°C pendant 30min. Une autre étape de lavage avec phénol/chloroforme/iso-amylique et de centrifugation a été réalisée. La sédimentation de l'ADN contenu dans la phase supérieure est réalisée par l'ajout d'un volume (1/10) de NaCl (5M) et (v/v) d'éthanol absolu, puis incubé à -20°C pendant toute une nuit. Après une centrifugation à 10000g pendant 20min à 4°C, le culot est séché, solubilisé dans 200 $\mu$ l de TE et enfin traité avec 2 $\mu$ l d'ARNase (10 $\mu$ g/ml) et incubé à 37°C pendant 30min.

Une maxi préparation a été également réalisée respectant, selon la quantité du matériel végétal du départ, les facteurs de multiplication du volume de différents tampons.

### 2. 2. 2. Evaluation de la qualité et de la quantité de l'ADN extraite

La qualité de l'ADN extraite a été d'abord vérifiée sur gel test d'agarose (0.8%) puis par la mesure de la densité optique (DO) à 260nm. En effet, 10 $\mu$ l d'ADN plus 2 $\mu$ l de tampon de charge (Promega) déposé dans les puits du gel, ont été migrés dans le tampon TBE (Tampon Tris Borate) pendant 1h à 80voltes. Le gel, après sa coloration dans un bain de Bromure d'éthidium (0.1%) a

été visualisé sous UV. Ce test a été réalisé deux fois en présence d'une quantité connue de l'ADN de phase  $\lambda$  non digéré.

Par ailleurs, la quantité d'ADN extraite a été évaluée par la mesure de la DO à 260nm. Elle est déterminée selon la formule suivante: Quantité d'ADN (ng/ $\mu$ l)= valeur d'absorbance à 260nm x 50 x facteur de dilution. Une autre mesure de la DO prise à 280nm a permis d'évaluer également la quantité de protéine contenue dans la suspension d'ADN. Ainsi, le rapport entre ces deux mesures:  $DO_{260}/DO_{280}$  constitue un moyen évaluatif numérique permettant d'apprécier la qualité ou la pureté de notre extrait d'ADN. En effet, plus ce rapport tend vers 2 plus l'extrait d'ADN est qualifié de meilleur ou pure et son utilisation dans plusieurs techniques d'amplification est vouée au succès.

### 2. 3. Procédures d'amplification de l'ADN du caroubier par PCR

Le mélange réactionnel ainsi que la réaction PCR doivent être, en fonction de chaque technique moléculaire, adaptés à l'espèce végétale. C'est pourquoi, nous avons eu recours à l'utilisation de certains protocoles existants ou nouvellement proposés et qui ont subi ou non de profondes modifications.

#### 2. 3. 1. Mise au point de la réaction PCR/ISSR

La technique ISSR basée sur la réaction PCR, utilise des amorces à simple séquence répétée pour amplifier les régions ou nucléotides présentes dans les espaces inter-microsatellites (Zietkiewicz et *al.*, 1994; Kahl, 2001).

##### 2. 3. 1. 1. Mélange réactionnel

La composition du mélange réactionnel est celle décrit par FAO/IAEA (2002) avec quelques modifications nécessaires (Tableau III. 1). Le volume final nécessaire pour la réaction PCR est fixé à 25 $\mu$ l.

**Tableau III. 1:** Composition du mélange réactionnel pour PCR/ISSR selon FAO/IAEA (2002) et celui adapté au caroubier.

Protocole de FAO/IAEA (2002)		Protocole adapté au caroubier	
Éléments du mélange	Volume de prise ( $\mu$ l)	Éléments du mélange	Volume de prise ( $\mu$ l)
Tampon PCR (x10)	2.5	Tampon PCR (x10)	2.5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2.5	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2.5
DNTPs (2mM)	2.5	DNTPs (125 $\mu$ M)	0.5
Amorce (100 $\mu$ M)	2.5	Amorce (100 $\mu$ M)	1
Taq polymérase (5U)	0.2	Taq polymérase (5U)	0.4
ADN (10-20ng/ $\mu$ l)	1 - 2.5	ADN (16-25-50-100ng/ $\mu$ l)	1

##### 2. 3. 1. 2. Amplification d'ADN de caroubier par PCR/ISSR

Les tests de réaction PCR, utilisant certaines amorces ISSR (F1, F2, F3 et F4), ont été conduits fidèlement selon ces deux programmes du cycle thermique:

### a. Programme PCR/ISSR selon FAO/IAEA (2002)

- Dénaturation initiale 94°C à 7min
  - Dénaturation de l'ADN 94°C à 30s
  - Hybridation de l'amorce **45°C** à 45s
  - Extension de l'amorce 72°C à 2min
  - Elongation finale 72°C à 7min
- } 32 cycles

### b. Programme PCR/ISSR selon Talhinhos et al., (2003)

- Dénaturation initiale 94°C à 4min
  - Dénaturation de l'ADN 94°C à 30s
  - Hybridation de l'amorce **59°C** à 45s
  - Extension de l'amorce 72°C à 2min
  - Elongation finale 72°C à 7min
- } 40 cycles

Les amplifias ont été séparés sur gel d'agarose (2.5%), colorés dans le BET et visualisés sous UV. Après la rétention du programme PCR le plus rentable, quatre concentrations d'ADN génomique (16, 25, 50 et 100 ng/μl) ont été également testées.

## 2. 3. 2. Mise au point de la réaction PCR/RAPD

Différemment à l'ISSR, la RAPD utilise pour amplifier l'ADN génomique *via* la réaction PCR, une amorce aléatoire courte d'environ 10 nucléotides, qui peut s'hybrider avec ses séquences complémentaires dans toute partie du génome (Welsh et MaClelland, 1990; William et al., 1990; Adam et Dron, 1993).

### 2. 3. 2. 1. Mélange réactionnel

Dans ce cadre, nous nous sommes référés au mélange réactionnel préalablement adapté à l'amplification de l'ADN de certaines espèces du blé (*Aegilops* et *Triticum*) par Belkadi (2003). Toutefois, des modifications indispensables lui ont été apportées pour son adaptation au caroubier. (Tableau III. 2). Le volume final du mélange a été fixé à 25μl.

**Tableau III. 2:** Composition du mélange réactionnel pour PCR/RAPD selon Belkadi (2003) et celui adapté au caroubier.

Protocole de Belkadi (2003)		Protocole adapté au caroubier	
Elément du mélange	Volume de prise (μl)	Elément du mélange	Volume de prise (μl)
Tampon PCR (x10)	2.5	Tampon PCR (x10)	2.5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2.5	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2.5
Dntp (20mM)	1	Dntp (25mM)	0.5
Amorce (10μM)	0.5	Amorce (10μM)	1
Taq polymérase (5U)	0.8	Taq polymérase (5U)	0.2- 0.3- 0.4- 0.5
ADN (15ng/μl)	1	ADN (10-16-25-30-50g/μl)	1

### 2. 3. 2. 2. Amplification d'ADN de caroube par PCR/RAPD

Au total, six différents programmes du cycle thermique ont été testés. Deux de ces programmes ont été proposés par Marie-Hélène C. (France), ainsi que deux autres ont été appliqués pour amplifier l'ADN du figuier (Khadari et *al.*, 1994) et Palmier dattier (Lashermes et *al.*, 1993; cité par Sedra et *al.*, 1998). Excepté les deux programmes restants qui ont été fructueux, les quatre autres ne seront pas détaillés.

#### a. Programme d'amplification PCR/RAPD selon Belkadi (2003)

- Dénaturation initiale 94°C à 3min
  - Dénaturation de l'ADN 94°C à 1min
  - Hybridation de l'amorce 35°C à 1min
  - Polymérisation de l'amorce 72°C à 2min
  - Elongation finale 72°C à 5min
- } 60 cycles

#### b. Programme d'amplification PCR/RAPD selon Sanz-Cortés et *al.*, (2001)

- Dénaturation initiale 94°C à 4min
  - Dénaturation de l'ADN 92°C à 1min
  - Hybridation de l'amorce 33°C à 1min
  - Polymérisation de l'amorce 72°C à 2min
  - Extension finale 72°C à 10min
- } 45 cycles

Le programme (b) a connu de légères modifications en ce qui concerne la durée de la dénaturation initiale (de 2 à 4min) et addition de la polymérisation finale (72°C à 10min).

Suite à la rétention du programme d'amplification le plus rentable, plusieurs optimisations ont été entreprises. Elles ont concerné les paramètres de réaction PCR liés à l'unité de la *Taq* polymérase (1, 1.5, 2 et 2.5U/μl) et la quantité d'ADN (5, 10, 16, 20, 25, 30 et 50ng/μl).

Les produits du test PCR/RAPD ont été vérifiés par migration sur gel d'agarose (1.2%), coloration dans TBE et visualisation sous UV.

### 2. 3. 3. Mise au point de la technique AFLP

La technique moléculaire AFLP a été très lourde à exécuter. La démarche entreprise pour sa mise au point et son adaptation au matériel génétique du caroubier s'est beaucoup imprégnée du protocole de Vos et *al.*, (1995). Cette technique qui combine à la fois, l'analyse RFLP et la technologie de PCR, est caractérisée par le passage obligatoire par trois étapes.

#### 2. 3. 3. 1. Etape 1: Digestion totale de l'ADN par deux endonucléases

Après plusieurs tests, nous sommes parvenus à l'utilisation de 25μl du mélange réactionnel suivant (Tableau III. 3) pour digérer l'ADN génomique du caroubier.



**Tableau III. 3:** Composition du mélange réactionnel pour la digestion enzymatique

Composition de mixte	Concentration de solution mère	Volume de prise ( $\mu$ l)
Tampon (B)	X 10	2.5
EcoRI	10U/ $\mu$ l	0.25
Tru9I	12U/ $\mu$ l	0.25
ADN	250ng/ $\mu$ l	1

Le mélange est incubé à 37°C pendant 1h, puis à 65°C pendant 1h et enfin à 70°C pendant 15min. La dernière incubation permet d'inactiver les enzymes de restriction.

### 2. 3. 3. 2. Etape 2: Ligation des produits digérés

5 $\mu$ l du mélange réactionnel de la ligation (Tableau III. 4) contenant les adaptateurs spécifiques pour les deux endonuléases, sont directement additionnés aux 25 $\mu$ l précédents et incubés à 37°C pendant 2 heures

**Tableau III. 4:** Composition du mélange réactionnel pour la ligation d'ADN digéré

Composition du mélange	Concentration de solution mère	Volume de prise ( $\mu$ l)
Tampon T4 (ligase)	X 10	3
Adaptateur d'EcoRI	5pmole	0.5
Adaptateur de Tru9I	50pmole	0.5
T4 ligase	3U/ $\mu$ l	0.5
ATP	10mM	0.5

### 2. 3. 3. 3. Etape 3: Amplification d'ADN *via* PCR

L'amplification du produit digéré s'effectue en deux phases

#### 2. 3. 3. 3. 1. Pré-amplification: PCR1

Elle utilise un seul nucléotide comme amorce correspondant à la séquence de chaque adaptateur et la prolonge en 3' par trois bases arbitraires.

##### a. Mixte réactionnel

Le produit ligué a été utilisé sans être dilué de 5 à 10 fois et la réaction PCR1 a été conduite dans un volume final de 25 $\mu$ l de mélange (Tableau III. 5) selon le programme de Vos et *al.*, (1995)

**Tableau III. 5:** Composition du mélange réactionnel pour la pré-amplification

Composition du mélange	Concentration de solution mère	Volume de prise ( $\mu$ l)
Tampon PCR	X 10	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2.5
Amorce EcoRI (0)	50ng/ $\mu$ l	0.75
Amorce Tru9I (0)	50ng/ $\mu$ l	0.75
Dntp	10mM	0.5
Taq polymérase	5U/ $\mu$ l	0.2
Produit digéré	/	2.5

### b. Programme d'amplification PCR1

- Dénaturation de l'ADN 94°C à 30s
  - Hybridation de l'amorce 56°C à 30 s
  - Polymérisation de l'amorce 72°C à 1min
- } 35 cycles

5µl d'amplifia ont été prélevés, vérifiés sur gel test d'agarose (1.2%), le reste est conservé à +4°C.

### 2. 3. 3. 2. Amplification sélective: PCR2

Une série d'amorces qui s'hybrident seulement avec les fragments constitués de bases complémentaires fixées arbitrairement aux adaptateurs lors de la réaction PCR1, a été utilisée. En effet, plusieurs combinaisons de ces amorces spécifiques à l'enzyme EcoRI et Tru9I ont été disponibles (Tableau III. 6).

**Tableau III. 6:** Combinaison d'amorces AFLP disponibles au Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (LMBM), Faculté des Sciences de Rabat (Maroc)

EcoRI	E-ACC	E-ACG	E-ACT	E-AGC	E-AGG
<b>Tru9</b>					
<b>M- CAC</b>	A	F	K	P	U
<b>M- CAG</b>	<b>B</b>	<b>G</b>	L	Q	V
<b>M- CAT</b>	C	H	M	R	W
<b>M- CTA</b>	<b>D</b>	<b>I</b>	N	S	X
<b>M- CTC</b>	<b>E</b>	<b>J</b>	O	T	Y

Seulement six de ces combinaisons d'amorces ont été testées pour re-amplifier le produit de la pré-amplification de l'ADN du caroubier: B, D, E, G, I et J (M-CTC/E-ACG).

#### a. Mélange réactionnel

La réaction de PCR2 a été réalisée dans un volume final de 20µl de mélange de Vos et *al.*, (1995) (Tableau III. 7). Une dilution de 1/30<sup>ème</sup> d'amplifia de PCR1 a été également effectuée.

**Tableau III. 7:** Composition de mixte réactionnel pour la pré-amplification

Composition de mixte	Concentration de solution mère	Volume de prise (µl)
Tampon PCR	X 10	2
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2
Amorce EcoRI + 3	50ng/µl	0.75
Amorce Tru9I + 3	50ng/µl	0.75
Dntp	10mM	0.5
Taq polymérase	5U/µl	0.2
Produit digéré	1/30	5

### b. Programme d'amplification PCR2

La réaction de PCR2 a été réalisée en deux cycles thermiques selon le programme décrit par Vos et *al.*, (1995)

- Dénaturation de l'ADN 94°C à 30s
  - Hybridation de l'amorce 65°C (- 0.7°C/cycle) à 30 s
  - Polymérisation de l'amorce 72°C à 1min
- } 11 cycles
- 
- Dénaturation de l'ADN 94°C à 30s
  - Hybridation de l'amorce 56°C à 30 s
  - Polymérisation de l'amorce 72°C à 1min
- } 22 cycles

Les produits d'amplification de PCR2 ont été, cette fois-ci, vérifiés sur gel d'acrylamide dont les procédures concernant sa composition, la préparation des deux plaques, les conditions de migration en électrophorèse et la révélation, ont été menées selon le description de Vos et *al.*, (1995).

## 3. ETUDE DE POLYMORPHISME MOLECULAIRE DES ACCESSIONS DU CAROUBIER

La réussite de la mise au point et l'optimisation des techniques moléculaires PCR/ISSR et PCR/RAPD, ont été révélatrices et exploitées dans cette partie pour analyser un échantillon représentatif de chacune des accessions du caroubier marocain afin de déterminer la diversité et les relations génétiques inter accessions.

### 3. 1. Matériel végétal et extraction de l'ADN génomique

Une maxi préparation est réalisée afin d'avoir un ADN bulk de chaque accession selon le protocole de Ouenzar et *al.*, (1998) modifié et adapté à l'espèce *Ceratonia siliqua* L.

### 3. 2. Analyse génétique du caroubier *via* PCR/ISSR

#### 3. 2. 1. Amplification par PCR

Seize amorces ISSR 'Operon Technologies, Alameda, USA' désignées par la lettre alphabétique F, ont été utilisées (Tableau III. 9). Ces amorces, selon leur taille et type de répétition, constituent deux groupes distincts:

- Un premier groupe composé de 4 amorces, constituée chacune de 13 à 14 bases et caractérisée par répétition de tri-nucléotides, a été sélectionné selon la description de Yang et *al.*, (1996; cité dans FAO/IAEA, 2002): 5'-CAC ACA CAC ACA(G/A) (C/T)-3', 5'-CAC ACA CAC ACA(G/A)G-3' et 5'-AGC AGC AGC AGC(C/T)-3'.

- Un deuxième groupe composé de 12 amorces, constituée chacune de 18 bases avec une répétition de di-nucléotides, a été sélectionné selon la description de Zietkiewicz et *al.*, (1994; cité dans Talhinas et *al.*, 2003): [AC]<sub>8</sub>YA; [AC]<sub>8</sub>YG; [AC]<sub>8</sub>YT; [AG]<sub>8</sub>YG; [AC]<sub>8</sub>RG; [CA]<sub>8</sub>RY; [GA]<sub>8</sub>YC; [GA]<sub>8</sub>YG; [GA]<sub>8</sub>YT; [GT]<sub>8</sub>YC; [GT]<sub>8</sub>YG, avec Y= C + T et R= A + G.

Les amplifias obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (3%) dans le tampon TBE pendant 4heures à 80 voltes. Après coloration avec le bromure d'éthidium (0.1%), le gel est visualisé sous UV puis photographié et scanné par le logiciel Perfect Image V.6. Les fragments d'ADN révélés sur gel sont appelés bandes ou marqueurs.

### 3. 2. 2. Analyse des données ISSR

Le paramètre dit PIC (Polymorphism information content) lié à la diversité génétique pour chaque amorce utilisée, a été évalué selon la formule de Botstein et *al.*, (1980):  $PIC_j = n(1 - \sum P_{ij}^2)/(n-1)$ , avec  $j$ : amorce concernée,  $n$ : taille de bande  $i$  et  $P_{ij}$ : fréquence de marqueur  $i$  révélé par amorce  $j$  à travers la somme de bande.

La photographie de chaque gel PCR/ISSR, est transférée vers le logiciel GelCompar II pour le traitement. Les profils de chaque accession générés par différentes amorces, sont directement comparés entre eux par marquage ou sélection de leurs bandes respectives et de celles du marqueur moléculaire dont les tailles sont connues. La construction du dendrogramme a été engendrée selon la de méthode UPGMA.

### 3. 3. Caractérisation génétique du caroubier via PCR/RAPD

#### 3. 3. 1. Amplification par PCR

Soixante sept amorces decanucléotidiques arbitraires ont été utilisées sur un échantillon de 5 accessions (Taourirte, Al Houceima, Taouante, Aïn Safa et Akchort) pour un premier criblage. Les amorces positives engendrant des profils clairs et polymorphes, ont été sélectionnées et exploitées pour amplifier les autres 5 accessions, Demnate, Ouazzane, Sidi Bou Othmane, Essaouira et Tétouan.

Les amplifias obtenus sont séparés sur gel d'agarose à 1.2% dans le tampon TBE pendant 4h à 80 voltes. Après la coloration dans BET, le gel est visualisé sous UV puis photographié et scanné par le logiciel Perfect Image V.6.

#### 3. 3. 2. Analyse des données RAPD

Pour les gels PCR/RAPD, les bandes polymorphes de chaque profil sont désignées par leur présence (1) ou absence (0). Les matrices ainsi établies pour les différents marqueurs générés par différentes amorces sont analysées à laide du logiciel STATISTICA par la méthode UPGMA (méthode de la classification ascendante hiérarchique non pondérée) et l'indice de similitude de Jaccard, aboutissant à la construction d'un dendrogramme phylogénique.

### 3. 4. Somme des analyses: physiologique (dureté tégumentaire) et moléculaires

Les différentes matrices établies à partir d'une donnée physiologique (dureté tégumentaire) et des analyses moléculaires PCR/ISSR et PCR/RAPD ont été regroupées et analysées à l'aide du logiciel STATISTICA afin d'obtenir un seul arbre génétique et d'avoir une idée globale sur la classification de nos dix accessions du caroubier marocain.

## 4. RESULTAS ET DISCUSSION

### 4. 1. Extraction de l'ADN génomique du caroubier

A l'image de certaines plantes, telle que *Artemisia* et autres (MacLaughlin et *al.*, 1991), le caroubier est une légumineuse très riche en métabolites secondaires tels les polysaccharides, les polyphénols, les tannins, les protéines, etc...pouvant se lier à l'ADN rendant difficile son isolement et accessibilité aux enzymes. Raison pour laquelle nos premières intentions et efforts ont été concentrés sur la mise au point d'une technique d'extraction susceptible de donner une bonne qualité d'ADN utilisable comme matrice pour diverses réactions PCR. Pour ce faire, trois différentes techniques d'extraction de l'ADN génomique, dont certaines sont très connues, ont été testées.




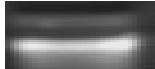



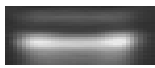


La technique de Dellaporta et *al.*, (1983) et de CTAB (Doyle et Doyle, 1987) sont très efficaces et communément utilisées pour extraire l'ADN génomique de plantes (Corniquel et *al.*, 1994; Khadari et *al.*, 1994; Dwivedi et *al.*, 2001; Li et Nelson, 2002; Mongkolporn et *al.*, 2003). Cependant, leur application sur l'organe foliaire du caroubier n'a pas été concluante et le culot obtenu était soit très visqueux et insoluble soit indemne de toute trace d'ADN.

Quant à la technique d'extraction de l'ADN génomique du palmier dattier, décrit par Ouenzar et *al.*, (1998), elle s'est avérée, à l'issue de profondes modifications, la mieux adaptée au matériel végétal du caroubier. Cette technique se caractérise de la plupart des autres méthodes d'extraction de l'ADN végétal par la non utilisation de l'azote liquide sur le matériel candidat à l'isolement de l'ADN. Son adaptation à l'organe foliaire de *Ceratonia siliqua*, serait probablement due, d'une part, à son tampon de lyse qui renferme le Polyéthylène glycol (PEG<sub>6000</sub>) et d'autre part, aux processus de longue phase de déprotéination. Le PEG est considérée par certains auteurs comme agent chimique ayant un impact positif et efficace sur la dissolution du complexe Tannins - protéines, responsable de l'ancrage de plusieurs éléments ou constituants cellulaires de certains végétaux (Jones et Mangan, 1977; Priolo et *al.*, 2000).

Ainsi l'application à la lettre du protocole de Ouenzar et *al.*, (1998) sur les feuilles fraîches du caroubier a occasionné l'obtention d'ADN de couleur brune et jaunâtre, fortement dégradée (smir sur gel test d'agarose) et non amplifiable par PCR. Par contre, les profondes modifications apportées tant au niveau du tampon de lyse (5mM EDTA, 0.05% BSA et 0.5%  $\beta$ -mercaptoéthanol), qu'au niveau des procédures d'extraction, ont permis d'avoir un ADN génomique translucide et de bonne qualité et quantité (Tableau III. 8).

Ces résultats témoignent l'efficacité et la rentabilité du protocole de Ouenzar et *al.*, (1998) modifié et adapté au caroubier. Selon le tableau (III. 8), plus de 60% d'extrait d'ADN bulk de différentes accessions, ont enregistré une valeur du rapport ADN/protéine supérieure à 1.9, d'où une très bonne qualité d'ADN. La plus grande quantité d'ADN bulk (1765ng) a été extraite des feuilles de l'accession de Aïn Safa; tandis que la plus faible (955ng) a été obtenue avec celles de Demnate.

**Tableau III. 8:** Qualité et quantité d'ADN bukl extrait à partir des feuilles de dix accessions marocaines de caroubier utilisant protocole de Ouenzar et *al.*, (1998) modifié.

Accession	Quantité de l'ADN (ng/μl)	Rapport de DO <sub>260</sub> /DO <sub>280</sub>	Qualité* de l'ADN sur gel d'agarose
Taourirt	1550	1.92	
Al Houceima	1095	1.98	
Taounate	1515	1.90	
Aïn Safa	1765	1.83	
Akchort	1635	1.90	
Demnate	955	1.70	
Ouazzane	1500	1.78	
Sidi Bou Othmane	1710	1.88	
Essaouira	1425	1.99	
Ttouan	1440	2	

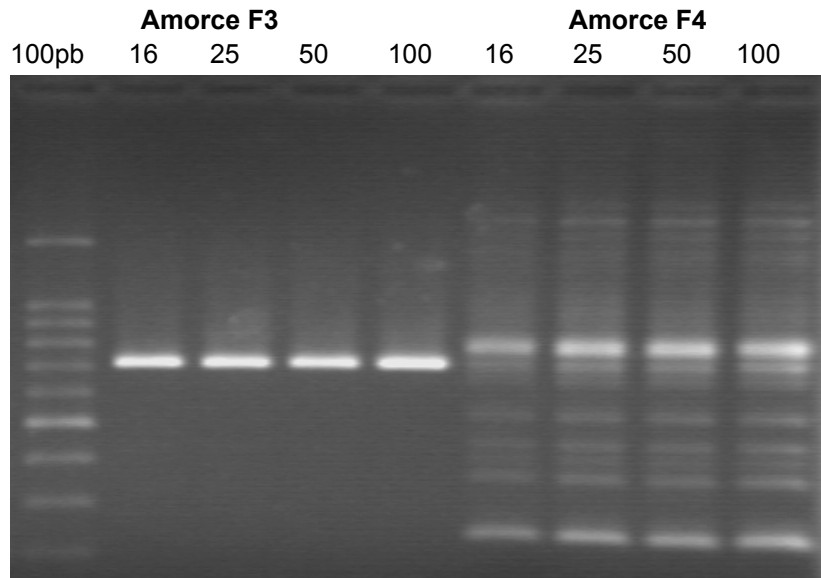
\* Qualité d'extrait de l'ADN vérifiée sur gel d'agarose (0.8%) après 3 ans de conservation à -20°C.

## 4. 2. Tests d'amplification de l'ADN *via* PCR

La qualité de l'ADN extraite joue un rôle important dans la réussite de son amplification par PCR. Certaines techniques moléculaires utilisant la PCR, telle que AFLP, exigent par rapport à d'autres telle que l'ISSR, une meilleure qualité d'ADN. Grâce au bon rendement en qualité et en quantité d'ADN obtenu, la phase de la mise au point de différentes techniques d'amplification *via* PCR, a été très réduite. En effet, nous avons pu décrire, pour la première fois, un protocole reproductible pour l'amplification de l'ADN génomique de l'espèce *Ceratonia siliqua* selon les techniques PCR/ISSR, RAPD et AFLP.

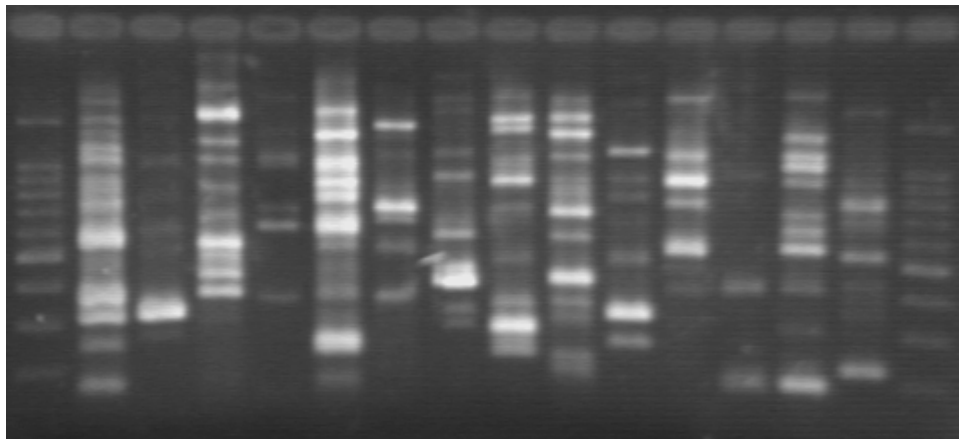
### 4. 2. 1. Mise au point et optimisation de la réaction PCR/ISSR

D'emblée, le test réalisé par l'utilisation du programme du cycle thermique de FAO/IAEA (2002), 16ng d'ADN et quatre amorces ISSR (F1, F2, F3 et F4), a été concluant. Toutefois, les bandes obtenues ont été de faible intensité nécessitant ainsi l'optimisation de certains paramètres de la réaction PCR. En effet, une bonne résolution des bandes et réponse positive de toutes les amorces testées ont été réalisées avec une quantité d'ADN allant de 50 à 100ng (Fig. III. 1).



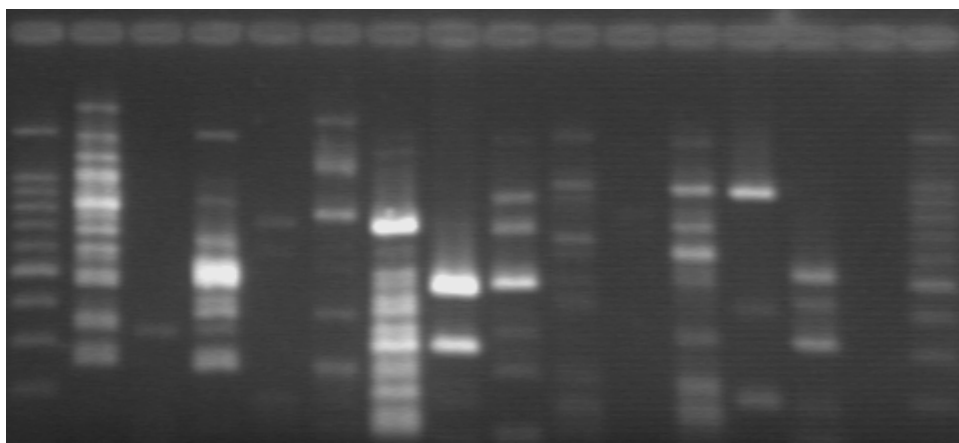
**Figure III. 1:** Effet de la quantité de l'ADN (ng) du caroubier sur la qualité du profil PCR/ISSR.

100pb F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12 F13 F14 F15 F16 F4 F2 100pb



**A**

100pb F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12 F13 F14 F15 F16 F4 F2 100pb



**B**

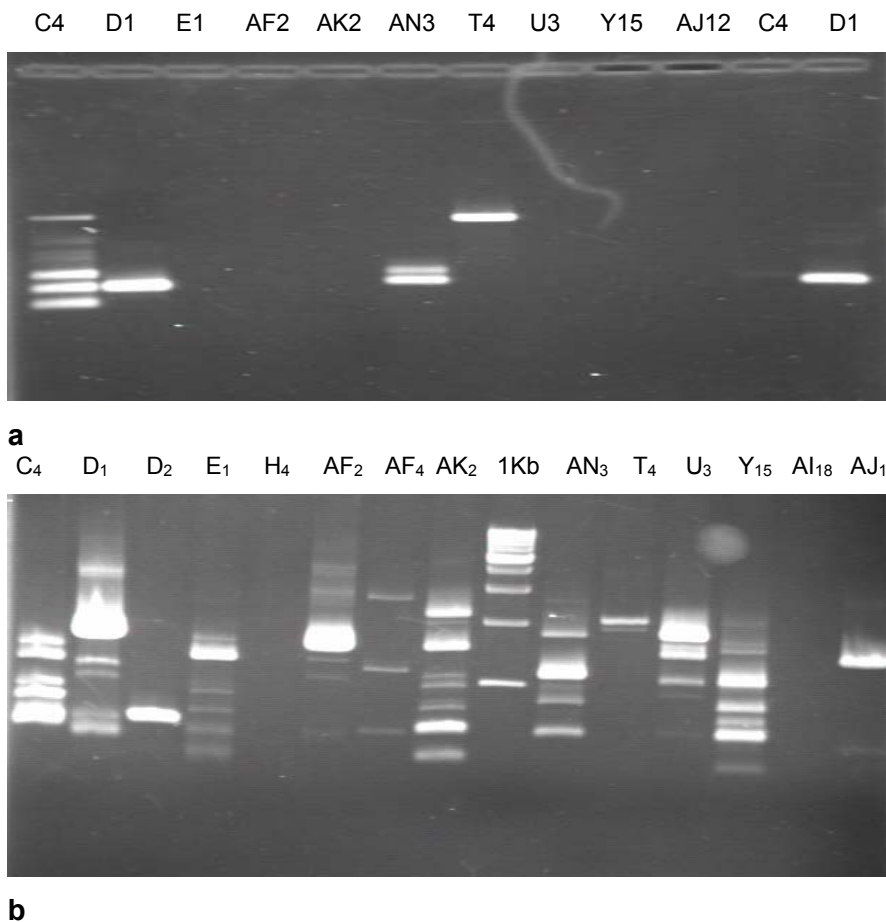
**Figure III. 2:** Emprunte génomique PRC/ISSR de *Ceratonia siliqua* L. engendrée par l'utilisation du programme thermique de FAO/IAEA (2002) (A) et de Talhinas et al., (2003) (B), de 14 amorces ISSR et 50ng d'ADN

Par ailleurs, de meilleurs profils et une bonne reproductibilité de l'amplification de l'ADN à 50ng pour les 14 amorces ISSR, ont été obtenus avec le programme thermique décrit par FAO/IAEA

(2002) (Fig. III. 2A). D'où son adaptation pour l'étude génétique ultérieure de nos différentes accessions.

#### 4. 2. 2. Mise au point et optimisation de la réaction PCR/RAPD

Parmi les six programmes thermiques de PCR testés, dans une condition optimale du mélange réactionnel de Belkadi (2003), seuls deux ont été différemment positifs. En effet, l'exécution du programme thermique décrit par Belkadi (2003) a donné un nombre réduit de bandes par amorce et beaucoup d'amorces ont répondu négativement (Fig. III. 3a). Par contre, le programme de Sanz-Cortés et *al.*, (2001) que nous avons légèrement modifié a montré une nette amélioration du rendement de l'amplification tant en nombre d'amorces positives qu'en nombre de bandes claires par amorce (Fig. III. 3b). En conséquence, ce dernier programme a été retenu pour entamer l'optimisation de certains paramètres de la réaction PCR.



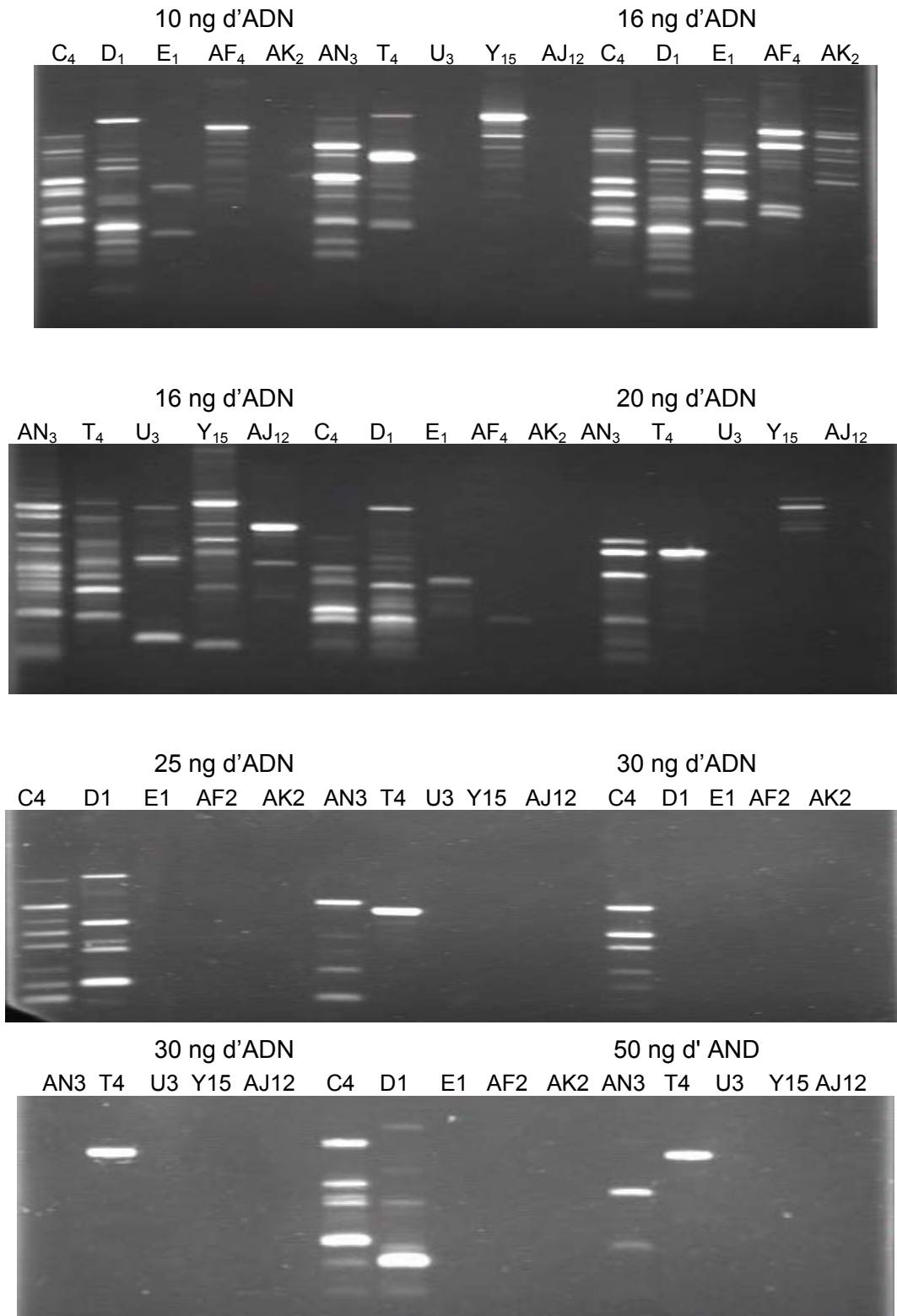
**Figure III. 3:** Emprunte génomique PRC/RAPD de *Ceratonia siliqua* L. engendrée par l'utilisation du programme thermique de Belkadi (2003) (a) et de Sanz-Cortés (2001) modifié (b)

L'optimisation de la réaction PCR a concerné, en grande partie, les paramètres liés à la quantité d'ADN et de la *Taq* ADN polymérase. En effet, l'ADN à faible quantité (5, 10 et 16ng) est suffisante pour avoir de meilleurs profils RAPD. Au delà de ces quantités, à savoir, 20, 25, 30 et 50ng, le nombre des bandes diminue significativement et l'hybridation de la plupart des amorces est inhibée (Fig. III. 4). D'où, le choix de 16ng d'ADN comme quantité optimale. Par ailleurs, les différentes unités de la *Taq* polymérase testées, ont été positives. Cependant, les profils RAPD ont

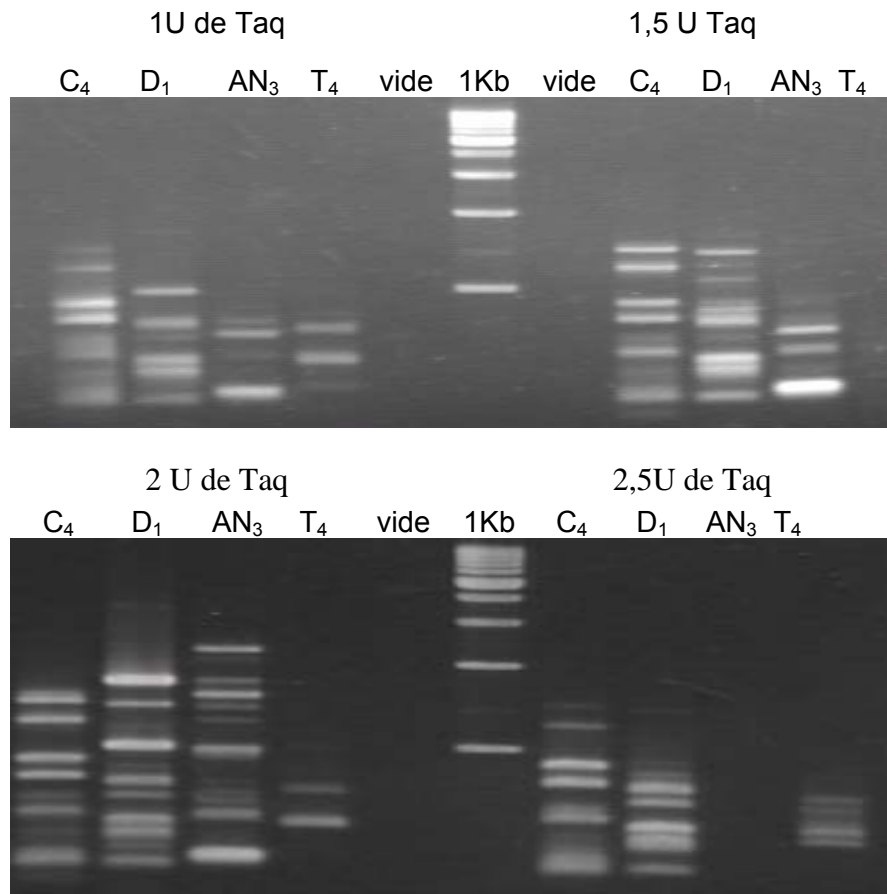


été plus clairs avec l'utilisation de 1.5 et 2U/ $\mu$ l (Fig. III. 5), incitant ainsi la rétention de 2U/ $\mu$ l de *Taq* polymérase pour la suite des expériences.

En fin, les amorces testées lors de cette phase de mise au point, se sont avérées très polymorphes. Ainsi, l'usage des marqueurs RAPD pour déterminer le polymorphisme génétiques du caroubier paraît être un très bon choix.



**Figure III. 4:** Effet de la quantité de l'ADN matrice du caroubier sur le profil PCR/RAPD.



**Figure III. 5:** Effet de l'unité de la *Taq* polymérase sur le profil PCR/RAPD de l'ADN du caoubier

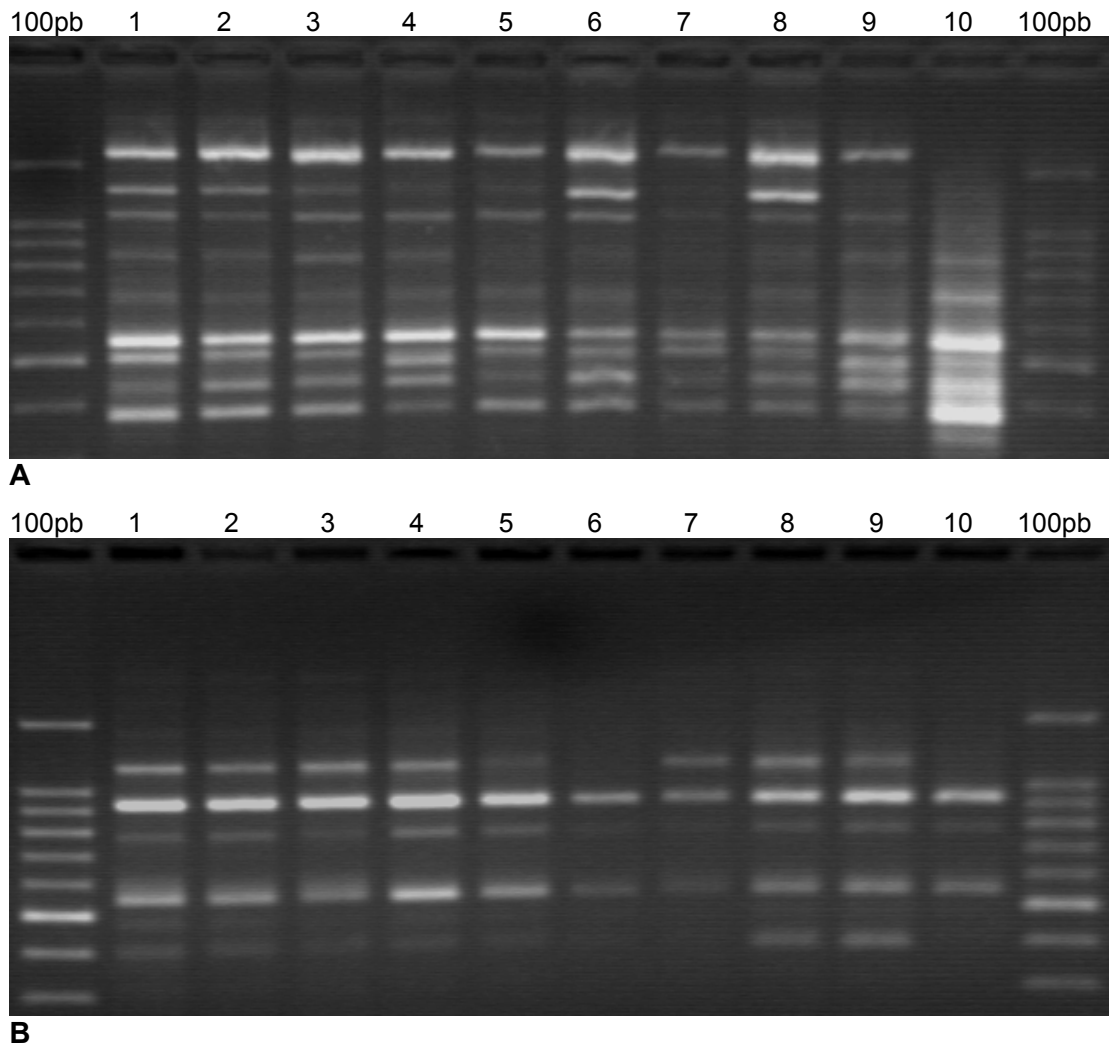
#### 4. 2. 3. Mise au point de la technique AFLP

Les tentatives entreprises afin de mettre au point un protocole d'analyse de l'ADN génomique du caroubier par *biases* des AFLP ont été soldées par succès. Respectant les étapes préliminaires (digestion, ligation et PCR1), l'utilisation de quatre combinaisons d'amorces, M-CAG/E-ACC, M-CCTA/E-ACC, M-CCTA/E-ACC, M-CTC/E-ACC, M-CAG/E-ACG, M-CCTA/E-ACG et M-CTC/E-ACG, dans la réaction PCR sélective, a permis pour chacun des couples d'amorces d'induire l'amplification de l'ADN testé. Toutefois, l'intensité et la clarté des profils AFLP obtenus ont été médiocres, ce qui nécessitait l'optimisation de certains paramètres notamment liés à la réaction PCR2 et aux procédures d'établissement et de révélation du gel d'acrylamide.

En conséquence, l'utilisation de ce protocole AFLP nouvellement élaboré pour l'analyse génétique crédible de nos dix accessions du caroubier, a été momentanément ajournée, en attendant la fin de l'optimisations et l'obtention de meilleurs profils des amplifias.

#### 4. 3. Caractérisation moléculaire des accessions du caroubier *via* ISSR

L'utilisation de différents protocoles mis au point ainsi que 16 amorces ISSR, a permis l'amplification de l'ADN bulk de chacune de dix accessions du caroubier marocain. En effet, chaque amorce a montré des profils génomiques lisibles et reproductibles. Les figures (III. 6 A et B), témoignent la clarté des marqueurs et la diversité révélée par les amorces F7 et F15.



**B**  
**Figure III. 6.** Profils génomiques ISSR générés par amorce F7 (A) et F15 (B) sur l'ADN bulk de dix accessions marocaines de *Ceratonia siliqua* L., Taourirt (1), Al Houceima (2), Taounate (3), Aïn Safa (4), Akchort (5), Demnate (6), Ouazzane (7), Sidi Bou Othmane (8), Essaouira (9) et Tétouan (10).

Selon plusieurs auteurs, la technique ISSR est dotée d'une meilleure qualité de ses profils qui émane surtout de la longueur de séquence de ses amorces, impliquant une température d'hybridation élevée et engendrant ainsi, par rapport aux techniques RAPD et RFLP, de bandes épaisses et reproductibles (Zietkiewicz et *al.*, 1994; Culley et Wolfe, 2000; Oh et *al.*, 2000).

**Tableau III. 9:** Liste des 16 amorces ISSR utilisées, leur séquence, type de répétition (TR), température d'hybridation (TH), taille des bandes, nombre de marqueurs polymorphes (P) et monomorphes (M) et diversité (D)

Nom	Séquence (5'-3')	TR	TH (°C)	Taille des bandes (rangée en pb)	Polymorphisme (%)	Nombre des bandes		
						P	M	PIC
F1	CACACACACACAAT	tri	46.76	1808 – 1860	100	2		0.59
F2	CACACACACACAGC	tri	52.61	213 – 1696	73.33	11	4	0.72
F3	CACACACACACAAG	tri	49.61	707	0	0	1	0.00
F4	AGCAGCAGCAGCCT	tri	51.67	227 – 1736	43.75	7	9	0.32
F5	[AC] <sub>8</sub> CA	di	57.62	344 – 1273	75	9	3	0.50
F6	[AC] <sub>8</sub> CG	di	59.9	173 – 351	60	3	2	0.59
F7	[AC] <sub>8</sub> CT	di	57.62	355 – 1712	92.85	13	1	0.65
F8	[AG] <sub>8</sub> CC	di	59.9	277 – 2636	78.57	11	3	0.51
F9	[AG] <sub>8</sub> CG	di	59.9	288 – 1718	63.63	7	4	0.46
F10	[CA] <sub>8</sub> AG	di	57.62	219 – 1537	81.81	9	2	0.73
F11	[CA] <sub>8</sub> AC	di	57.62	429 – 1278	75	6	2	0.51
F12	[GA] <sub>8</sub> CC	di	59.9	251 – 1532	89.47	17	2	0.70
F13	[GA] <sub>8</sub> CG	di	59.9	257 – 2048	78.57	11	3	0.61
F14	[GA] <sub>8</sub> CT	di	57.62	295 – 2307	72.72	8	3	0.61
F15	[GT] <sub>8</sub> CC	di	59.9	422 – 1486	90.90	10	1	0.69
F16	[GT] <sub>8</sub> CG	di	59.9	208 – 1159	100	12	0	0.93
<b>M*: 73.47</b>						<b>136</b>	<b>40</b>	<b>0.57±0.205</b>

M\*: moyenne par amorce

#### 4. 3. 1. Caractérisation des amorces ISSR

Toutes les amorces utilisées ont généré des profils polymorphes avec un indice de diversité génétique variable et significatif, excepté l'amorce F3 (Tableau III. 9). En effet, l'étude menée selon la procédure de Botstein et *al.*, (1980) a confirmé la variabilité génétique de ces 15 amorces utilisées dans toutes accessions confondues. La différence dans l'indice de diversité révèle un degré significatif du polymorphisme. Plus sa valeur tend vers 1, plus l'amorce en question est polymorphe et vis versa. Ainsi, l'indice de diversité est nul chez l'amorce F3 qui possède un seul marqueur monomorphe et maximum (0.93) chez l'amorce F16 qui donné 100% de bandes polymorphes. Toutefois, la valeur moyenne de l'indice de diversité ( $0.57 \pm 0.205$ ) obtenue pour l'ensemble des amorces consolide et justifie le choix d'utiliser ces 16 amorces pour analyser nos dix accessions du caroubier. Par ailleurs, la valeur moyenne de diversité génétiques obtenue par ces amorces, a été très proche de celle ( $0.5 \pm 0.10$ ) obtenue par Nagaraju et *al.*, (2002), mais très supérieur de celle ( $0.1618 \pm 0.1903$ ) rapportée par Sica et *al.*, (2005).

L'obtention d'un nombre élevé d'amorces ISSR polymorphes est d'une utilité importance. Elle permet d'augmenter la fiabilité des interprétations des résultats, surtout si les profils générés sont reproductibles. Ainsi, le nombre des amorces polymorphes utilisées pour analyser diverses espèces de plantes diffère d'un auteur à l'autre. Il a été de 7 (Pradeep et *al.*, 2005), de 12

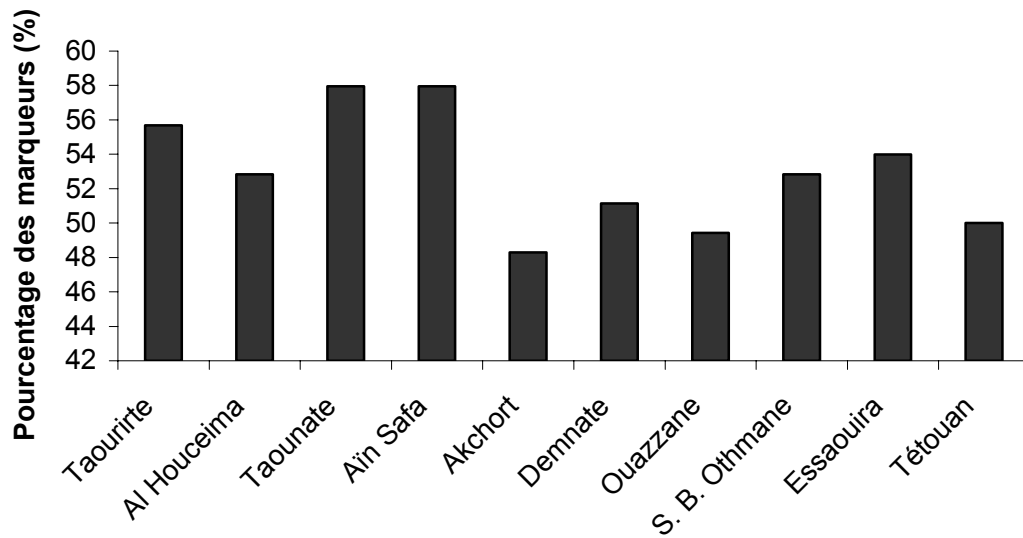
(Nagaraju et al., 2002), de 23 (Sica et al., 2005), de 30 (Talhinhas et al., 2003) ou de 41 (Yang et al., 1996).

#### 4. 3. 2. Caractérisation des marqueurs ISSR

Au total, 176 fragments d'ADN amplifiés ont été produits, chez les dix accessions du caroubier, par les 16 amorces utilisées. 136 (77.27%) de ces fragments se sont avérés polymorphes et 40 (22.73%) monomorphes (Tableau III. 9). Le nombre de marqueurs révélé par les amorces oscille entre 1 et 19, avec une moyenne de 11 par amorce. Par contre, le nombre moyen des bandes polymorphes par amorce est de 8.5, avec 17 pour l'amorce F12. Ce nombre moyen témoigne du niveau élevé de polymorphisme au sein des accessions révélé par les amorces sélectionnées.

En générale, le nombre de marqueurs ISSR générés, est positivement corrélé avec le nombre d'amorces utilisées. Cependant, ce nombre peut être beaucoup influencé par l'espèce végétale analysée et par la nature du gel de migration utilisé (Nagaraju et al., 2002; Wiesner et Wiesnerová, 2003). En effet, par rapport à *Ceratonia siliqua*, le pourcentage de bandes polymorphes révélées par les amorces ISSR, a été très élevé chez *Asparagus acutifolius* L. (100%) (Sica et al., 2005), *Lupinus* spp. (99%) (Talhinhas et al., 2003) et chez *Oryza sativa* (80.9%) (Nagaraju et al., 2002), mais inférieur chez *Bombyx mori* (64%) (Pradeep et al., 2005).

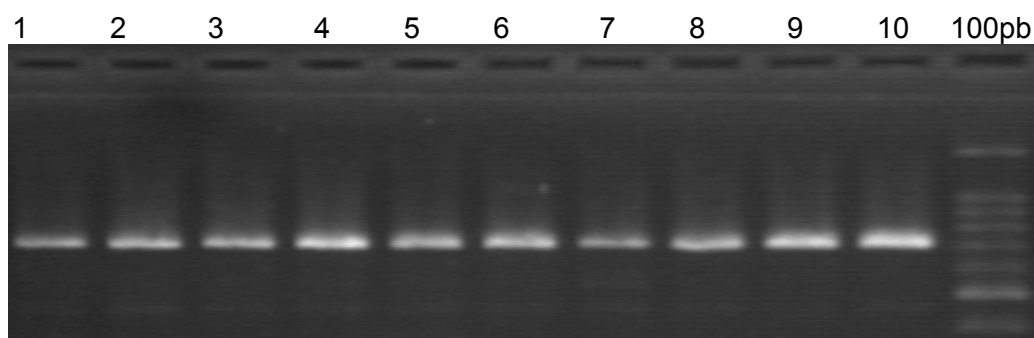
Par ailleurs, la comparaison de la productivité de deux groupes d'amorces utilisées sur le caroubier, a montré que les amorces à répétition di-nucléotides sont plus performantes et polymorphes par rapport aux amorces à répétition tri-nucléotides. Pour les 176 marqueurs obtenus, 142 (84.50%) ont été produits par les amorces du premier type avec en moyenne 11.83 bandes par amorce ; tandis que les amorces du second type n'ont engendré que 34 bandes (19.32%) avec en moyenne 8.5. La taille des bandes générées par ces 16 amorces chez l'espèce de *Ceratonia siliqua* L. est variable. Elle oscille entre 173 (cas de F6) et 2636pb (cas de F8) (Tableau III. 9). Selon Zietkiewicz et al., (1994), la technique ISSR génère de fragments d'ADN amplifiés dont la taille varie de 200 à 2500pb. Par ailleurs, elle a été de 150 à 1100pb (Sica et al., 2005), de 140 à 1500pb (Nagaraju et al., 2002) ou de 250 à 2800pb (Pradeep et al., 2005).



**Figure III. 7:** Pourcentage des marqueurs ISSR polymorphes présents dans chaque accession

Selon la figure (III. 7), l'étude du degré de variation des marqueurs pour chacune des dix accessions a révélé des différences significatives. En effet, les accessions de Taounate et Aïn Safa ont montré un degré le plus élevé de variation avec 57.95% de bandes polymorphes. Tandis que les accessions de Ouazzane et Akchort ont présenté un taux modéré de variation avec respectivement 49.43% et 48.3% des bandes polymorphes.

Par ailleurs, cette étude nous a permis de déceler une amorce monomorphe (F3) (Fig. III. 8) et 40 marqueurs monomorphes appartenant aux 14 différentes amorces (Tableau III. 10). Le monomorphisme révélé par ces marqueurs est d'une grande importance moléculaire; d'autant plus qu'ils peuvent être proposés et exploités comme étant des marqueurs ISSR liés au caroubier. En effet, leur présence chez toutes accessions confondues peut servir comme une base d'outil pour cibler divers gènes voire ceux liés au sexe.



**Figure III. 8:** Marqueur monomorphe généré par l'amorce F3 chez toutes les dix accessions du caroubier

**Tableau III. 10** : Marqueurs ISSR liés aux différentes accessions de *Ceratonia siliqua* L. révélés par 14 amorces

<b>Amorce</b>	<b>Marqueur (taille en pb)</b>
F2	1512, 1238, 789, 683
F3	707
F4	1736, 971, 876, 812, 713, 614, 539, 453, 396
F5	1157, 606, 458
F6	351, 203
F7	576
F8	2127, 1174, 793
F9	1410, 926, 829, 655
F10	756, 348
F11	481, 429
F12	1532, 1391
F13	1784, 802, 489
F14	1284, 1027, 295
F15	997

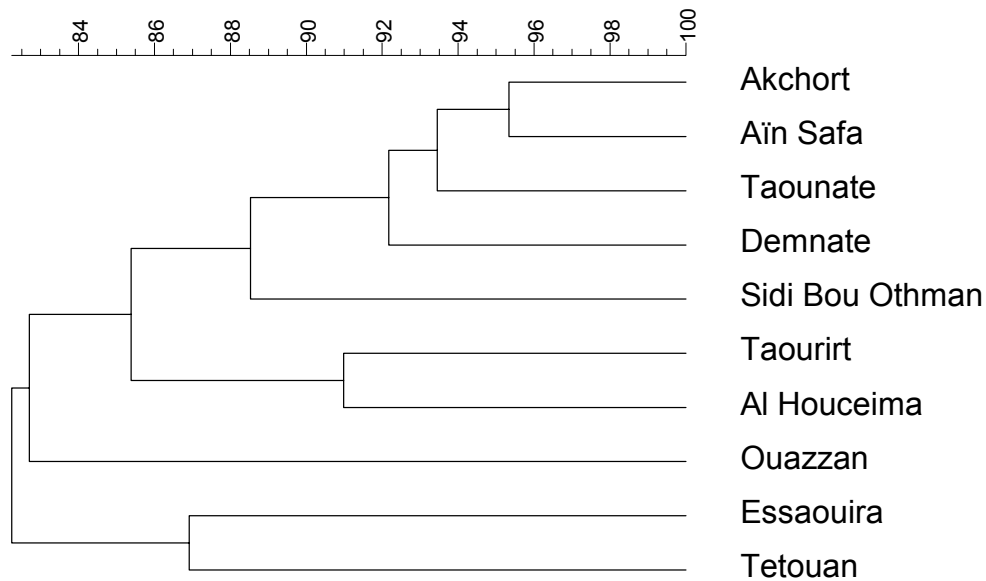
#### 4. 3. 3. Classification des accessions selon ISSR

L'analyse des différents gels et les 176 bandes utiles par le logiciel GelCompar II, a abouti à la construction d'un dendrogramme (Fig. III. 9), qui illustre parfaitement les relations génétiques existant entre les dix accessions du caroubier marocain.

D'emblée, nous avons constaté qu'à 86% et 90% de ressemblance, ces accessions se distinguent et se classent en sous groupes. Cependant, à 80% de similarité correspondant à un pourcentage de désaccord de 20%, ces dix accessions n'ont pu être différenciés par ces marqueurs.

En effet, à 86% de similarité, on a distingué trois clusters et un linéage indépendant. Le premier cluster incluant 50% des accessions est composée de celles de Akchort, Aïn Safa, Taouate, Demnate et Sidi Bou Othmane. Le second cluster comprend deux accessions, Taourirte et Al Houceima. Le troisième cluster est aussi constitué de deux accessions, Essaouira et Tétouan. Tandis que l'accession de Ouazzane constitue une seule ligne et montre une tendance à l'individualisation.

Toute fois, à 90% d'identité, le nombre de cluster est réduit à 2 et le degré de diversité est large avec l'obtention de quatre linéages indépendants composés individuellement par l'accession de Sidi Bou Othmane, de Ouazzane, de Essaouira et de Tétouan.



**Figure III. 9:** Dendrogramme généré par l'analyse des marqueurs ISSR *via* UPGMA

La différenciation des dix accessions du caroubier marocain sur la base des résultats moléculaires ISSR ne reflète pas les résultats basés sur les critères morfo-agronomiques liés aux fruits (Chapitre II). Ce type de réarrangement ou de discordance entre les phylogénies établies par les différents marqueurs moléculaires et phénotypiques est très courant. Il a été constaté par certains auteurs, en particulier chez les crucifères (Thormann et *al.*, 1994), *Sorghum bicolor* L. (Yang et *al.*, 1996), *Triticum urartu* (Castagna et *al.*, 1997), *Oryza sativa* (Nagaraju et *al.*, 2002) et *Lupinus* spp. (Talhinhas et *al.*, 2003).

La classification des accessions marocaines de caroubier par le biais des marqueurs ISSR a été significative. Car, en dehors des caractérisations agro-morphologiques communément utilisés pour la différenciation, celles basées sur les analyses enzymatiques (isozymes), n'ont pu révéler chez cette espèce que de très faible niveau du polymorphisme entre les cultivars de même origine (Barracosa et *al.*, 1996) ou de différentes origines (Tous et *al.*, 1992; Battle et *al.*, 1996). Cependant, l'analyse cytologique de la taille du chromosome du caroubier a révélé une large variabilité intra-spécifique par la présence d'individus diploïdes, triploïdes et tétraploïdes (Bureš et *al.*, 2004).

#### 4. 4. Caractérisation moléculaire des accessions du caroubier *via* RAPD

##### 4. 4. 1. Choix des amorces

Un ensemble de 67 amorces aléatoires a été testé sur les échantillons d'ADN bulk de cinq accessions: Taourirt, Al Houceima, Taounate, Aïn Safa et Akchort. 15 de ces amorces (22,4%) ont été immédiatement exclues de cette étude car pour certaines, il y a absence totale d'amplification et pour d'autres les profils obtenus sont mal définis et difficilement interprétables. Les 52 amorces restantes (77,6%), se sont avérées reproductibles présentant des profils lisibles, d'où leur sélection pour la suite de cette étude (Tableau III. 11). Les figures (III. 10 a et b) illustrent l'exemple de

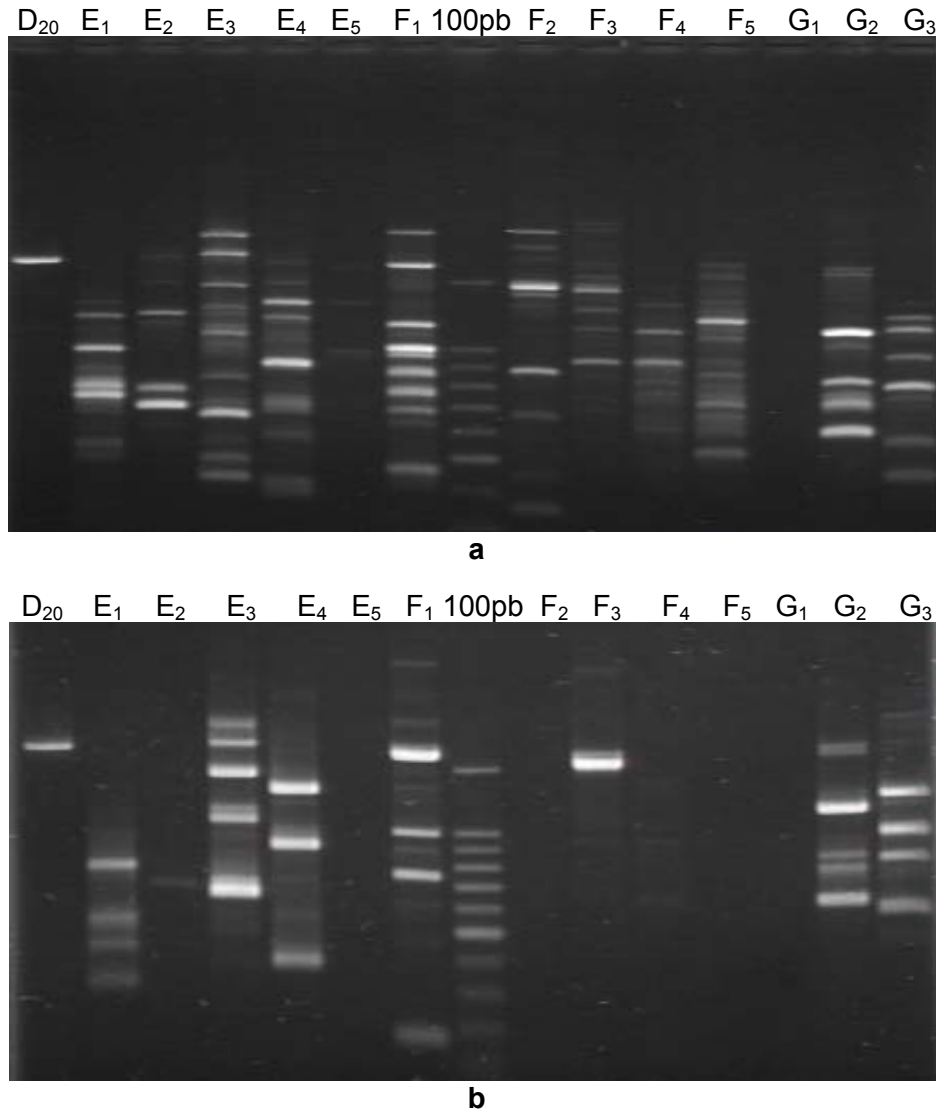


profils génomiques RAPD de l'accension de Taounate et Akchort générés par 14 amorces (OP E<sub>5</sub> et G<sub>1</sub> sont exclues de la sélection).

Le pourcentage d'amorces utiles engendrant des profils interprétables pour l'analyse de la diversité génétique, semble être en fonction de l'espèce et des conditions expérimentales. En effet, des pourcentages variés ont été obtenus par différents auteurs: 81,96% d'amorces chez des germplasmes de thé '*Camellia sinensis*' (Chen et Yamaguchi, 2005), 50% chez des cultivars d'olivier (Sanz-Cortés et *al.*, 2001), 36,6% chez les *Aegilops* (Belkadi, 2003) et 14,1% chez des populations de figuier (Khadari et *al.*, 1994) générant un polymorphisme interprétable.

La technique RAPD-PCR, caractérisée par la dominance de ses marqueurs, se distingue par la facilité et la rapidité dans sa mise en œuvre *in vitro* et par son coût très réduit. Cependant et différemment à l'ISSR, elle utilise des amorces de courte séquence (Williams et *al.*, 1990) rendant la réaction PCR très sensibles aux conditions d'amplifications, d'où le problème de la reproductibilité. De ce fait, certaines études ont révélé que les résultats reproductibles de cette technique ne sont obtenus que dans le cas où ces conditions sont optimales et strictement les mêmes pour les différentes réactions (Hadrys et *al.*, 1992; Williams et *al.*, 1993; Khadari et *al.*, 1994). En effet, les amorces utilisées dans notre cas sont le résultat d'une sélection basée sur la qualité de leurs produits d'amplifications obtenus dans des conditions optimisées. Ainsi, l'obtention d'un nombre élevé d'amorces positives (77,6%) sur l'amplification de l'ADN bulk du caroubier a donné, comparativement au nombre réduit des amorces ISSR (16), une considération particulière à cette étude génétique.

Par ailleurs, nous avons constaté que les 52 amorces sélectionnées sont polymorphes (Tableau III. 11). Certaines d'entre elles ont montré une large affinité pour l'ensemble des accessions et d'autres ont été restreintes et spécifiques à une accession donnée. En effet, nous avons pu identifié 10 amorces polymorphes OP (C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub>, E<sub>3</sub>, G<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, I<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>, T<sub>4</sub> et T<sub>6</sub>) qui ont engendré l'amplification de l'ADN bulk de toutes les accessions. Par conséquent, ces amorces peuvent être proposées voire exploitées pour diverses études génétiques portant sur l'espèce *Ceratonia siliqua*. Par contre, 10 autres amorces OP (C<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>, F<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, R<sub>11</sub>, S<sub>5</sub>, S<sub>6</sub>, S<sub>18</sub> et U<sub>3</sub>) ont été individuellement spécifiques à une accession bien déterminée.



**Figure III. 10:** Gels modèles pour la sélection des amorces utiles, utilisant l'ADN bulk de l'accèsion de Taounate (a) et de Akchort (b). Amorces testées sont: OP(D<sub>20</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub>, E<sub>5</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> et G<sub>3</sub>).

#### 4. 4. 2. Caractérisation des marqueurs RAPD

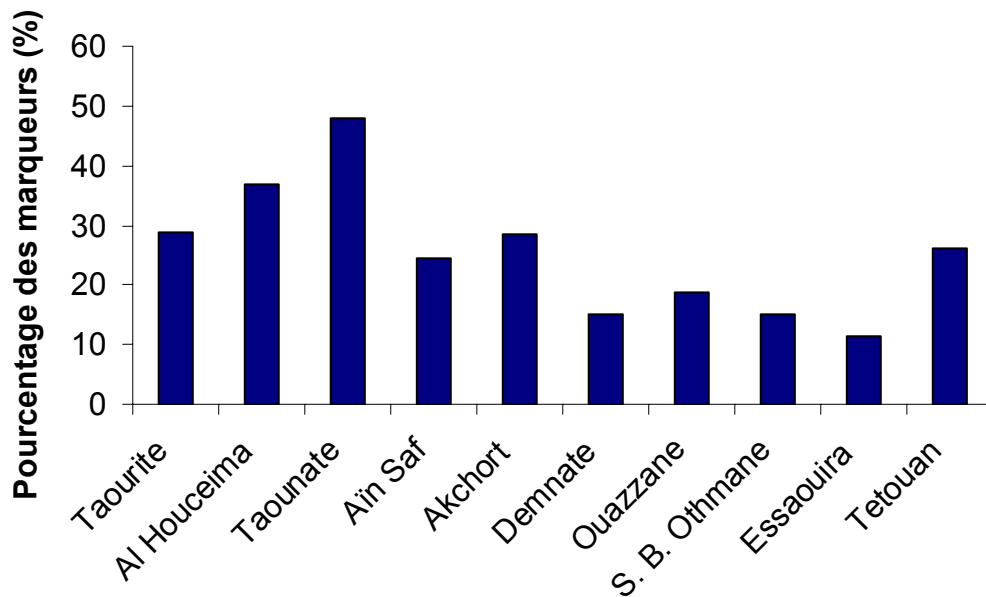
L'amplification PCR, réussie avec l'ensemble de 52 amorces retenues, a permis d'identifier 374 marqueurs dont la quasi totalité (99.73%) est polymorphe. Seules sont prises en compte dans cette étude, les bandes utiles dont la taille varie de 0.1 à 2kb. Ainsi, le nombre de fragments polymorphes révélés par amorce oscille entre 1 et 18 avec une moyenne de 7.17 fragments par amorce (Tableau III. 11).

La figure (III. 11), illustre le degré de variation des marqueurs pour chaque accèsion. Bien que nous ayons utilisé plus d'amorces, le pourcentage des marqueurs RAPD présents dans chaque accèsion est, par rapport à celui de ISSR, très moyen. L'accèsion de Taounate a révélé le niveau le plus élevé de variation avec 47.59% de bandes polymorphes, suivi d'Al Houceima (36,63%) puis de Taourirt (28,60%). Tandis que les trois accèsions Demnate, Sidi Bou Othmane et Essaouira ont présenté un faible niveau de variation.

**Tableau III. 11:** Liste des 52 amorces RAPD utilisées, leur séquence, le nombre de bandes produites (N. b. p), la taille des bandes et le nombre d'accessions amplifiées (N. ac. am.)

Code (OP)	Séquences (5'— 3')	N. b. p	Taille de bandes (ng)	N. ac. am	Code (OP)	Séquences (5'— 3')	N. b. p	Taille de bandes (ng)	N. ac. am
B <sub>10</sub>	CTGCTGGGAC	10	100-1230	4	G <sub>5</sub>	CTGAGACGGA	5	680-1080	4
C <sub>1</sub>	TTCGAGCCAG	18	100-1400	10	H <sub>2</sub>	TCGGACGTGA	1	830	1
C <sub>2</sub>	GTGAGGCGTC	1	780	1	H <sub>3</sub>	AGACGTCCAC	8	440-1230	10
C <sub>3</sub>	GGGGGTCTTT	14	325-1285	6	H <sub>4</sub>	GGAAGTCGCC	11	335-1170	9
C <sub>4</sub>	CCGCATCTAC	17	190-1260	10	H <sub>5</sub>	AGTCGTCCCC	13	320-1250	10
C <sub>5</sub>	GATGACCGCC	8	430-970	6	I <sub>2</sub>	GGAGGAGAGG	6	370-1240	9
C <sub>6</sub>	GAACGGACTC	7	400-1220	4	I <sub>3</sub>	CAGAAGCCCA	10	540-1120	10
C <sub>7</sub>	GTCCCGACGA	4	510-930	1	I <sub>4</sub>	CCGCCTAGTC	3	650-1160	3
D <sub>1</sub>	ACCGCGAAGG	15	255-1230	8	M <sub>1</sub>	TCTGTTCCCC	1	770	1
D <sub>2</sub>	GTGCGCGTCA	9	425-1300	7	R <sub>1</sub>	TGCGGGTCCT	11	130-975	10
D <sub>3</sub>	GTGCGCGTCA	11	240-1230	8	R <sub>2</sub>	TGAGCACGAG	2	510-610	3
D <sub>4</sub>	TCTGGTGAGG	7	490-1300	2	R <sub>11</sub>	GTAGCCGTCT	2	800-1130	1
D <sub>5</sub>	TGAGCGGACA	5	400-1000	8	S <sub>3</sub>	TTTGGGGCCT	2	930-1020	4
D <sub>15</sub>	CATCCGTGCT	5	540-1080	3	S <sub>4</sub>	TCCTGGTCCC	4	750-970	8
D <sub>20</sub>	ACCCGGTCAC	1	1310	2	S <sub>5</sub>	ACCGTTCCAG	2	1130-1270	1
E <sub>1</sub>	CCCAAGGTCC	10	480-1220	6	S <sub>6</sub>	AAAGGGGTCC	1	700	1
E <sub>2</sub>	GGTGCGGGAA	7	370-1240	4	S <sub>7</sub>	GAGTCACCAG	1	465	2
E <sub>3</sub>	CCAGATGCAC	12	330-1240	10	S <sub>8</sub>	TCTGGACGCT	5	420-1150	3
E <sub>4</sub>	GTGACATGCC	8	300-1155	9	S <sub>18</sub>	CTGGCGAACT	2	750-2000	1
F <sub>1</sub>	ACGGATCCTG	10	400-1260	8	T <sub>1</sub>	GGGCCACTCA	10	230-1270	9
F <sub>2</sub>	GAGGATCCCT	3	670-1050	1	T <sub>4</sub>	GGGTTTGGCA	11	420-1420	10
F <sub>3</sub>	CCTGATCACC	6	560-1280	4	T <sub>5</sub>	AACGGCGACA	7	490-1270	5
F <sub>4</sub>	GGTGATCAGG	5	590-1280	2	T <sub>6</sub>	AGGACTGCCA	15	160-1255	10
F <sub>5</sub>	CCGAATTCCC	7	490-1280	3	T <sub>16</sub>	GGTGAACGCT	7	390-1255	7
G <sub>2</sub>	GGCACTGAGG	10	370-1065	10	U <sub>3</sub>	CTATGCCGAC	2	650-840	1
G <sub>3</sub>	GAGCCCTCCA	11	410-1330	9	Y <sub>15</sub>	AGTCGCCCTT	11	220-1360	8

Ce nombre moyen de marqueurs RAPD obtenu chez le caroubier est largement supérieur à celui révélé chez le figuier (1.5) (Khadari et al., 1994), le palmier dattier (1.9) (Sedra et al., 1998), l'olivier (2.6) (Belaj et al., 2001), l'arachide (4.51) (Dwivedi et al., 2001) et chez le soja (5.5) (Xu et Gai, 2003). En revanche, il est inférieur à celui obtenu avec le pommier (19) (Kazan et al., 1993) et le blé (29) (Belkadi, 2003). En conséquence, ce nombre moyen témoigne du niveau élevé du polymorphisme au sein des accessions marocaines de caroubier, révélé par les amorces choisies.



**Figure III. 11:** Pourcentage des marqueurs RAPD polymorphes présents dans chaque accession

#### 4. 4. 3. Classification selon RAPD

L'exploitation d'un nombre élevé (373) de marqueurs polymorphes RAPD a permis significativement la caractérisation génétique de l'ensemble des accessions étudiées. En effet, le dendrogramme engendré par l'analyse statistique basée sur la présence ou l'absence de marqueur, a montré une large diversité moléculaire inter-accession (Fig. III. 12).

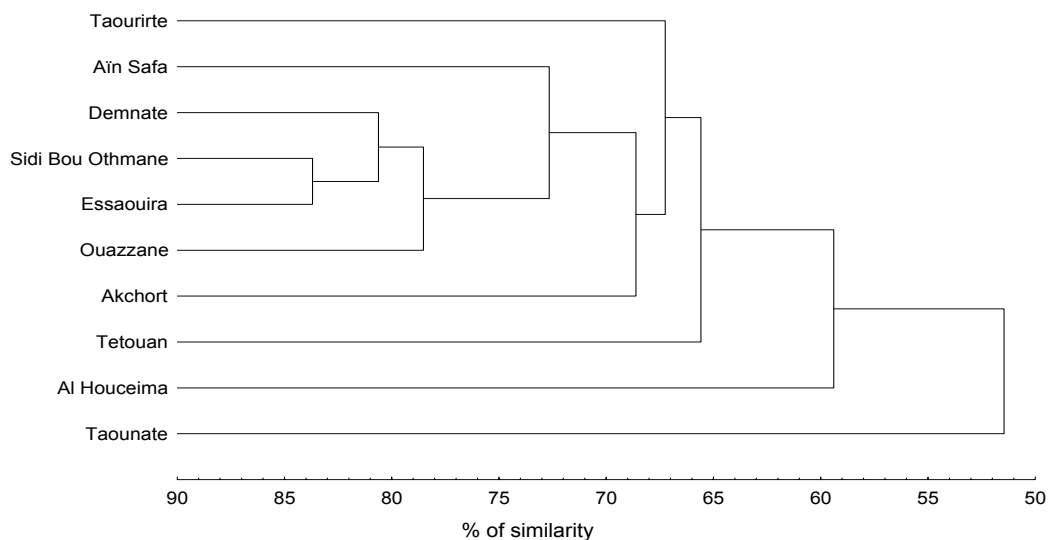
Contrairement aux marqueurs ISSR qui n'ont pas pu différencier ces accessions au-delà de 20% de désaccord, ceux de la RAPD ont pu les distinguer même à un pourcentage de désaccord supérieur à 45%. Ainsi:

- à un niveau de 85% de similarité, chaque accession constitue un alignement bien distinct, et donc différente génétiquement l'une de l'autre.
- à 80% de similitude, nous avons identifié un seul cluster, composé de trois accessions Demnate, Sidi Bou Othmane et Essaouira, et sept autres linéages d'accessions nettement individualisées et séparées l'une de l'autre.
- à 70% d'identité, le degré de diversité chute légèrement et on obtient un seul cluster incluant cinq accessions, Aïn Safa, Demnate, sidi Bou Othmane, Essaouira et Ouazzane, et cinq linéages composés séparément des accessions de Taourite, Akchort, Tétouan, Al Houceima et Taounate.

La nouvelle classification des accessions de caroubier marocain sur la base des marqueurs RAPD est plus au moins en accord avec celles établies par les deux précédents approches ISSR et phénotypique. Cependant, les désaccords observés résideraient essentiellement dans la tendance de certaines accessions à s'individualiser pour constituer des accessions singulières et génétiquement éloignées.

La diversité génétique révélée au sein de nos dix accessions par les marqueurs RAPD, laisse supposer que ces derniers constitueraient le moyen le mieux adapté à l'étude du polymorphisme

génétique de l'espèce *Ceratonia siliqua*. Selon plusieurs auteurs, les avantages pratiques liés à ces marqueurs sont énormes. Ils ont généralement une transmission mendélienne (Hunt et Page, 1992), sont utilisés comme marqueurs d'introgression (Arnold et al., 1991) ou, dans certain cas, pour identifier les cultivars de germplasmes commerciaux et protéger la paternité de plantes (Welsh et al., 1991; Hadrys et al., 1992; Baird et al., 1996). Par ailleurs, ils ont été utilisés dans la construction des cartes de liaison génétique (Klein-Lankhorth et al., 1991; Reiter et al., 1992). Selon Khadari et al., (1994), la technique RAPD non limitée par le nombre d'amorces, permet d'identifier fréquemment le polymorphisme qui existe entre populations d'organismes végétaux ou individus de la même population. En effet, elle a été le moyen de base pour étudier la variabilité génétique des collections de *Brassica* spp. (Geraci et al., 2001), de *Coffea* spp. (Lashermes et al., 1993), de *Pistacia vera* (Hormaza et al., 1994), d'*Arachis hypogea* (Dwivedi et al., 2001), *Olea europea* (Sanz-Cortés et al., 2001; Khadari et al., 2003), de *Glycine* spp. (Xu et Gai, 2003) et de *Camellia sinensis* (Chen et Yamaguchi, 2005).



**Figure III. 12:** Dendrogramme généré par UPGMA de l'analyse par RAPD chez l'ensemble des accessions de caroubier étudiées.

#### 4. 5. Classification générale des accessions du caroubier

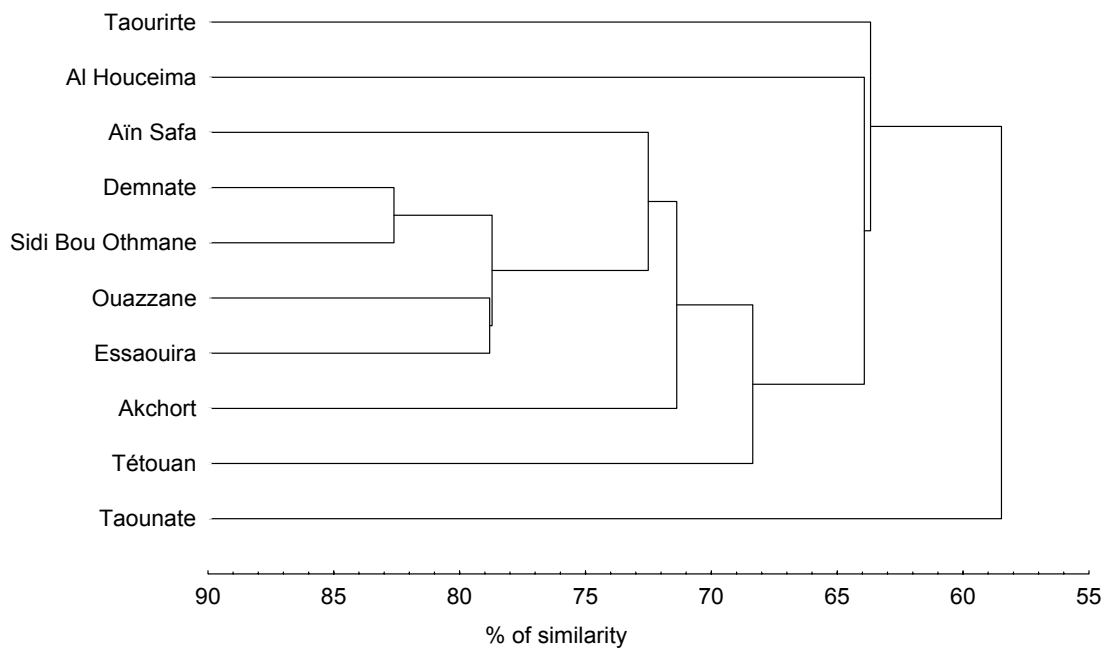
Le nouveau réarrangement de nos dix accessions, utilisant tout marqueur confondu RAPD, ISSR et phénotypique (dureté tégumentaire), a donné lieu à la construction d'un dendrogramme génétique globale (Fig. III. 13). Ce dernier est très proche de celui obtenu uniquement avec les marqueurs RAPD. Cependant, de légères différences ont été constatées. En effet,

- à environ 80% de similitude, on a révélé un large degré de diversité génétique inter-accession. Ainsi, on a obtenu un cluster composé de quatre accessions Demnate, Sidi Bou Othmane, Ouazzane et Essaouira. Les six autres provenances sont bien individualisées en lignées.

- à 70% de ressemblance, on a identifié un grand cluster constitué de six accessions incluant en plus de celle de Akchort et de Aïn Safa les quatre accessions précédemment regroupées par les marqueurs RAPD, les quatre autres accessions tendent à s'individualiser d'avantage.

Cette nouvelle classification générale semble être plus au moins en désaccord avec l'origine géographique des accessions. En effet, le grand cluster identifié à 70% de similarité renferme des accessions dont les aires de répartition appartiennent aux zones continentales Sud (Demnate, Sidi Bou Othmane), aux zones continentales Nord (Akchort, Ouazzane, Aïn Safa) et à la côte atlantique (Essaouira) du Maroc. Par ailleurs, les deux accessions, Taounate et Taouirt situées également à l'exposition continentale de région Nord, se sont distinguées en s'éloignant de ce cluster et de deux dernières accessions Tétouan et Al Houceima qui sont séparément localisées sur l'exposition nord du pays et dans les zones côtières méditerranéennes.

L'individualisation génétique, à 70% d'identité, de ces quatre dernières accessions qui sont géographiquement peu proche, nous laisse penser que ces localités seraient dotées des populations naturelles ou spontanées du caroubier. En effet, selon Ouchkif (1988a), les populations spontanées du caroubier sont principalement concentrées dans les régions nord du Maroc. Toutefois, le rapprochement génétique des six accessions (Demnate, Sidi Bou Othmane, Essaouira, Akchort, Ouazzane et Aïn Safa) qui sont géographiquement éloigné pourrait être expliqué par le phénomène de dissémination soit à partir d'une population naturelle autochtone ou soit d'une source étrangère.



**Figure III. 13:** Dendrogramme conçu par UPGMA de l'analyse de somme des marqueurs Phénotypiques, ISSR et RAPD générés sur les accessions de caroubier.

Par ailleurs, l'éloignement génétique de l'accession de Taounate, par rapport aux autres, révélé par analyse RAPD-PCR, confirmé par cette étude, et auparavant distingué morphologiquement par la «mauvaise» qualité de ses fruits (gousses courbées, non charnues et fort rendement en graines), laisse suggérer que cette localité abriterait que de caroubier spontané probablement typique au Maroc.

# *Chapitre IV: Revue bibliographique sur les bactéries endophytes*

## **1. RHIZOSPHERE ET BACTÉRIES RHIZOSPHÉRIQUES**

### **1.1. La rhizosphère**

La rhizosphère est la région du sol directement influencée par les racines. On distingue en général le rhizoplan qui est l'interface racine/sol et le sol rhizosphérique situé au voisinage immédiat de la racine et soumis à son influence. La rhizosphère est donc un environnement particulier où les flux de matières et d'énergie entre le sol et la plante sont particulièrement intenses (Lynch, 1990). La plante y mobilise l'eau et les éléments minéraux nécessaires à son développement et à sa croissance, induisant aussi des modifications importantes du potentiel de l'eau et des concentrations ioniques du sol rhizosphérique. En outre, les échanges ioniques et gazeux entre les racines des végétaux et le sol, contribuent à modifier d'une manière notable le pH, le potentiel d'oxydo-réduction de la rhizosphère et, par suite, la biodisponibilité de nombreux éléments minéraux nutritifs ou non (Hinsinger, 1998).

### **1. 2. La communauté microbienne de la rhizosphère**

La richesse de la rhizosphère en sucres, amino-acides, acides organiques, isoflavonoïdes, régulateurs de croissance et en enzymes libérées par la plante (Pierson and Pierson, 2000), rend ce microenvironnement un site d'une remarquable activité biologique et d'une richesse naturelle en vers de terre, nématodes, protozoaires, champignons, algues et bactéries. Ces êtres vivants, les microorganismes en particulier, sont requis dans le processus de la décomposition et le recyclage des nutriments dans la rhizosphère de la plante (Germida et al., 1998). Ils jouent aussi un rôle significatif dans l'état de la santé de plantes, certains sont nuisibles, d'autres sont bénéfiques et certains ne semblent avoir aucun effet.

Les microorganismes rhizosphériques incluent les symbiotes (rhizobias, actinobactéries et champignons mycorhiziens) et les saprophytes libres qui augmentent la disponibilité des nutriments et la synthèse des substances de croissance des plantes et/ou suppriment les pathogènes. Un groupe de ces microorganismes rhizosphériques est classé comme des rhizobactéries promotrices de la croissance (PGPR). En effet, plusieurs microorganismes rhizosphériques produisent les auxines, l'éthylène, les cytokinines, les vitamines et autres substances qui peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur les cultures et leur production (Schippers et al., 1987).

La structure des racines et la composition des exsudats racinaires changent durant le développement de la plante ainsi qu'en fonction des conditions environnementales tels que la disponibilité de l'eau et la température. Par conséquent, la dynamique de la population des microorganismes rhizosphériques peut aussi changer. En effet, grâce aux signaux spécifiques, les

plantes exercent une pression sélective qui tend généralement à réduire la diversité microbienne et à favoriser des espèces ou des souches particulières (Bertrand et *al.*, 2000; Ann et *al.*, 2003). En outre, la compétition entre les microorganismes pour les nutriments et la colonisation des sites, la production des antibiotiques et des bactériocines, contribue à cette dynamique microbienne dans la rhizosphère.

Par ailleurs, la communauté microbienne joue un rôle notable dans l'amélioration et la stabilisation de la structure du sol. Plusieurs études ont montré que l'agrégation et la stabilité d'un sol dépend de sa nature et de sa teneur en matière organique (Elustondo et *al.*, 1990). La matière organique produite par les racines a un effet direct sur la stabilisation des agrégats du sol (Watt et *al.*, 1993) et indirect sur la stimulation des activités microbiennes de la rhizosphère (Angers, 1989). En outre, il a été montré que l'action microbienne sur l'agrégation du sol est généralement due aux exopolysaccharides (EPS) produits par divers microorganismes (Lynch, 1985). En effet, l'amendement du sol avec les EPS a été soldé par l'amélioration de sa structure (Martens et Frankberger, 1993) ; de même, l'inoculation du blé avec des bactéries productrices d'EPS, *Pantoea agglomerans* et *Paenibacillus polymyxa*, a permis de réguler la rétention d'eau de la rhizosphère (Amellal, 1998 ; Bezzate et *al.*, 2000).

Les microorganismes rhizosphériques en général, et les bactéries diazotrophiques en particulier, exercent sur les plantes divers effets bénéfiques *via* la fixation de l'azote moléculaire ( $N_2$ ), la dissolution ou la chélation de diverses substances nutritives minérales, la synthèse de substances de croissance accessoires, et destruction ou inhibition d'agents pathogènes (Davet, 1996). Par ailleurs, l'association des bactéries bénéfiques avec les racines a des influences importantes sur la santé de la plante, la productivité et la qualité du sol.

## 2. LES SYSTÈMES DIAZOTROPHIQUES

Les microorganismes capables de fixer biologiquement l'Azote sont appelés 'diazotrophes' ou 'diazotrophiques' puisqu'ils réduisent l'azote moléculaire ( $N_2$ ) en ammonium ( $NH_4$ ) grâce à leur enzymatique spécifique, la nitrogénase. Ces systèmes comportent diverses espèces bactériennes, aérobies (*Azobacter*, *Beijerinckia*, ...), anaérobies facultatives (*Pseudomonas*, *Rhizobium*, ...), hétérotrophes (*Klebseilla*, *Enterobacter*, ...), phototrophes (*Azospirillum*, *Nostoc*, ...) et *Frankia*.

En se basant sur les relations spatiale et fonctionnelle entre ces diazotrophes et la plante hôte, Shenoy et *al.*, (2001) ont réparti les systèmes diazotrophiques en deux grands groupes : (i) les diazotrophes exophytes regroupant toutes les bactéries vivant en dehors d'une plante et (ii) les diazotrophes endophytes incluant toutes bactéries vivant à l'intérieur d'une plante hôte. La figure (IV. 1) représente la classification des systèmes diazotrophiques mais selon l'auteur (Shenoy et *al.*, 2001), ce schéma de classification n'est pas très solide.



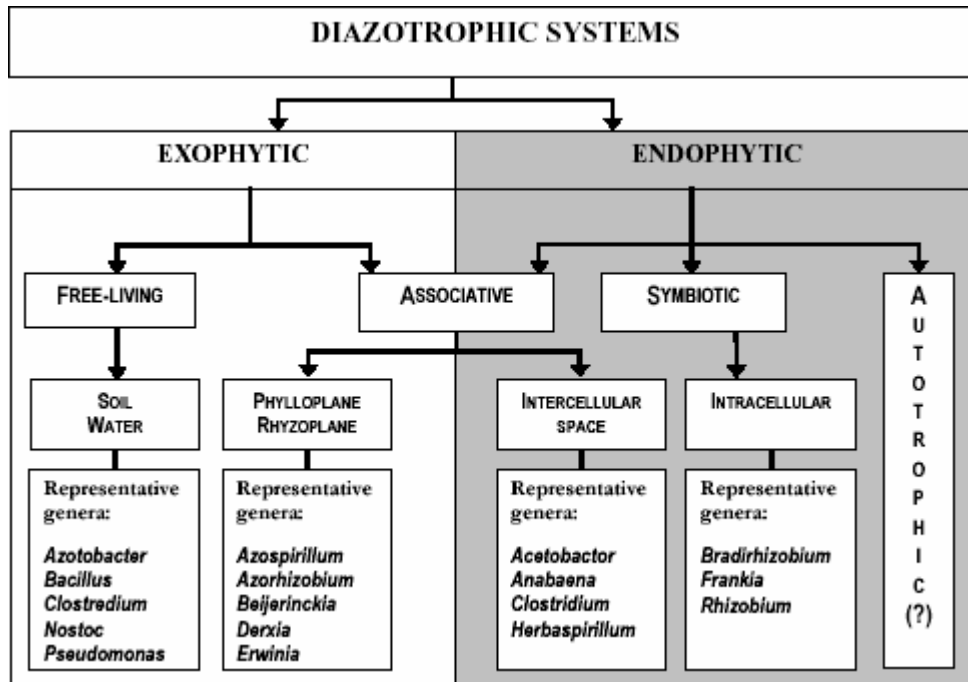


Figure IV. 1: Systèmes diazotrophiques selon Shenoy et al., (2001)

## 2. 1. Les systèmes diazotrophiques exophytes

Ce groupe renferme toutes les bactéries qui vivent en dehors de la plante. Ces systèmes peuvent être soit libres (quand les diazotrophes ne sont pas en contact direct avec la plante), soit associatifs (quand les diazotrophes adhèrent pour la plupart à la surface externe de la plante).

### 2. 1. 1. Le système diazotrophique exophyte libre.

Ce système est composé de bactéries fixatrices d'azote atmosphérique vivant à l'état libre dans le sol, sans être en contact avec aucune plante. La majorité des bactéries diazotrophes libres (FBN) sont des cyanobactéries, des bactéries photosynthétiques ainsi que des bactéries hétérotrophes (Reddy et Ladha, 1995). Du fait que l'azote fixé est sujet à des pertes ou alors il n'est pas immédiatement profitable à la plante (Reddy et Ladha, 1995), le potentiel de fixation d'azote par ce système serait très modéré et ne constituerait que 16 à 20% du besoin total de la plante en azote (Zhu et al., 1984).

### 2. 1. 2. Le système diazotrophe exophyte associative

Les diazotrophes exophytes appartenant à ce système sont qualifiés de «associatives» ou «épiphytes» quand ces bactéries résident plus au niveau de la surface de feuilles (Phylloplan) ou au contact avec les racines (rhizoplan) d'une plante saine (Andrews et Harris, 2000; Shenoy et al., 2001; Steven et Maria, 2003). Ces exophytes associatives peuvent aussi coloniser d'autres types d'organe tels que les bourgeons et les fleurs (Andrews et Harris, 2000). En général, les feuilles constituent l'espace le mieux colonisé par les épiphytes dont le nombre peut atteindre  $10^6$  à  $10^8$  cellules/cm<sup>2</sup> de feuille (Andrews et Harris, 2000; Hirana et Upper, 2000).

Les diazotrophes épiphytes sont très variés et appartiennent à divers genres bactériens tels *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Burkholderia* et autres. D'après Watanabe et

Barraquio (1981), 80% des exophytes associés aux racines du riz sont fixateurs d'azote atmosphérique. Cependant, leur contribution, aussi bien pour la fertilisation du sol que pour l'approvisionnement de la plante hôte en azote serait très faible (Ladha et *al.*, 1988).

### **3. LES SYSTÈMES DIAZOTROPHES ENDOPHYTIQUES**

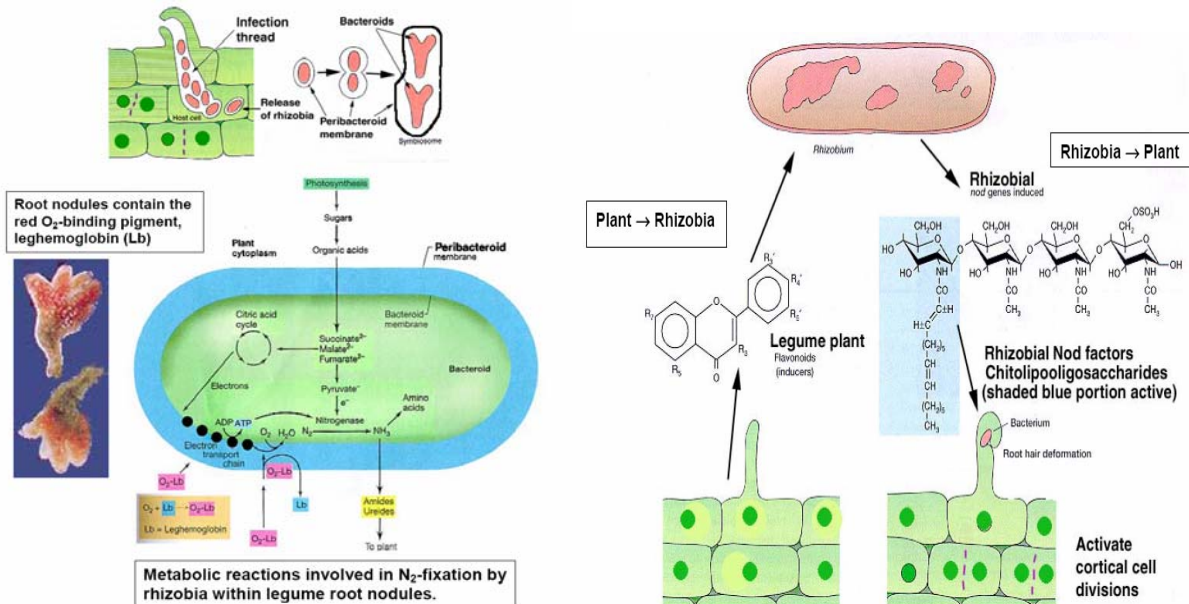
Les bactéries appartenant à ces systèmes sont des diazotrophes nichant à l'intérieur de leur plante hôte. Selon l'espace colonisé dans la plante hôte, ces bactéries sont réparties en trois groupes distincts dont deux sont les plus connus et étudiés (Shenoy et *al.*, 2001). Il s'agit en occurrence, des bactéries endophytes symbiotiques caractérisées par leur localisation à l'intérieur d'une structure spécifique dite nodosité et des bactéries endophytes associatives qui se logent dans les espaces intercellulaires (Shenoy et *al.*, 2001; Tilak et *al.*, 2005).

#### **3. 1. Les systèmes diazotrophiques endophytes symbiotiques**

Ce système est communément qualifié de symbiose fixatrice d'azote. Il est illustré par des associations symbiotiques et spécifiques établies entre les couples de bactéries type rhizobia et des plantes légumineuses et des actinomycètes du genre *Frankia* avec des plantes actinorhiziennes telle *Casuarina*. Dans le cas des rhizobia, le tissage de la symbiose a lieu à l'intérieur des cellules corticales des racines, donnant une structure nodulaire où les diazotrophes sont hébergés (Fig. IV. 2). A l'intérieur de ces structures, les bactéries sont différenciées en bactéroïdes capables de réduire l'azote moléculaire en ammonium assimilable par la plante. En contre partie, la plante assure l'approvisionnement du bactéroïde en carbone résultant de la photosynthèse (Hirsh et *al.*, 2001; Felix, 2003).

##### **3. 1. 1. L'infection et colonisation des plantes hôtes par les endophytes symbiotiques**

L'infection et la colonisation des racines de la plante hôte par des diazotrophes endophytiques symbiotiques (endosymbiotes) est un processus hautement spécifique, aboutissant à la formation des structures nodulaires (Hirsh et LaRue, 1998). Ce processus débute par la sécrétion des exsudats racinaires riches en flavonoïdes, bêtaïnes et acide aldonique, signe d'initiation de la symbiose (Phillips, 2000). Plus de 4000 différents flavonoïdes ont été identifiés dans le système vasculaire de la plante et leur implication dans la spécificité d'hôte chez les légumineuses a été prouvée (Perret et *al.*, 2000). L'isoflavonoïde a été montré spécifique aux plantes légumineuses ; par contre, de nombreux dérivés de flavonoïdes se sont avérés non spécifiques aux légumineuses d'où leur synthèse par diverses plantes (Hirsh et *al.*, 2001).



**Figure IV. 2:** Infection et établissement de nodule racinaire par rhizobia (Hirsh et *al.*, 2001)

Dans un environnement humide, les diazotrophes symbiotiques reconnaissent leur plante hôte par le biais des flavonoides qui ont un effet inducteur sur l'expression du gène *nod* chez les bactéries ainsi que leur mobilisation (Hirsh et LaRue, 1998). En réponse, les diazotrophes libèrent un lipochitoligosaccharide (facteur Nod) qui induit le changement morphologique du poil absorbant des racines, la formation des cordons d'infection par différenciation de cellule corticale et le développement de nodule efficace où le bactéroïde fixera l'azote (Fig. IV. 2).

### 3. 1. 2. Les diazotrophes symbiotiques rhizobiens : *Rhizobium*

D'une manière générale, les rhizobia sont des bactéries du sol, appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* (Jordan, 1984), aérobies, Gram négatif, non sporulant et capables d'induire la formation de nodosités racinaires avec les plantes légumineuses.

La taxonomie des rhizobiums a considérablement évolué dans le temps. Ce-ci est dû principalement à l'avènement de diverses approches génétiques, à l'apparition de plus en plus de nouvelles espèces non étudiées auparavant et au fait que les isolats de rhizobia peuvent noduler plus d'une seule espèce végétale, aussi plusieurs espèces bactériennes peuvent être isolées d'une même plante légumineuse.

Ainsi, la taxonomie fondée sur les groupes d'inoculations croisées a permis d'identifier six espèces de l'unique genre *Rhizobium* : *R. leguminosarum*, *R. trifoli*, *R. phaseoli*, *R. meliloti* et *R. japonicum* (Fred et *al.*, 1932). Vu le nombre élevé de légumineuses et le grand nombre de *Rhizobium* correspondant, le concept d'une étroite spécificité plante-bactérie n'a pas été totalement rejeté mais abandonné progressivement. Plus tard, les rhizobiums ont été reclassés en deux genres selon la vitesse de croissance des bactéries en milieu de culture: le genre *rhizobium* qui inclue toutes les souches à croissance rapide et un nouveau genre *Bradyrhizobium* renfermant les souches à croissance lente (Jordan, 1982).

Depuis la dernière description de Jordan (1984), l'apparition de la taxonomie polyphasique, méthode intégrant tout un ensemble d'informations phénotypiques, génétiques et phylogénétiques et aboutissant à une estimation quantitative de la similarité entre les différents organismes, a provoqué de grands remaniements dans la systématique des rhizobia. Ainsi, l'isolement de nombreuses souches à partir de diverses légumineuses non étudiées auparavant et leur caractérisation par des approches polyphasiques modernes ont permis la description et la classification des bactéries nodulantes en six genres avec 28 espèces (Vandamme et *al.*, 1996).

Par ailleurs les études phylogénétiques, exclusivement basées sur l'analyse des séquences des gènes 16S, 23S, ITS (Woese, 1987), des gènes symbiotiques *nod* et *nif* (Dobert et *al.*, 1994) ont révélé que la taxonomie des rhizobia est un phénomène très complexe. Cette complexité est non seulement liée à la diversité des isolats bactériens et des plantes légumineuses mais aussi due au phénomène naturel qu'est le brassage génétique entre les bactéries du sol qui est souvent soldé par un transfert latéral de gènes entre les souches du même ou de différents genres. En conséquence, la récente taxonomie des rhizobiums, rapportée par Willems (2003) a connu de profondes modifications et réarrangements (Tableau IV. 1 et 2). Elle comporte 11 genres et la quasi-totalité des rhizobiums qui forment des nodosités et fixent l'azote atmosphérique est classée à l'intérieur de l'un des genres déjà connus. En dehors de ces genres classiques, la découverte de nouveaux rhizobiums, a été rapportée par plusieurs auteurs sans pou autant préciser leur classification définitive (Tableau IV. 2) (Chen et *al.*, 2001; Sy et *al.*, 2001; van Berkam et Eardly, 2002; Vandamme et *al.*, 2002; Chen et *al.*, 2003; Jourand et *al.*, 2004; Trujillo et *al.*, 2005).

L'analyse génomique de ces nouveaux genres, confirme que leurs respectives espèces possèdent des gènes symbiotiques, *nod* et *nif* respectivement impliqués dans l'établissement des nodules chez leurs plantes hôtes et la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (Chen et *al.*, 2001; Rivas et *al.*, 2002; Tripathi, 2002; Piyush et *al.*, 2005). D'après ces auteurs, ces rhizobiums auraient acquis les gènes symbiotiques *via* le phénomène du transfert latéral ou horizontal en provenance de certaines espèces de rhizobia déjà classés. Cependant, il est important de souligner que ces nouveaux genres de rhizobium peuvent avoir diverses écologies et contenir notamment de nombreuses espèces non symbiotiques (Yabuuchi et *al.*, 1995; Chen et *al.*, 2001; Sy et *al.*, 2001).

Tableau IV. 1: Taxonomie récente de rhizobium. Source de Willems (2003) réactualisée

Genre	Espèce	biovar	Plante hôte	Référence
<b>Rhizobium</b>	<i>R. etli</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i>	Segovia et al., 1993
	<i>R. galegae</i>			
	<i>bv. orientalis</i>		<i>Alega orientalis</i>	Lindström et al., 1989
	<i>bv. trifolii</i>		<i>Galega orientalis</i>	Lindström et al., 1989
	<i>R. gallicum</i>	<i>bv. galicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
		<i>bv. phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
	<i>R. giardinii</i>	<i>bv. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
		<i>bv. phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
	<i>R. hainanense</i>		<i>Desmodium sinuatum</i>	Chen et al., 1997
	<i>R. huautlense</i>		<i>Sesbania herbacea</i>	Wang et al., 1998
	<i>R. indigofera</i>		<i>Indigoferae</i> sp.	Wei et al., 2002
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>bv. viciae</i>	<i>Pisum sativum</i>	Frank, 1889; Jordan, 1984
		<i>bv. Phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frank, 1889; Jordan, 1984
		<i>bv. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Frank, 1889; Jordan, 1984
	<i>R. loesense</i>		<i>Astragalus - Lespedeza</i>	Wein et al., 2003
	<i>R. mongolense</i>		<i>Medicago ruthenica</i>	Van Berkum et al., 1998
	<i>R. sullae</i>		<i>Hedysarum coronarium</i>	Squartini et al., 2002
<i>R. tropici</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i>	M. Romero et al., 1991	
<i>R. undicola</i>		<i>Neptunia natans</i>	Young et al., 2001	
<b>Mesorhizobium</b>	<i>M. amorphae</i>		<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang et al., 1999
	<i>M. chacoense</i>		<i>Presopis alba</i>	Velazquez et al., 2001
	<i>M. ciceri</i>		<i>Cicer arietinum</i>	Jarvis et al., 1997; Nour et al., 1994b
	<i>M. huakui</i>		<i>Astragalus sivicum</i>	Jarvis et al., 1997; Chen et al., 1991
	<i>M. loti</i>		<i>Lotus corniculatus</i>	Jarvis et al., 1982; Jarvis et al., 1997
	<i>M. mediterraneum</i>		<i>Cicer arietinum</i>	Jarvis et al., 1997; Nour et al., 1995
	<i>M. plurifarium</i>		<i>Acacia senegal</i>	De Lajudie et al., 1998
	<i>M. septentrionale</i>		<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al., 2004
	<i>M. temperatum</i>		<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al., 2004
<b>Ensifer (syn: Sinorhizobium)</b>	<i>E. arboris</i>		<i>Acacia et Prosopis</i>	Nick et al., 1999; Young, 2003
	<i>E. fredii</i>		<i>Glycine max</i>	Chen et al., 1988
	<i>E. kostiense</i>		<i>Acacia et Prosopis</i>	Nick et al., 1999; Young, 2003
	<i>E. kummerwiae</i>		<i>Kummerowia</i> sp.	Wei et al., 2002; Young, 2003
	<i>E. medicae</i>		<i>Medicago truncatula</i>	Rome et al., 1996; Young, 2003
	<i>E. meliloti</i>		<i>Medicago sativa</i>	Danglard, 1926; Jordan, 1984; de Lajudie et al., 1994; Young, 2003
	<i>E. saheli</i>		<i>Sesbania pachycarpa</i>	De Lajudie et al., 1994; Biovin et Girand 1999
	<i>E. terangae</i>	<i>bv. acacia</i>	<i>Acacia laeta</i>	Lorquin et al., 1997; Young, 2003
		<i>bv. sesbania</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Lorlet et al., 1996
	<i>E. rinjiangense</i>		<i>Glycine max</i>	Chen et al., 1988; Young, 2003
<b>Bradyrhizobium</b>	<i>B. elkanii</i>		<i>Glycine max</i>	Kuykendall et al., 1992
	<i>B. japonicum</i>		<i>Glycine max</i>	Jordan, 1982; Jordan et Allen, 1974
	<i>B. liaoningense</i>		<i>Glycine max</i>	Xu et al., 1995
	<i>B. yuanmingense</i>		<i>Lespedeza</i>	Yao et al., 2002
	<i>B. canariense</i>		<i>Papilionoideae, Genisteeae</i>	Vinuesa et al., 2005
<b>Azorhizobium</b>	<i>Az. caulinodans</i>		<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus et al., 1988

**Tableau IV. 2:** Les nouveaux rhizobiums. Source de Willem (2003) réactualisée

Genre	Espèce	Plante hôte	Référence
<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotaria spp.</i>	Sy et al., 2001; Jouraud et al., 2004
<i>Burkholderia</i>	<i>B. phymatum</i> STM815	<i>Machaerium lunatum</i>	Moulin et al., 2001; Vandamme et al., 2002
	<i>B. tuberum</i> STM678	<i>Aspalathus carnosa</i>	Vandamme et al., 2002
	<i>B. spp.</i> MSSP	<i>Mimosa pudica</i>	Piyush et al., 2005
<i>Ralstonia</i>	<i>R. taiwanensis</i>	<i>Mimosa spp.</i>	Chen et al., 2001; Chen et al., 2002
	<i>R. eutropha</i>	<i>Mimosa spp.</i>	Tripathi, 2002
<i>Devosia</i>	<i>D. neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	Rivas et al., 2002; Rivas et al., 2003
<i>Blastobacter</i>	<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	Van Burkum et Eardly, 2002
<i>Ochrobacterium</i>	<i>O. lupini</i>	<i>Lupinus honoratus</i>	Trujillo et al., 2005

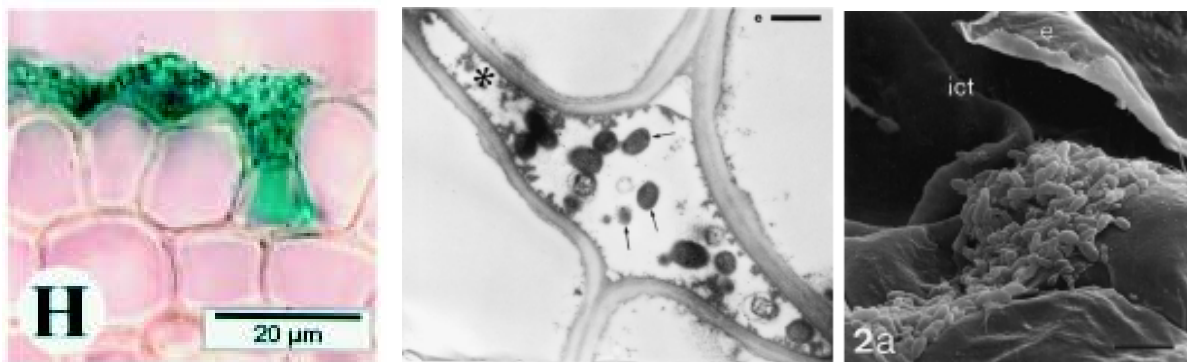
### 3. 1. 3. Les diazotrophes symbiotiques actinorhiziens : *Frankia*

*Frankia* est une bactérie du sol, filamenteuse, Gram positive et appartenant à la famille des *Frankiaceae*, ordre des *Actinomycétales*. Il était jadis, considéré comme étant un symbiote obligatoire. C'est en 1978 qu'une culture pure de *Frankia* a pu être obtenue à partir de nodules de *Comptonia peregrina* (Callaham et al., 1978). Les souches de *Frankia* induisent la formation de nodules fonctionnels chez plus de 280 espèces de plantes actinorhiziennes appartenant à 8 différentes familles (Schwintzer et Tjepkema, 1990). Bien que *Frankia* présente une grande diversité génétique, leur taxonomie reste encore mal connue et globalement les espèces de plantes connues pour leur symbiose avec cette bactérie appartiennent à *Alnus* et *Casuarina* (Tjepkema et al., 1986; Wheeler et Miller, 1990).

### 3. 2. Systèmes diazotrophiques endophytes associatives

Ces systèmes englobent toutes les bactéries diazotrophes vivant en étroite association avec la plante hôte et fixant directement l'azote dans les espaces intercellulaires (Fig. IV. 5), sans être transformées en bactéroïdes. Ils sont également qualifiés de fixateurs non symbiotiques (Shenoy et al., 2001; Tilak et al., 2005).

Depuis trois décennies, la colonisation des tissus végétaux par les bactéries diazotrophes, a attiré plus d'attention et certains aspects liés à l'interaction entre les deux partenaires ont été élucidés. L'intime interaction entre micro et macro symbiotes a modifié le concept «associative» et Döbereiner (1992a, b) a introduit le concept «Endophyte» pour définir ces diazotrophes associées avec les plantes non légumineuses. En général, le terme «endophyte» inclut tout micro-organisme susceptible, durant une période de son cycle de vie, de coloniser l'intérieur du tissu végétal, sans pour autant causer de dommage apparent chez la plante hôte (Döbereiner, 1992a, b; James et Olivares, 1997).



**Figure IV. 5:** Espace intercellulaire, sous épidermique du Riz (*Oryza sativa* L.) colonisé par des bactéries endophytes associatives (Bacilio-Jimerey et al., 2001; Gyaneshwar et al., 2001)

La recherche sur les systèmes diazotrophiques endophytes a connu par la suite l'isolement et la caractérisation de nouvelles bactéries fixatrices d'azote et colonisatrices de l'espace intercellulaire des tissus végétaux, telles que *Herbaspirillum seropedicae* isolée à partir de plantes de maïs, de sorgho et du riz (Baldani et al., 1986a) et *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolée de la canne à sucre (Cavalcante et Döbereiner, 1988). Dès lors, d'autres aspects liés à la fixation biologique de l'azote, telle que la physiologie, l'écologie et la génétique de ces bactéries, ont été explorés (Baldani et al., 1997; Baldani et Baldani, 2005).

### 3. 2. 3. Infection et colonisation de la plante hôte par les endophytes associatives

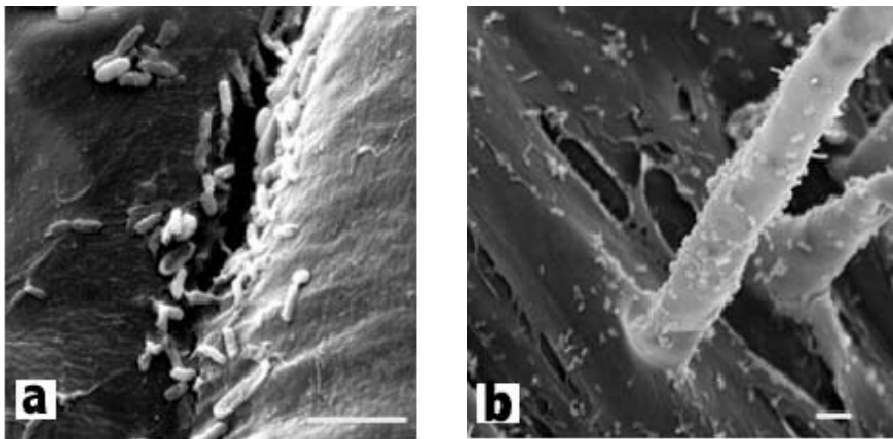
La capacité des bactéries endophytes associatives d'infecter et de coloniser les racines ou d'autres types d'organe de la plante, peut être considérée comme étant un facteur majeur qui détermine l'efficacité du bio-inoculum aussi bien sur l'amélioration de la productivité des plantes que sur leur protection des maladies et contrôle des agents pathogènes (Weller, 1988). Ces bactéries peuvent infecter et coloniser l'intérieur des tissus de diverses plantes y compris les légumineuses et y prospérer en tant qu'endophytes associatifs naturels des racines, des tiges, des xylèmes, des feuilles et des fruits (Baldani et Baldani, 2005; Compant et al., 2005; Matiru et Dakora, 2004; O'Callaghan et al., 1997; Reis et al., 1994; Seghers et al., 2004; Tilak et al., 2005).

L'infection et la colonisation de la plante hôte par les diazotrophes endophytes associatives se réalisent d'une manière passive, enzymatique ou spécifique. L'infection passive et enzymatique constitue les principales voies empruntées par ces endophytes. Elles ne nécessitent la présence ni de flavonoïdes et leurs dérivés ni de facteur Nod (Reddy et Ladha, 1995). La pénétration passive a eu lieu au niveau des craquelures que provoque l'émergence des racines latérales ou secondaires, de la zone d'élongation des racines et des des espaces intercellulaires entre les cellules corticales et épidermiques (Chaintreuil et al., 2000; Gough et al., 1997a). L'infection enzymatique se réalise souvent, après une dégradation cellulosique localisée au niveau de la surface racinaire (Chaintreuil et al., 2000).

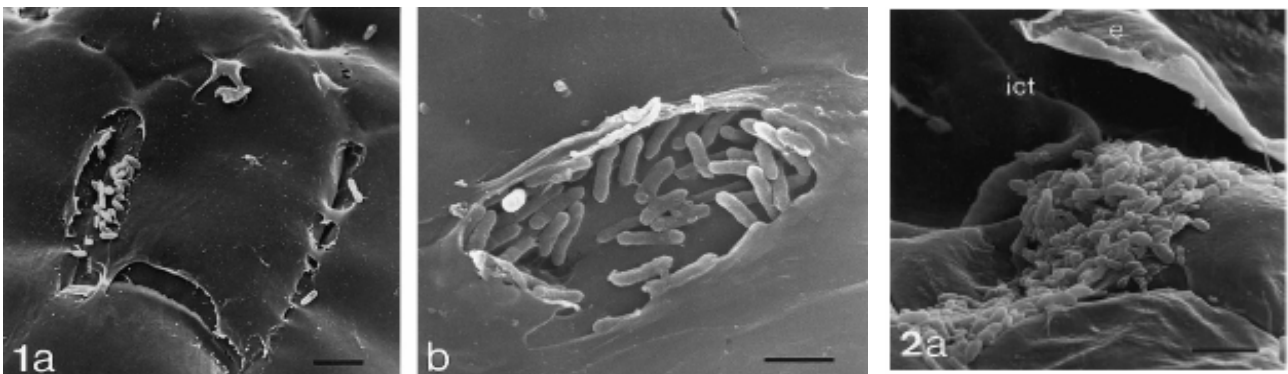
Dans le cas de la pénétration spécifique, l'initiation de l'infection est tributaire des exsudats racinaires (flavonoïdes) d'où spécificité entre les deux associés. En effet, Webster et al., (1998) ont démontré que l'infection des racines du Blé (*Triticum aestivum* L.) par *Azorhizobium caulinodans*

nécessite la présence du flavonoïde (naringénine) à des concentrations allant de 10 et 100mmol/m<sup>3</sup>. Diverses autres flavonoïdes (daïdzéine, génistéine, myricétine et apigénine) à 10mmol/m<sup>3</sup> stimulent d'une manière significative la colonisation de craquelures des racines latérales du Blé par *Azospirillum brasilense*. Toutefois, ces différents flavonoïdes ont été incapables de stimuler la colonisation des racines du blé par *Rhizobium meliloti*2011 (Webster et al., 1998).

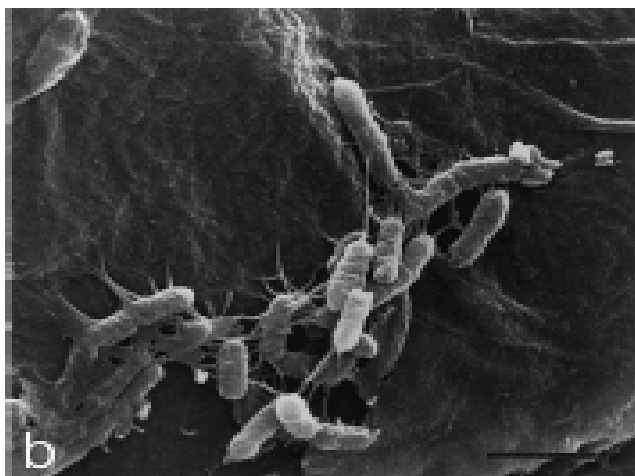
D'après N'doye et al., (1994), le processus d'infection et de colonisation de tissus des plantes se résume en trois étapes: (i) infection intercellulaire: entrée des bactéries par les craquelures naturelles (Fig. IV. 6), (ii) formation de poches où les bactéries se multiplient et (Fig. IV. 7), (iii) développement de filaments d'adhésion permettant l'échange avec plante hôte (Fig. IV. 8).



**Figure IV. 6:** Craquelures naturelles racinaires de sorghum envahies par (a) *RhizobiumGRH2* (b) *Azorhizobium caulinodans* ORS571 (Matiru et Dakora, 2004)



**Figure IV. 7:** Localisation des *Azospirillum brasilense*, après son inoculation au Riz et formation des poches bactériennes (Bacilio-Jimerez, 2001)



**Figure IV. 8.** *Azospirillum brasilense* formant de filaments d'adhésion dans les tissus du Riz (Bacilio-Jimerez, 2001)



La localisation des diazotrophes associatives dans les jonctions intercellulaires ou espaces épidermiques n'est pas fortuite. Ces espaces privilégiés offrent aux bactéries, l'opportunité du mouvement, grâce au mucilage qui couvre l'épiderme racinaire et constituent une région à faible tension d'oxygène et à grande abondance de carbone comme source d'énergie (Bacilio-Jiménez et al., 2001; Bowen, 1979). Une fois les bactéries ont colonisé le système racinaire, elles peuvent envahir le système vasculaire et de là les autres organes de la plante, avec une densité très importante dans les racines mais qui diminue progressivement en allant vers les tiges et les feuilles (Formmel et al., 1991; Compant et al., 2005). En effet, des études ont montré que des endosymbiotes (*Rhizobium*) peuvent outrepasser leur niches écologiques (nodules) habituels pour coloniser les éléments du xylème des racines de leur plante hôte (N'doye et al., 1994). Aussi, les souches de *Azorhizobium caulinodans* ORS571 ont été, à la fois, capables de noduler les tiges et les racines de *Sesbania rostrata* et de coloniser le xylème de racines latérales de la même plante (O'Callaghan, 1997) ou d'autres plantes non-légumineuses, telle que le Blé (Webster et al., 1998). Les souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques isolées à partir des racines du riz, *Oryza bieviligulata*, ont pu, après leur inoculation, noduler la légumineuse *Aeschynomene sensitiva* (Chaintreuil et al., 2000).

### 3. 2. 4. La diversité des bactéries endophytes associatives

L'étude de la diversité des bactéries endophytes associatives suscite d'énormes intérêts, notamment qu'elles sont désignées comme bactéries de future dans le domaine agricole (Seghers et al., 2004). Contrairement aux rhizobiums, la taxonomie des bactéries endophytes associatives reste encore mal cernée. Cependant, la plupart de ces bactéries identifiées jusqu'à présent font partie des espèces appartenant aux genres, *Azospirillum*, *Acinetrobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Gluconoacetobacter*, (Syn: *Acetobacter*), *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* (Tableau IV. 3 et 4) (Baldani et Baldani, 2005; Chi et al., 2005; Compant et al., 2005; Tilak et al., 2005).

#### a. Le genre *Azospirillum*

Les membres du genre *Azospirillum* (Tarrand et al., 1978), fixateurs d'azote dans de conditions microaérophiles, sont fréquemment présents dans la rhizosphère et associées avec un grand nombre de plantes à importance agricole (Baldani et Baldani 2005; Tilak et al., 2005). En dépit de leur capacité fixatrice d'azote (1-10KgN/ h), des auteurs estiment que leur impact sur l'amélioration de la productivité des cultures, serait attribué à l'induction du développement racinaire par le biais de la production des hormones de croissance et en conséquence augmenter la potentialité de la plante à absorber de l'eau et les minéraux (Dewan et SubbaRao, 1979; Fallik et al., 1994).

**b. Le genre *Azoarcus***

Les bactéries de ce genre fixent l'azote en aérobie et en microaérophilie et appartiennent à deux espèces, *A. indigenus* et *A. communis*, isolées d'herbes fourragères et du riz, *Oryza sativa* L. (Egener et al., 1998; Reinhold et al., 1993).

**c. Le genre *Bacillus***

Les espèces du genre *Bacillus* sont caractérisées par leur large spectre d'hôte. Elles résident, habituellement, à l'intérieur des tissus de diverses espèces végétales, telles le cotonnier (McInroy et Kloeppe 1995; Misaghi et Doundelinger, 1990), l'épinette (Hallaksela et al., 1991; Shishido et al., 1999), les petits pois (Huang et al., 1993), les céréales (McInroy et Khoeppe, 1995) et la Vigne (Bell et al., 1995). Du fait que la plupart des *Bacillus* endophytes, se caractérisent par la production de divers antibiotiques et enzymes hydrolytiques, elles jouent un rôle important dans la protection contre les champignons et les bactéries pathogènes (Emmert et Handelsman, 1999).

**d. Le genre *Beijerinckia***

Le genre *beijerinckia* a été, pour la première fois, mentionnée au Brésil par Döbereiner et Castro (1955) avec comme espèce, *B. fluminensis* isolée à partir des racines de la canne à sucre (Döbereiner et Ruschel, 1958). Beaucoup influencées par les exudats racinaires, elles sont autant plus accolant dans la rhizoplane que dans la rhizosphère (Döbereiner, 1961). En effet, l'espèce *B. indica* était isolée aussi bien, des racines de la canne à sucre que du simple sol (Döbereiner et al., 1972 a).

Tableau IV. 3: Quelques bactéries endophytes associatives

Endophyte associative	Plante hôte	Organe (s) colonisé(s)	Référence
<b>Azospirillum</b>			
<i>A. amazonense</i>	<i>Saccharum officina</i>	Racine, tige et feuilles	Magalhaes et al., 1983
<i>A. brasilense</i>	Blé, Sorgho, Maïs	Racine et tige	Tarrand et al., 1978; Baldani et Döbereiner, 1980; Fallik et al., 1996
<i>A. lipoferum</i>	Blé, Sorgho, Maïs	Racine et tige	Tarrand et al., 1978; Baldani et Döbereiner, 1980; Fallik et al., 1996;
<i>A. halopraeferent</i>	<i>Leptochloa fusca</i>	racine	Reinhold et al., 1987
<b>Azoarcus</b> sp. BH72	Riz ( <i>Oryza sativa</i> L) <i>Leptochloa fusca</i>	Racine	Hurek et al., 1987b; Reinhold-Hurek, 1993; Egner et al., 1999
<b>Bacillus</b>			
<i>B. endophyticus</i> sp.	<i>Gossypium</i> sp	Racine	Misaghi et Donndelinger, 1990; Reva et al., 2002
<i>Bacillus</i> sp	Cotonnier, Epinette ( <i>Picea abies</i> ), Raisin, Petits pois	Racine, tige et feuilles	Misaghi et Donndelinger, 1990, Bell et al., 1995; Hallaksela et al., 1991; Huang et al., 1993; Shishido et al., 1999
<b>Beijerinckia indica</b>	Canne à sucre	racine	Döbereiner et al., 1972a
<b>Burkholderia</b>			
<i>B. brasilensis</i>	Banane ( <i>Musa</i> spp.)	Tige	Baldani et al., 1997; Cruz et al., 2001
<i>B. cepacia</i>	<i>Lupinus luteus</i> , maïs	Racine, xylème	Barac et al., 2004; Di Cello et al., 1997
<i>Burkholderia</i> (PsJN) sp.	<i>Vitis vinifera</i>	Racine, tige et feuille	Compant et al., 2005
<i>B. tropicalis</i>	<i>Ananas comosus</i> L.	Tige et fruit	Baldani et al., 1997; Cruz et al., 2001
<b>Gluconacetobacter*</b>			
<i>G. diazotrophicus</i>	Cane à sucre Cafetier	Racine, tige et feuilles	Gillis et al., 1989; James et al., 1994; Reis et al., 1994; Jimenez-Salgado et al., 1997
<b>Herbaspirillum</b>			
<i>H. seropedicae</i>	Cane à sucre, Riz, Sorgho, Banane ( <i>Musa</i> spp.)	Racine, xylème, feuilles et fruit	Baldani et al., 1986; Boddey et al., 1995; James et al., 1997; Cruz et al., 2001; Weber et al., 1999
<i>H. rurisubalcans</i>	Banane ( <i>Musa</i> spp.), et ( <i>Ananas comosus</i> L.)	Racine, tige, feuille et fruit	Cruz et al., 2001 ; Weber et al., 1999
<b>Pseudomonas</b> PsJN sp	<i>Vitis vinifera</i>	racine	Bark et al., 2002
<b>Serratia</b>			
<i>Serratia phymuthica</i>	<i>Cucumis sativa</i> L	racine	Benhamou et al., 2000
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Oriza sativa</i> L.	racine	Gyaneshwar et al., 2001

\* *Gluconacetobacter* (syn= *Acetobacter*)

### e. Le genre *Gluconocetrobacteres*, espèce: *G. diazotrophicus*

Les genres *Acetrobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconocetrobacter* et *Acidomonas*, appartiennent à la famille de *Acetobacteriaceae* (Yamada et al., 1997). Basé sur l'analyse des séquences de l'ARNr 16S, le nom de *Acetrobacter diazotrophicus* a été changé en *Gluconocetrobacter diazotrophicus* (Yamada et al., 1998).

*G. diazotrophicus*, isolée à partir des racines et des tiges de la canne à sucre a été rapportée, en tant que la première bactérie fixatrice d'azote au Brésil (Cavalcante et Döbereiner, 1988), en Australie (Li et MacRae, 1991), en Inde (Indira et Bagyaraj, 1997; Muthukumarasamy et al., 1992), au Mexique (Fuente- Ramirez et al., 1993), en Uruguay (Ureta et al., 1995), au Canada et à Cuba (Dong et al., 1995). Aujourd'hui, les *G. diazotrophicus*, constituent à travers le monde, l'inoculum le plus performant dans la productivité de la canne à sucre (Gillis et al., 1989; Muthukumarasamy et al., 2000).

### f. Le genre *Herbaspirillum*

Du fait de leur similarité morphologique et physiologique au genre *Azospirillum*, les bactéries du genre *Herbaspirillum* isolées à partir des racines du maïs, du sorgho et du riz, ont été en premier lieu, assignées à *Azospirillum seropedicae* (Baldani et al., 1984). Plus tard, l'homologie ADN/ADN, a montré qu'elles forment un nouveau genre distinct, *Herbaspirillum* (Baldani et al., 1986a). Par la suite différentes espèces ont été identifiées: *H. rubrisubalbicans* isolée de la canne à sucre, du riz et du sorgho (Baldani et al., 1996, Boddey et al., 1995; James et al., 1997) et *H. frisingense* isolée des racines et des feuilles des herbes fourragères (Kirchhof et al., 2001). Selon Pereira et Baldani (1995), l'inoculation du riz avec *H. seropedicae* a occasionné un gain de 40 KgN / ha.

### g. Les Rhizobia

Les bactéries appartenant aux genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, et *Azorhizobium* sont communément connues pour leur importance environnementale et agricole et surtout leur effective implication dans la fixation biologique de l'azote atmosphérique. Récemment, l'habitat naturel de rhizobium s'est étendu aux tissus racinaires des plantes non légumineuses et notamment des graminées (Yanni et al., 1997; Chaintreuil et al., 2000). Ainsi, plusieurs souches rhizobiales appartenant à ces différents genres, ont été isolées des racines de différentes plantes telles le maïs et la salade (Chabot et al., 1996), le riz (Yanni et al., 1997 ; Chi et al., 2005), le sorgho et le mil (Maturi et Dokara, 2004; Chi et al., 2005), le blé (Sabry et al., 1997; Webster et al., 1997), etc.

Par ailleurs, des espèces appartenant au *Burkholderia*, *B. brasilensis*, *B. cepacia*, *B. tropicalis* et *Burkholderia* sp (psJN) ont été respectivement isolées des tiges de banane (Baldani et al., 1997b; Cruz et al., 2001), des racines et xylème de lupin (Barac et al., 2004), des tiges et feuilles d'ananas (Baldani et al., 1997b; Cruz et al., 2001) et des racines, tiges et feuilles de la vigne (Compant et al., 2005).

**Tableau IV. 4:** Des bactéries endophytes associatives appartenant aux rhizobia

<i>Endophyte associative</i>	Plante hôte	Organe colonisé(s)	(s)	Référence
<b>Rhizobium</b>				
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i> P31 et R1	Salade, Maïs	Racine		Chabot et <i>al.</i> , 1996 a, b
<i>trifolii</i>	<i>Oriza sativa</i> L.	Racine		Yanni et <i>al.</i> , 1997
Viceae Cn6 et 30	Sorgho, mil	Racine		Maturi et Dakora, 2004
Viceae USDA2370	<i>Oryza sativa</i> L	Racine, tige, feuille		Chi et <i>al.</i> , 2005
<i>Rhizobium</i> GHR2 et NGR234	Sorgho, mil	Racine		Maturi et Dakora, 2004
<b>Mesorhizobium</b>				
<i>Mesorhizobium huakui</i> 93	<i>Oryza sativa</i> L	Racine, tige, feuille		Chi et <i>al.</i> , 2005
<b>Sinorhizobium</b>				
<i>melloti</i> 1	Sorgho, mil	Racine		Maturi et Dakora, 2004
<i>melloti</i> USDA1002 et 1021	<i>Oryza sativa</i> L	Racine, tige, feuille		Chi et <i>al.</i> , 2005
<b>Bradyrhizobium</b>				
<i>B. japonicum</i> TAL110	Sorgho, mil	Racine		Maturi et Dakora, 2004
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Oryza breviligulata</i>	Racine		Chaintreuil et <i>al.</i> , 2000
<b>Azorhizobium</b>				
<i>A. caulinodans</i> ORS571	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Racine et xylème		Stone et <i>al.</i> , 2001; Gough et <i>al.</i> , 1996
	<i>Oryza sativa</i> L.	Racine, tige, feuille		Christiansen et <i>al.</i> , 1996; Gopaldaswamy et <i>al.</i> , 2000; Chi et <i>al.</i> , 2005
	<i>Triticum aestivum</i>	Racine et xylème		Sabry et <i>al.</i> , 1997; Webster et <i>al.</i> , 1997
	<i>Sesbania rostrata</i>	Racine et xylème		O'Callaghan et <i>al.</i> , 1997
	Sorgho et mil	Racine		Maturi et Dakora, 2004

### 3. 2. 5. Importance des bactéries endophytes associatives

Traditionnellement, les bactéries endophytes étaient jadis assimilées aux pathogènes latents qui ne provoquent ni dommage ni apport bénéfique pour les plantes (Thomas et Graham, 1952). Durant ces dernières années, de nombreux auteurs ont rapporté l'implication de ces endophytes dans l'amélioration de la croissance des plantes, la résistance aux agents pathogènes et de la production agricole (Benhamou et *al.*, 2000; Sturz et Nowak, 2000).

#### 3. 2. 5. 1. La fixation biologique de nitrogène (FBN) par endophytes associatives

L'inoculation des graminées avec des bactéries endophytes associatives telles que les *Herbaspirillum*, a contribué *via* la fixation biologique de l'azote, à un gain de 40% d'azote total (Boddy et Döbereiner, 1982). Bien que Azam et *al.*, (1989) ont estimé que l'amélioration de la productivité des plantes, observée après leur inoculation avec ces endophytes, serait plutôt dédié en grande partie à la stimulation des hormones de croissance qu'à la fixation de l'azote, d'autres

chercheurs ont confirmé l'implication de ces bactéries endophytes associatives dans la fixation biologique de l'azote en plus de leur influence sur la production hormonale et d'autres processus bénéfiques pour la plante (Cruz et al., 2001; Lee et al., 2000; Patriquin et al., 1983; Yanni et al., 1997). L'utilisation de  $^{15}\text{N}$  a apporté la preuve irréfutable de la faculté de cette communauté microbienne à participer à la nutrition azotée des plantes *via* la fixation (Boddy et al., 1995). Il est estimé, pour certains cultivars brésiliens de riz, que 70% de l'azote de la plante proviennent de la fixation biologique (Urquiaga et al., 1992; Boddy, 1995) et 20% pour certaines variétés asiatiques (Boddy et al., 1995).

Pour mieux cerner ce phénomène d'interaction endophytes associatives - plantes hôtes et conclure de manière certaine, plusieurs expériences ont été menées. Ces expériences consistent à reproduire, *in vitro*, la colonisation des tissus des plantes puis procéder à la détection de la nitrogénase ou à évaluer son activité dans la plante. Parmi les méthodes utilisées, on note la mesure de l'activité de la réduction d'acétylène (ARA), l'estimation de la capacité métabolique (expression des gènes) et la détection des gènes *nif* et *fix* par PCR.

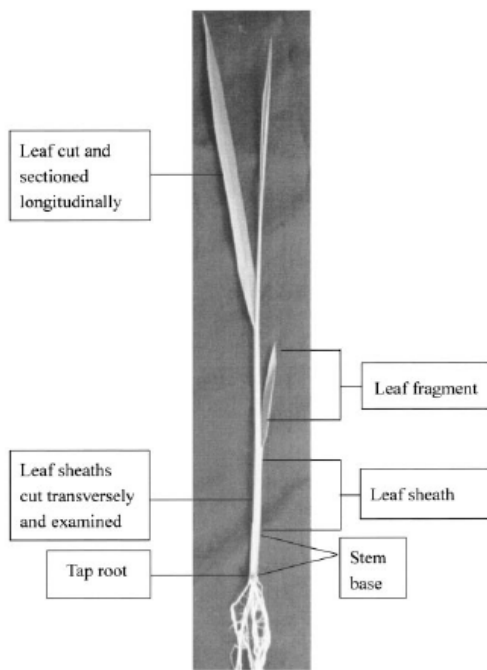
#### **a. Activité de la réduction d'acétylène (ARA)**

C'est une méthode basée sur la mesure directe, *in situ* ou *in vitro*, de la réduction d'acétylène ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) et la production d'éthylène, liée à l'action de la nitrogénase d'où évaluation de l'activité de cette dernière dans la plante (Souto et Döbereiner, 1984). L'utilisation de cette méthode dans le cas de la canne à sucre inoculée avec *Beijerinckia indica*, a révélé une contribution de cet endophyte à un gain de 50KgN/ha/an (Döbereiner et al., 1973). Par ailleurs, la quantité d'azote fixé chez le maïs inoculé avec *Spirillum lipoferum* était de 10000 nmoles  $\text{C}_2\text{H}_2$ /ha/g de racine sèche (Dommergues et al., 1973), de 239 à 750 nmoles  $\text{C}_2\text{H}_2$ /ha/g de racine chez plusieurs plantes fourragères (Day et al., 1975) et de 1.7nmoles  $\text{C}_2\text{H}_2$ /ha/palnte) chez le riz inoculé avec *Bradyrhizobium* photosynthétique (Chaintreuil et al., 2000). En outre, chez les arbres, l'activité nitrogénase a été détectée dans les racines et bourgeons du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) *via* ARA par Bryan et al., (1996) sans avoir identifiée les bactéries responsables.

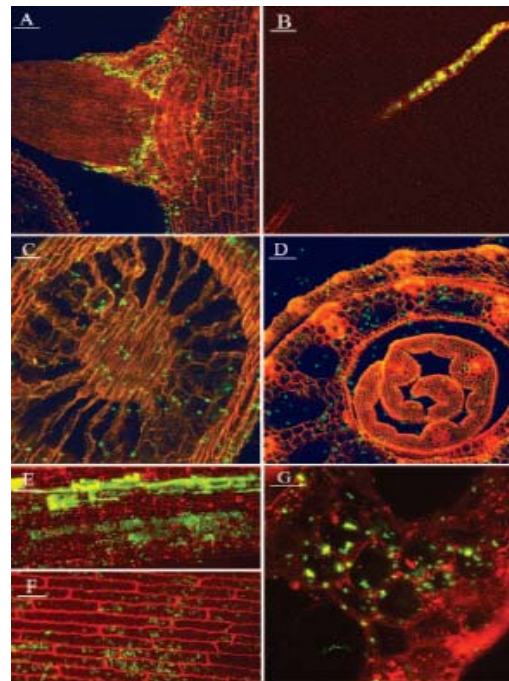
#### **b. Capacité métabolique des endophytes associatives**

Afin de les sélectionner et de les améliorer pour une agriculture durable, l'estimation de la capacité métabolique des diazotrophes endophytes dans la plante hôte s'est avérée nécessaire. Des gènes convenables pour la fusion transcriptionnelle ont été élaborés à savoir, les gènes *nifH::gusA*, codant pour  $\beta$ -glucuronidase (GUS) de *Escherichia coli* (Jefferson et al., 1987) et d'*Azoarcus* sp. (Egener et al., 1999) ou *nifH::gfp* codant pour une protéine auto-fluorescente (GFP :Green fluorescent protein) ne nécessitant pas de substrat diffusible ou coloré (Chalfie et al., 1994).

La technique **GFP** a été utilisée aussi bien pour repérer la cellule bactérienne (Fig. IV. 9 et 10) (Bloemberg et al., 1997; Chi et al., 2005; Gage et al., 1996; Tombolini et al., 1997), que pour déceler l'expression des gènes *nif* et *fix* des bactéries endophytes abritées par les plante (Egener et al., 1998; 1999).

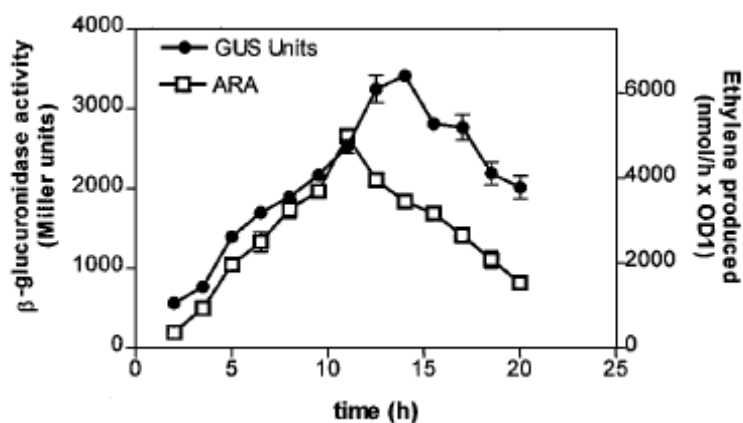


**Figure IV. 9:** Différents tissus du riz utilisés pour détecter la présence des bactéries endophytes (Chi et al., 2005)

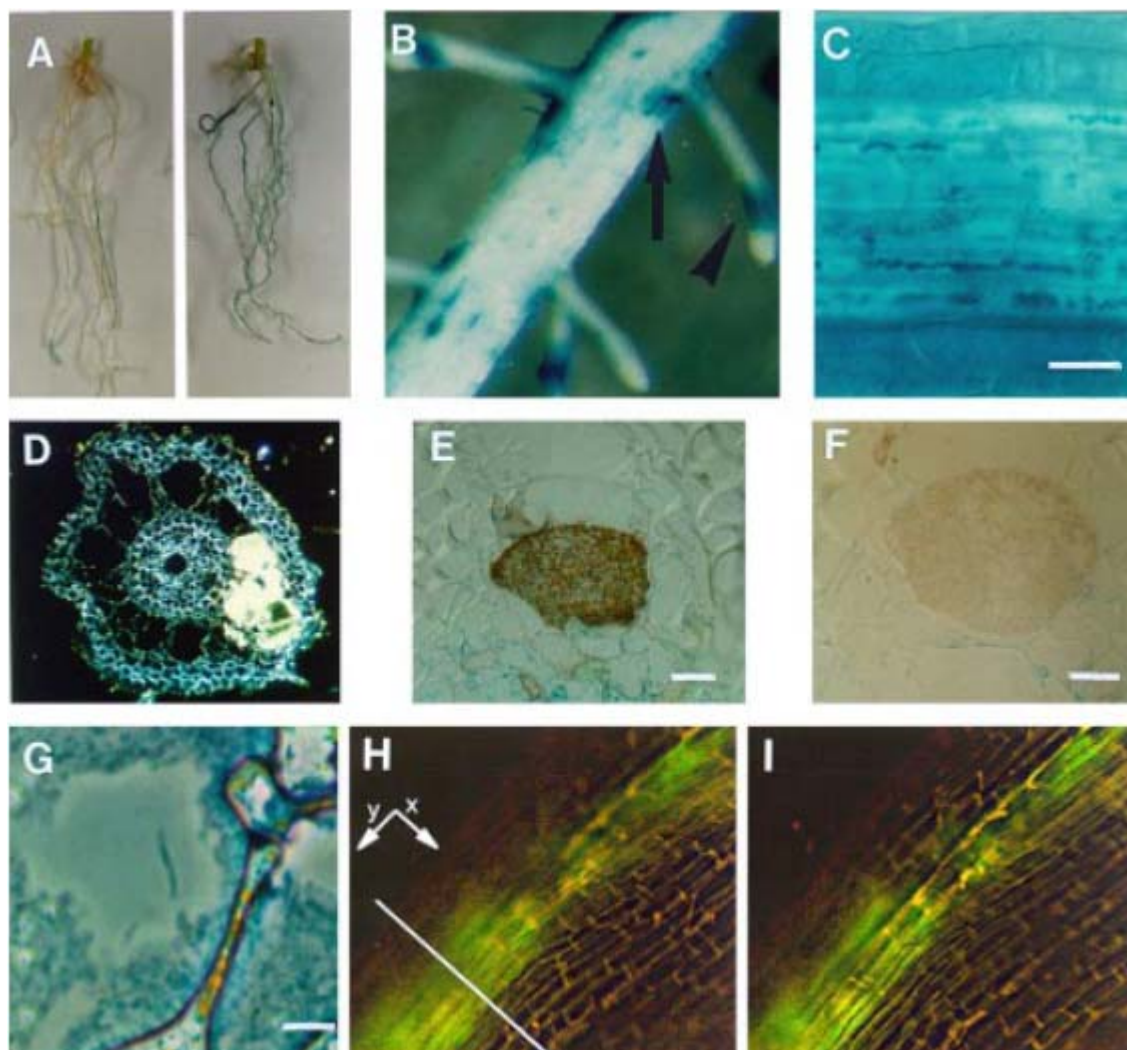


**Figure IV. 10:** Image micrographique du clone gfp-attaché du type sauvage *S. meliloti* 1021 qui colonise les différents tissus sains du riz (Chi et al., 2005)

Des expériences basées sur l'utilisation des gènes **GUS** ont révélé l'existence d'une haute expression ou activité de la nitrogénase (*nifH::gusA*) au niveau des (a) sites d'émergence des racines latérales, (James et al., 1994; James et Olivares, 1997) et (b) de la zone d'élongation et de différenciation des racines latérales (Egener et al., 1999). Contrairement aux *Azospirillum* spp. (Vande Broch et al., 1993) et du fait que ces bactéries tolèrent une forte pression d'oxygène (0.5 à 25 $\mu$ M), l'activité de la nitrogénase chez *Azoarcus* sp (BH72) a été observée dans toutes les parties de la plante (Fig. IV. 11 et 12) (Egener et al., 1999; Hurek et al., 1987b).



**Figure IV. 11:** Expression d'une fusion gène *nif::gusA* fixant  $N_2$  chez *Azoarcus* sp. Quantité d'acétylène réduit (ARA) et activité de  $\beta$ -glucuronidase (GUS) dans la fixation  $N_2$  en culture contrôlée (Egener et al., 1999)

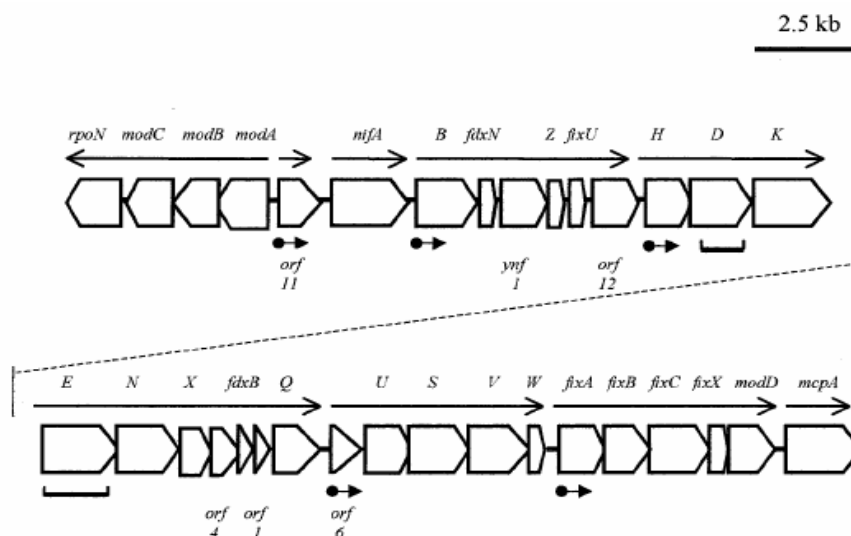


**Figure IV. 12:** Localisation de l'expression de *nifH::gusA* et *nif::gfp* bactérien, après 14 jours d'inoculation du riz avec *Azoarcus* sp. BH72. (Egener et al., 1999)

### c. Détection des gènes *nif* et *fix* chez les endophytes associatives par PCR

Des études basées sur la technique moléculaire PCR, ont révélé l'existence des gènes impliqués dans la fixation de l'azote (*nif* et *fix*) chez les endophytes associatives, notamment non originaires de rhizobia. Les gènes *nifH*, ont été décelés chez *Azoarcus* sp., associées avec les racines du riz (Egener et al., 1999) et les gènes *nifHD* et *fixABCX*, ont été identifiés chez *Azospirillum brasilense* associées avec les racines de la canne à sucre (Passaglia et al., 1991). Chez *Herbaspirillum seropedicae* associées avec les racines du maïs, du sorgho et du riz, les gènes *nif* ont été localisés dans deux régions : la région I contient les gènes *nifAB* et la région II comporte un opéron constitué de *nifHDKENX orf123* (Klassen et al., 1999; Machado et al., 1996; Pedrosa et al., 2001). Un majeur cluster des gènes *nif*, *fix* et associatifs (*mcpA*) a été caractérisé chez *Acetobacter diazotrophicus* associées avec les racines de la canne à sucre (Fig. IV. 13) (Lee et al., 2000). Les produits de gènes de ces dernières bactéries sont très similaires à ceux identifiés chez les membres des  $\alpha$ -protéobactéries, avec 17 produits ressemblant beaucoup à ceux des *Rhizobiaceae* et 9 produits sont très proches des protéines de *Rhodobacter capsulatus*.





**Figure IV. 13:** Carte des gènes *nif* majeurs d' *A. diazotrophicus* (Lee et al., 2000).

Enfin il est à noter que l'activité de la nitrogénase des diazotrophes endophytes associatives, peut être entravée par des facteurs environnementaux tels la température du sol, la pression d'oxygène (Egener et al., 1999) et le niveau de l'azote combiné dans le sol (Egener et al., 1999; Magalhães et al., 1978; Merrick et Edwards 1995; Neves et al., 1976). Cependant, chez certaines espèces comme *G. diazotrophicus*, dépourvue de l'enzyme nitrate réductase (Cavalcante et Döbereiner, 1988), l'activité de la nitrogénase n'est ni inhibée ni supprimée par la forte concentration de nitrate (25mM) (Stephan et al., 1991); mais partiellement inhibée en présence de  $\text{NH}_4^+$  (Teixeira et al., 1987).

Par ailleurs, dans les espaces intercellulaires et les cortex racinaires, ces endophytes trouvent un environnement propice pour leur prospérité et l'expression de leurs gènes. Chez la canne à sucre et au niveau de la tige, les fluides apoplastiques contiennent une importante concentration en sucres (12.5%, pH5.5) offrant ainsi des conditions optimales aux *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis et al., 1989; Stephan et al., 1991). En outre, la concentration d'oxygène à l'intérieur des racines est estimée à  $30\mu\text{M}$  (Armstrong, 1978) et la puissante respiration des agrégats bactériens réduit cette concentration et instaure ainsi une condition convenable pour l'expression des gènes *fix* dans l'espace intercellulaire (Gilbert et Frenzel, 1998). En conséquence, la tension d'oxygène à l'intérieur des tissus racinaires est permissive à l'activité de la nitrogénase de *Azoarcus* sp. (Egener et al., 1999).

### 3. 2. 5. 2. Solubilisation des phosphates

Le phosphore joue un rôle essentiel dans le transfert de l'énergie nécessaire à la croissance et à l'amélioration de la productivité des plantes. C'est un élément indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes. Sa concentration dans les sols, varie de 200 à 5000 ppm soit 0,02 à 0,5% (Lindsay, 1979). L'enrichissement du sol en P, suite à des applications de fertilisants, dépend des caractéristiques physicochimiques de ce sol. Dans les sols acides, les oxydes libres et les hydroxydes d'aluminium et de fer fixent le phosphate, tandis que dans les sols alcalins, il est fixé par le calcium, ce qui rend le fertilisant peu efficace.

Dans les sols agricoles, la solubilisation des phosphates inorganiques est étroitement liée à l'activité des micro-organismes du sol. Plusieurs rhizobactéries promotrices de la croissance telles que les rhizobia, les *Pseudomonas* et les *Bacillus*, ont été décrites comme étant des bactéries solubilisatrices du phosphate (PSB) (Igal et al., 2001).

Généralement les chercheurs associent la solubilisation des phosphates à une baisse du pH du milieu (Hedley et al., 1990). En effet, certaines souches bactériennes chimiotrophes tirent leur énergie de l'oxydation de certains éléments chimiques, avec production d'acides (Pelmont, 1993). Les travaux de Illmer et Schinner (1992) ont conclu que la solubilisation des phosphates naturels n'est pas nécessairement liée à une baisse de pH. Cependant, de nombreux micro-organismes libèrent dans leurs milieux des acides organiques en l'occurrence l'acide lactique, gluconique, isovalérique, isobutyrique, acétique, glycolique, oxalique, malonique et succinique (Rodríguez et Fraga, 1999). La production des acides organiques est considérée alors comme le principal mécanisme pour la solubilisation du phosphate par les bactéries. Goldstein et Roger (1999), ont montré que l'acidification de l'espace périplasmique par oxydation directe du glucose en acide gluconique, est le processus majeur utilisé par les bactéries Gram négatives lors du processus de la dissolution des phosphates minéraux.

Les effets bénéfiques de l'inoculation des cultures avec des microorganismes solubilisant le phosphate, ont été décrit par plusieurs auteurs (Rodríguez et Fraga, 1999; Sarawgi et al., 1999). Les rhizobia sont peut être le groupe le plus prometteur des PSB, du fait de leur capacité à fixer l'azote en plus. Plusieurs publications ont rapporté que les souches de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* solubilisant le phosphate, améliorent considérablement la croissance et la teneur en phosphore des plantes aussi bien chez les légumineuses que chez les non légumineuses (Chabot et al., 1996; Peix et al., 2001). Toutefois, l'apport bénéfique des espèces de *Bacillus*, *Escherichia*, *Arthrobacter* et *Pseudomonas*, aux cultures, est estimé de 30 à 35KgP<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ha (Datta et al., 1982; Mishra, 1985; Gaur et al., 2004).

Ainsi, et comme approche alternative pour améliorer la nutrition phosphatée des plantes, Igal et al., (2001) suggèrent l'utilisation des bactéries solubilisatrices de phosphates en tant qu'inoculum microbien seul ou en co-inoculation avec d'autres micro-organismes sélectionnés pour d'autres fonctions bénéfiques.

### **3. 2. 5. 3. Production des phytohormones par endophytes associatives**

L'implication directe de ces bactéries dans l'amélioration de la croissance et le développement des plantes *via* la production de diverses phytohormones, est unanimement reconnue (Patriquin et al., 1983; Kloepper et al., 1991; Lazarovits et Nowak, 1997). En dehors de leur rôle dans la FBN, les espèces de *Azospirillum* inoculées à diverses plantes, ont pu stimuler la production des auxines, des acides gibberellines et des cytokinines (Hartmann et Zimmer, 1994; Dobbelaere et al., 1999). *G. diazotrophicus* apportée en tant qu'inoculum a eu des effets positifs sur la production des phytohormones, activant ainsi le développement des racines initiales dont bénéficie toute la plante (Fuentes-Ramírez et al., 1993). Des résultats similaires ont été trouvés avec le riz inoculé avec *S. meliloti* et *A. caulinodans*. Contrairement aux témoins, leur présence dans la plante du riz a

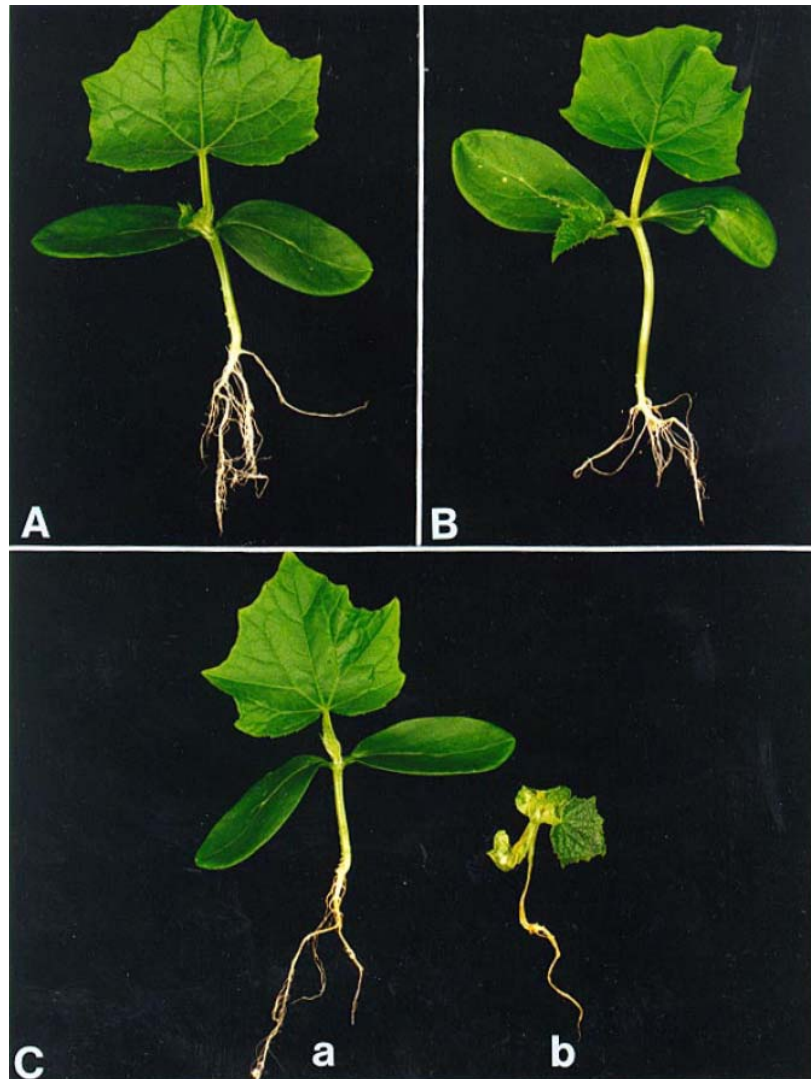
provoqué une accumulation significative des AIA et GA<sub>3</sub> dans les racines et les feuilles (Chi et *al.*, 2005). Ces endophytes induisent, non seulement, la production des phytohormones exogènes mais aussi, l'élévation du niveau d'hormone endogène chez les plantes céréalières (Chabot et *al.*, 1996; Biswas et *al.*, 2000; Hilali et *al.*, 2001; Lupway et *al.*, 2004). De nombreuses bactéries endophytes favorisent et améliorent la croissance des plantes. Quoique le mécanisme de stimulation demeure inconnu, Rodelas et *al.*, (1993) ont montré que les endophytes microbiens synthétisent et diffusent des composés chimiques promoteurs de la croissance comme les phytohormones (auxines, cytokinines et gibbérellines), les riboflavines et les vitamines (thiamine, niacine et l'acide pantothenique), ce qui suggère que ces composés peuvent être des molécules candidates pour favoriser la croissance des plantes. En effet, l'inoculation de diverses plantes avec différentes espèces d'*Azospirillum* a entraîné une bonne accumulation d'auxines, de gibbérellines et de cytokines (Hartmann et Zimmer, 1994; Dobbelaere et *al.*, 1999).

Les mécanismes de la promotion de la croissance des plantes peuvent aussi être liés à la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphore, la production des sidérophores, etc... En plus, la présence de ces endophytes facilite la prolifération des poils racinaires qui contribuent potentiellement à l'absorption des nutriments par la plante hôte (Yanni et *al.*, 1997). Cependant, de multiples expériences au champ sont requises pour fournir l'évidence directe du rôle des endophytes naturels dans la promotion des cultures.

#### **3. 2. 5. 4. Bio-protection des plantes par des bactéries endophytes associatives**

Comme les bactéries endophytes sont en contact intime avec la plante, elles constituent un choix attractif comme agents de biocontrôle. Les endophytes représentent une source importante de composés actifs biologiquement, dont certains sont actifs contre les pathogènes des plantes (Strobel, 2003). En plus de l'antagonisme direct contre les organismes pathogènes, ces bactéries bénéfiques peuvent induire une forme de résistance systémique chez les plantes. Cette induction est généralement due aux lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe des bactéries Gram négative, mais d'autres molécules comme les sidérophores et l'acide salicylique sont aussi considérés comme des molécules candidates. Les LPS induisent une série de gènes protecteurs, parmi eux ceux qui codent pour les protéines liées à la pathogenèse (PR) (Kombrink et Somssich., 1997). Sturz et *al.*, (1999) ont constaté que 61 des 192 endophytes bactériens isolés à partir des tissus de la tige de la pomme de terre étaient des agents de biocontrôle effectifs contre *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus*. Plusieurs chercheurs ont isolé et étudié l'antagonisme et l'effet des endophytes comme agents de biocontrôle (Sessitsch et *al.*, 2004) et ont suggéré que les bactéries endophytes peuvent être utilisées comme pré-traitement des graines avant leurs culture. Le traitement préalable des graines de concombre (*Cucumis sativus* L.) avec une bactérie endophyte, *Serratia phymuthica* a provoqué la suppression de l'effet du champignon, *Pythium ultimum* causateur des maladies symptomatiques chez ces plantules (Fig. IV. 14) (Benhamou et *al.*, 2000). Mais, l'application de tels traitements ne garantie pas l'établissement d'un endophytisme bénéfique ou une amélioration du rendement (Sturz et Nowak, 2000). Pour cela, les mécanismes

moléculaires de la colonisation racinaire, la spécificité d'hôte, la promotion de la croissance et l'inhibition du pathogène ont besoin d'être compris et élucidés pour réussir l'utilisation des endophytes comme agents de contrôle biologique.



**Figure IV. 14:** Effet du traitement de graine avec *Serratia phymuthica* sur le développement des symptômes causés par *Pytium ultimum* chez la plantule de concombre (*Cucumis sativus* L.). A. Témoins; B. Traitement bactérien et pas d'inoculation fongique; C. Inoculation fongique, en présence (a) ou en absence (b) du traitement bactérien (Benhamou et al., 2000)

## 4. APPROCHES D'ÉTUDES DES ENDOPHYTES ASSOCIATIVES

### 4.1. Les approches phénotypiques

Les approches phénotypiques sont toujours admises comme étape primordiale pour la séparation et l'identification des souches nouvellement isolées. Elles constituent la base pour la description formelle des taxons depuis les espèces et les sous-espèces jusqu'aux genres et familles (Vandamme et al., 1996). Chez les diazotrophes endophytes associatives, l'exploitation de leurs caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques voire écologiques était à la base de l'identification des espèces du genre *Burkholderia* (Baldani et Baldani, 2005).

### a. La tolérance aux pHs

Le pH du sol joue un rôle prépondérant aussi bien dans la survie et la prospérité des rhizobactéries, que dans la croissance de leur plante hôte. L'acidité est, généralement, plus néfaste que ne l'est l'alcalinité (Coventry et Evans, 1989). Chez les légumineuses, l'acidité du sol affecte considérablement tous les stades de la symbiose rhizobium-légumineuse (Cooper, 1982; Richardson et al., 1988) et occasionne une perte d'environ 25% de la production agricole mondiale observée dans les terres cultivables (Coventry et Evans, 1989; Munns, 1986).

Généralement, les endophytes associatifs et symbiotiques sont des bactéries neutrophiles et basophiles (Day et Döbereiner 1976; Nautiyal et al., 2000; Rivas et al., 2002). Pour les rhizobia, le pH optimal de la croissance serait compris entre 6,5 et 7,5 (Graham, 1964a). Toutefois, Jordan (1984) a montré que les bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* peuvent tolérer des pHs allant de 4.5 à 9. Pour les diazotrophes associatifs, certaines espèces ont manifesté une croissance optimale à pH5.5, et même peuvent croître à des pHs plus acides comme c'est le cas de *Gluconocetobacter diazotrophicus* qui se montre capable de croître à pH 3 et de fixer l'azote à pH 2.5 (Stephan et al., 1991). La tolérance aux pHs pourrait être un paramètre pour distinguer entre les espèces comme c'est le cas de *Burkholderia* avec *B. brasilensis* qui croît à un pH compris entre 4 et 6, et *B. tropica* qui croît à un pH supérieur à 5. (Boddey, 2003).

### b. La tolérance à la salinité

Comme l'acidité, les sols salins constituent un environnement défavorable pour la croissance de la plupart des plantes et de leurs bactéries endophytes. Contrairement à leur plantes hôtes, les endophytes symbiotiques et associatives peuvent tolérer et survivre en présence d'une salinité élevée, que se soit en culture (El Sheikh et Wood, 1989; Reva et al., 2002) ou dans le sol (Nautiyal et al., 2000; Tilak et al., 2005).

Plusieurs études ont révélé une grande variabilité dans la tolérance à la salinité chez les bactéries endophytes symbiotiques ou associatives. En effet, les rhizobiums isolés des nodules des légumineuses, telle que *Hodysarum*, *Acacia*, *Prosopis* et *Leucaena*, ont été, en culture pure, tolérants à 500- 800mM NaCl (Mohammed et al., 2000; Tilak et al., 2005) et ceux isolés des nodules de Lupin ont été susceptibles de croître en présence de 10%NaCl (Zahran et al., 1994). Les espèces de *Bacillus*, en occurrence *B. endophyticus* sp., isolées à partir de tissus de cotonnier (*Gossypium* sp.) ont manifesté une croissance optimale en présence de 10% de NaCl (Riva et al., 2002).

L'adaptation des bactéries aux fortes concentrations en sel est due à leur faculté de synthèse et d'accumulation intracellulaire des solutés compatibles. Ces solutés ont pour rôles d'osmo-régulation et protection des bactéries contre les effets de stress salin. Les principaux solutés rencontrés chez les bactéries sont: les ion K<sup>+</sup>, glycine, betaïne, proline, glutamate, divers glucides

et N-acetylglutaminy-glutamine amide (Boncompagni et *al.*, 1999; Craig et *al.*, 1991; D'Souza-Ault et *al.*, 1993; Le Rudulier et Bernard, 1986).

### **c. La résistance intrinsèque aux antibiotiques**

La résistance intrinsèque aux antibiotiques constitue un marqueur très important pour identifier une souche de rhizobium ou autres bactérie, nouvellement introduite dans un sol donné (Batzli et *al.*, 1992). La tolérance aux antibiotiques varie en fonction de la souche bactérienne, du type d'antibiotique et de sa concentration dans le milieu (Graham, 1963). Selon Schwinghamer (1967), Cole et Elkan (1979), des espèces bactériennes appartenant au *Rhizobium* sp., ont été capables de manifester une résistance multiple à différents types d'antibiotiques (Mohammed et *al.*, 2000; Maâtallah et *al.*, 2002). D'autre part, diverses souches appartenant au *Burkholderia*, notamment *B. vietnamiensis* isolées à partir du riz, ont exhibé un caractère de multiple résistance vis-à-vis de différents types d'antibiotiques (Gillis et *al.*, 1995).

### **d. Résistance intrinsèque aux métaux lourds**

Les métaux lourds, éléments chimiques possédant des propriétés métalliques complexant, sont nombreux et très répandus dans l'environnement. Certains sont essentiels pour les fonctions biologiques, comme la croissance, la reproduction et la survie, d'autres n'ont aucune fonction biologique connue (Giller et *al.*, 1998). Plusieurs métaux, nécessaires en quantité infime pour certains processus, peuvent devenir néfastes quand ils sont présents à doses élevées et polluantes. La toxicité des métaux lourds dépend donc de leur concentration dans le sol, de leur nature, de la présence d'autres métaux et du type d'organisme qu'ils affectent.

Pour les rhizobiums, de nombreuses études ont rapporté l'effet néfaste de ces métaux aussi bien sur la survie que sur le processus de la fixation d'Azote. Il a été rapporté qu'un excès en manganèse altère la composition des exopolysaccharides chez *S. meliloti* (Appana et Preston, 1987), de même que le zinc et le cuivre sont inhibiteurs de la croissance bactérienne à des concentrations supérieures à 100 ppm, alors que le molybdène et le manganèse ne le sont pas. La sélection de souches résistantes aux métaux lourds serait d'une importance capitale pour l'inoculation au champ.

## **4.2. Les approches moléculaires**

Diverses méthodes génétiques sont, actuellement, utilisées pour identifier et classer les bactéries endophytes symbiotiques et associatives. Chacune permet une classification phylogénétique à un niveau précis allant du genre, espèce, sous-espèce et biovar jusqu'à la souche spécifique. Cependant, chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients qui se manifestent au niveau de la résolution. Ainsi, une panoplie d'analyse moléculaire des acides nucléiques (ADN et ARN) permet d'évaluer les similarités et les dissemblances entre les bactéries isolées, à des degrés phylogénétiques différents (Vandamme et *al.*, 1996). La recombinaison de plusieurs techniques permet de révéler à la fois des divergences génétiques au sein des groupes bactériens considérés auparavant comme homogènes, et des relations taxonomiques entre des groupes très éloignés.

#### 4. 2. 1. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction

L'extrait d'ADN génomique est directement digéré par des enzymes endonucléases puis mis à migrer sur gel d'agarose. Le polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP) obtenu, permet de comparer et de classer les individus testés. Cette méthode simple et classique a été utilisée chez les bactéries endophytes symbiotiques, *Rhizobium* (Hartmann et Amarger 1991; Kuykendall et al., 1992; Anyango et al., 1995; Rivas et al., 2002; Trujillo et al., 2005) et chez les bactéries endophytes associatives (Soares-Ramos et al., 2003).

La technique RFLP peut être combinée avec l'utilisation de sondes spécifiques marquées, ce qui permet d'augmenter son caractère discriminant (Kuykendall et al., 1992) ou encore couplée avec la technique PCR.

#### 4. 2. 2. Les méthodes d'amplification génomique

L'amplification d'ADN, appelé PCR (Polymerase Chain Reaction) est l'une des techniques, certainement, la mieux adaptée pour étudier la biodiversité bactérienne (Vandamme et al., 1996). Elle est dotée de caractérisation rapide, simple et nécessitant très peu de matériel biologique. En plus, elle offre la possibilité d'obtenir un grand nombre de copies d'une séquence nucléique cible à partir d'une faible quantité d'ADN. L'ADN amplifié peut être directement séquencée et analysée (Chaintreuil et al., 2000; Soares-Ramos et al., 2003; Yanagi et Yamasato 1993; Willems et Collins 1993). Cependant, cette technique est souvent couplée avec l'analyse du polymorphisme des fragments de restriction (PCR/RFLP). Les données analytiques obtenues à partir des produits d'amplification des régions spécifiques d'un génome et leur digestion par des endonucléases, permettent d'estimer la diversité génétique à un niveau élevé.

##### a. La PCR/RFLP des gènes ribosomiques

La PCR/RFLP des gènes ribosomiques 16S, 23S, 5S et ITS, a été utilisée par plusieurs chercheurs pour estimer la diversité génétique chez les rhizobiums (De Lajudie et al., 1994; Herrera-Cervera 1999; Chen et al., 2001; Chen et al., 2003; van Burkum et Eardly 2002; Vandamme et al., 2002) et chez les bactéries endophytes associatives (Cruz et al., 2001; Mittal, 2004; Rangarajan et al., 2001; Santos et al., 2001).

La PCR/RFLP du gène 16S ADNr, communément appelée ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) est, sans doute, la plus utilisée pour évaluer les relations phylogénétiques entre les bactéries (Young et Haukka 1996). En effet, les résultats de l'analyse du polymorphisme de taille des fragments de restriction des gènes 16S rADN obtenus pour neuf enzymes de digestion, ont permis de différencier entre les espèces de rhizobium (Laguerre et al., 1994). Ces auteurs ont rapporté que l'utilisation d'au moins quatre de ces enzymes est nécessaire pour décrire la totalité des espèces connues et d'au moins deux pour différencier les cinq espèces nodulant le haricot. Par ailleurs, la technique ARDRA a permis à Cruz et al., (2001), utilisant seulement quatre enzymes de restriction *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* et *RsaI*, de caractériser 52 bactéries

fixatrices d'azote, isolées à partir de tissus de banane (*Musa* spp.) et d'ananas (*Ananas comosus* (L) Merrill).

#### **b. PCR/RFLP des gènes symbiotiques**

Par ailleurs, le développement de la PCR/RLFP sur les gènes symbiotiques, notamment les gènes *nif*, a permis d'obtenir plus facilement les mêmes types d'information que ceux obtenus par la PCR/RLFP des gènes ribosomiques (Dobert et al., 1994; Haukka et al., 1998; Hurek et al., 2002; Laguerre et al., 1994; Laguerre et al., 1997; Laguerre et al., 2001; Pedrosa et al., 2001; Ueda et al., 1995; Young, 1992).

#### **4. 2. 3. La PCR des séquences répétées**

Aussi, une nouvelle technique plus pointue et performante par rapport à la RAPD a vu le jour grâce aux travaux de nombreux auteurs qui ont découvert des familles de séquences inter-géniques (De Bruijn, 1992). Ces familles contiennent, en plusieurs copies dans le génome de la plupart des bactéries gram- et quelques gram+, des séquences répétées inter-géniques courtes et hautement conservées dans l'espèce (Luspki et Weinstok, 1992). Trois familles des séquences répétées ont été identifiées et largement étudiées, comprenant la séquence répétée extra-génétique palindromique (REP) de 35 à 40pb, la séquence inter-génique répétée consensus (ERIC) de 124 à 127pb, et l'élément Box de 154pb contenant trois unités: BoxA, BoxB et BoxC (Versalovic 1991; 1994).

Les produits de la PCR/REP et ERIC, utilisant l'ADN comme matrice et des amorces spécifiques, ont montré, après migration sur gel d'agarose, des bandes très caractéristiques (De Bruijn, 1992). Depuis, ces PCR sont considérés comme des méthodes efficaces pour établir l'emprunte génomique des bactériens. Du fait que ces séquences sont hautement conservées chez les *Rhizobiaceae*, leur amplification est utilisée pour le typage et la phylogénie des rhizobiums (De Bruijn 1992; Santos et al., 1999; Schneider et De Bruijn, 1996; Vinusesa et al., 1998) ainsi que pour étudier la diversité et la taxonomie de certaines bactéries endophytes associatives (Mittal, 2004).



## Chapitre V: Diversité moléculaire des endophytes de *Ceratonia siliqua*

### 1. INTRODUCTION

Lors des travaux de recherche effectués dans le cadre d'un DESA (Konaté 2001), nous avons montré que l'examen du système racinaire de plusieurs dizaines de plantes de caroubier, au cours d'une sortie sur le terrain dans différentes régions du Maroc, n'a révélé la présence d'aucune nodosité. Par ailleurs, les essais d'isolement de rhizobiums autochtones au laboratoire par la méthode du piégeage, à partir des sols collectés au niveau des racines de chacune des plantes examinées sur le terrain, ont confirmé l'absence de nodosités racinaires chez le caroubier.

Ces résultats nous ont confronté avec deux situations opposées (i) d'une part, selon Martins-Loução et Rodriguez-Barrueco (1982), Martins-Loução et *al.*, (1996b) et Hirsh et *al.*, (2001), le caroubier est une légumineuse non nodulable; (ii) d'autre part, Missbah et *al.*, (1996) ont démontré le contraire en isolant, dans la région de Debdou (Maroc), de souches de rhizobium nodulant le caroubier. Devant cette situation, nous avons réactivé, purifié la collection des souches isolées par Missbah et *al.*, (1996) et procédé à un test d'authentification en les inoculant à deux provenances du caroubier (Marrakech et Taounate) cultivées dans des conditions axéniques. L'examen du système racinaire des plantes, effectué à 2, 4 et 6 mois après l'inoculation, n'a montré aucune formation de nodosité.

L'absence de nodulation au niveau des racines de différentes provenances de caroubier cultivées sur les sols collectés aux pieds des arbres donneurs de graines, l'inaptitude des souches de la collection à renoduler le caroubier, ainsi que l'observation surprise des bactéries émanant des tiges prélevées des plantules utilisées en culture *in vitro* pour la rhizogénèse, nous ont amené à examiner certains organes végétatifs susceptibles d'abriter des bactéries rhizobiales. Le résultat de ce premier essai, a montré que le caroubier abrite dans son système racinaire des endophytes dont on ignore l'identité et l'appartenance phylogénétique.

Ce chapitre concernera principalement l'isolement des bactéries endophytes associées au caroubier et l'examen de leur diversité *via* l'approche moléculaire REP/PCR afin de les caractériser et de les regrouper.

### 2. MATERIEL ET METHODES

#### 2. 1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de gousses du caroubier récoltées de différentes régions du Maroc. Le matériel biologique de chaque région est considéré comme une accession et au total 11 accessions ont été utilisées dans cette étude : Taourirt, Al Houceima, Taounate, Aïn Safa, Akchort, Demnate, Ouazzane, Sidi Bou Othmane, Essaouira, Tétouan et Oued Laou.

Les graines ont été scarifiées avec  $H_2SO_4$  à 95%, mises à germer dans des boîtes de pétri contenant l'eau semi gélosée (7g d'agar/L), à 28°C et à l'obscurité pendant 2 à 3 jours.

Les graines germées ont été transférées dans des pots contenant du sol, puis placés dans une chambre de culture. Après six mois (fig. V. 1), les plantules ont été déterrées, les racines et les épicotyles sectionnés et préparés pour l'isolement des bactéries.

Il est à noter qu'un seul sol originaire de la station de recherche forestière M'Khinsa, a été utilisé pour piéger les endophytes de toutes les accessions, excepté celle de Oued Laou qui a été ramenée au laboratoire sous forme de plantules en cultures sur le sol d'origine.

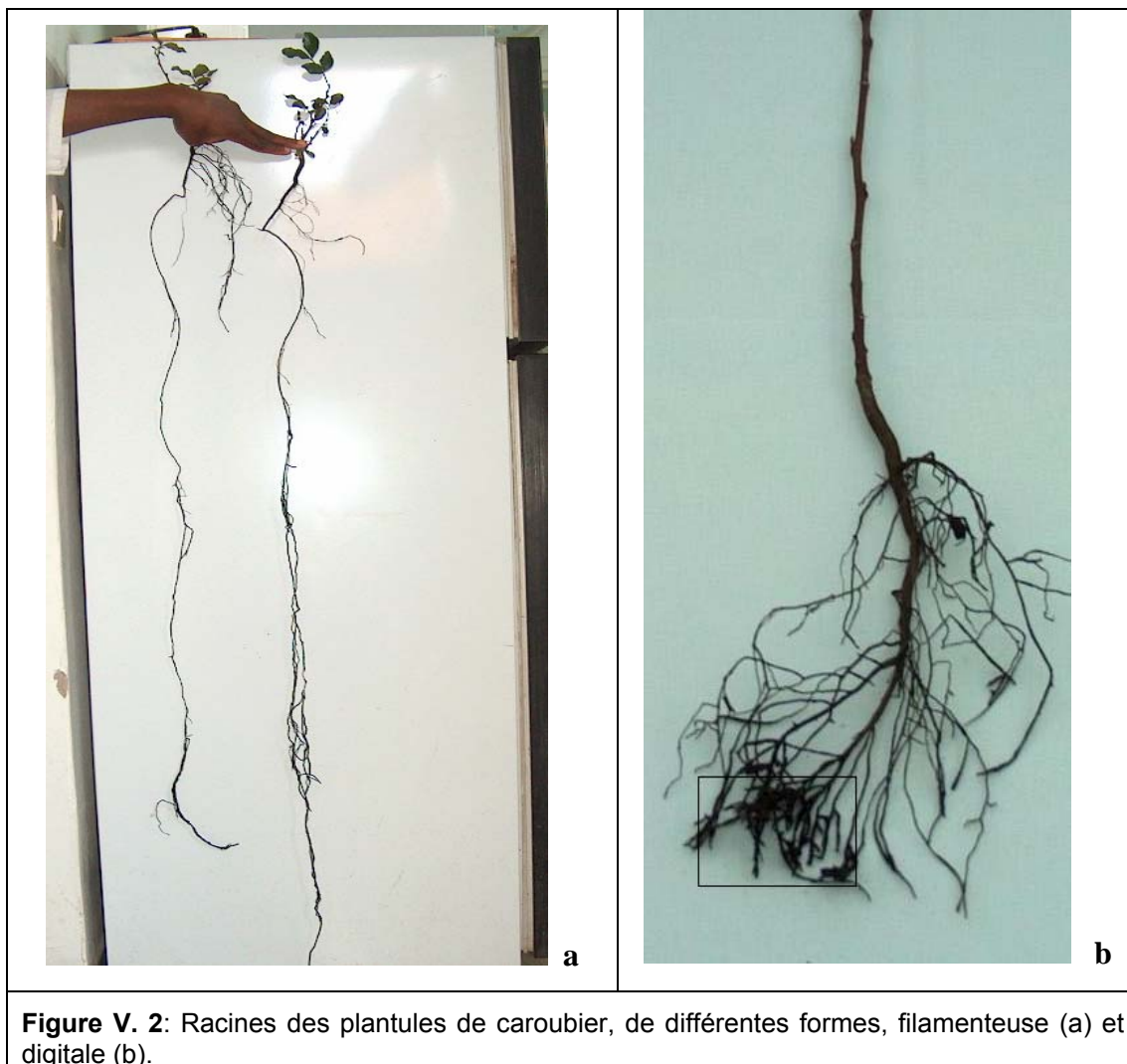


**Figure V. 1:** Culture des plantules sur sol pour piéger les rhizobactéries.

## **2.2. Isolement des bactéries endophytes**

### **2. 2. 1. Isolement à partir des racines**

Les racines des plantules de caroubier ne sont pas uniformes. La taille des racines est inégale entre les différents individus de même âge, et cette inégalité est par fois très spectaculaire (Fig. V. 2 a et b). On rencontre souvent, chez le même individu, deux formes différentes de racines: une forme filamenteuse et une forme digitale ou palmée (Fig. 2b). Les racines de forme digitale sont séparées du reste, désinfectées avec  $HgCl_2$  (0.1%) pendant 5 min, rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile et broyées dans 1ml d'eau distillée stérile. Puis, 0.5ml du broyât est étalé sur le milieu YEM solide et incubé à 28°C pendant une semaine.



**Figure V. 2:** Racines des plantules de caroubier, de différentes formes, filamenteuse (a) et digitale (b).

### 2. 2. 2. Isolement à partir des épicotyles

Les épicotyles sont traités successivement avec SDS (0.01%) pendant 2h,  $HgCl_2$  (0.1%) pendant 10min, puis lavés plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile avant d'être sectionnés en petites portions de 0.5 à 1cm de longueur. Ces portions sont en suite déposées sur le milieu semi gélosé (Mocali et al., 2003; Reva et al., 2002) et incubées à 28°C pendant une semaine.

Les colonies bactériennes issues des racines (IRC) et des épicotyles (IEC) ont été repiquées et purifiées sur le milieu YEM solide (Vincent, 1970). Les bactéries pures sont stockées dans du glycérol (40%) à -20°C.

### 2.3. Etude de la diversité génétique par PCR/REP

Bien qu'à l'heure actuelle diverses techniques moléculaires utilisant l'amplification d'ADN (PCR) sont disponibles, les techniques les plus simples, moins coûteuses et reproductibles, ont depuis les années 90 suscité d'énormes intérêts pour la caractérisation des isolats bactériens (Caetano-Anolles et al., 1991; De Bruij, 1992; William et al., 1990). La technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) a fait, au début, l'objet de plusieurs convoitises dans les études de différenciation entre les isolats des bactéries endophytes symbiotiques (Dooley et al., 1993; Harrison et al., 1992) et associatives (Soares-Ramos et al., 2003). Malgré sa simplicité de mise en

œuvre au laboratoire, elle exige généralement l'utilisation de plusieurs amorces (au moins une dizaine) ce qui la rend plus lourde à appliquer sur un grand nombre d'isolats bactérien, impliquant aussi des problèmes de reproductibilité et des difficultés dans l'interprétation de ses résultats. Par conséquent, elle est de plus en plus moins privilégiée voir progressivement remplacée par d'autres techniques plus orientées.

Ainsi, une nouvelle technique, la PCR/REP (Repetive Extragenic Palindromic), plus performant par rapport à la RAPD et utilisant des amorces reconnaissant différents types de séquences répétitives inversées et omniprésentes dans différentes zones d'ADN génomiques des eubactéries (De Bruij, 1992; Luspki et Weinstok, 1992; Versalovic et *al.*, 1991), est le plus souvent utilisée dans les études de diversité. Ses amorce spécifiques permettent l'accès à tout le génome bactérien par l'amplification des séquences d'ADN répétitives existant en plusieurs copies et hautement conservées dans le génome de la plupart des bactéries Gram négatif et quelques Gram positif (Lupski et Weinstok, 1992). L'avantage lié à la haute conservation de ces séquences inter-géniques répétées, surtout chez les *Rhizobiaceae*, a favorisé l'utilisation de la technique PCR/REP par plusieurs chercheurs pour le typage et la phylogénie des rhizobiums ou des endophytes associatives (De Bruij, 1992; Rademaker et *al.*, 2000; Schneider et De Bruij, 1996; Vinuesa et *al.*, 1998).

Nous avons eu recours à l'utilisation de cette technique PCR/REP pour pouvoir étudier la diversité génétiques des souches de caroube et sélectionner les souches représentatives de chaque groupe REP afin d'établir leur phylogénie et procéder à d'autres études ultérieures.

### **2.3. 1. Souches bactériennes**

69 isolats racinaires et 11 isolats épicyotylaires, ont été utilisés pour le test moléculaire. En plus, 7 souches de la collection des rhizobia de caroubier isolées par Missbah et *al.*, (1996), en l'occurrence, RCM3, RCM4, RCM5, RCM7, RCM9, RCM10 et RCM11, ainsi que 13 souches de référence appartenant à cinq genres de la famille des rhizobiacées, notamment, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium*, sont incluses dans cette analyse moléculaire.

### **2.3. 2. Extraction d'ADN**

L'extraction d'ADN génomique a été menée selon le protocole d'Ausubel et *al.*, (1987) utilisant le phénol chloroforme, que nous avons adapté à nos conditions de travail.

Pour palier à la production des polysaccharides par certains isolats bactériens, la culture des bactéries est faite sur le milieu TY solide: 2.5g Tryptone, 1.5g Levure, 0.35g CaCl<sub>2</sub> et 12g Agar. Après 48h d'incubation à 28°C, une quantité suffisante de la culture est prélevée avec un cure dent stérile et déposée dans un eppendorf stérile contenant 435µl du tampon TE (pH8.0, Tris 50mM, EDTA 50mM), 50µl du détergeant SDS (10%) et 15µl de NaCl (5M). Après addition de 4µl de protéinase K (10mg/ml) et une agitation vigoureuse, les eppendorfs sont incubés à 37°C pendant une nuit. Les lysats sont traités par un même volume (v/v) du mélange

phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1), qui permet l'élimination efficace des protéines, puis mixés et centrifugés à 13000g pendant 15min. Les 400µl de la phase supérieure prélevés sont traités avec un même volume (v/v) de chloroforme/alcool isoamylique (24:1) et centrifugés. Afin de précipiter l'ADN, 30µl d'acétate de sodium (3M) ainsi que 600µl d'éthanol absolu froid (-20°C) sont ajoutés aux 300µl de la phase aqueuse récupérée ; le tout est mélangé et incubé à -20°C pendant une nuit. Après une centrifugation à 13000g pendant 25min, le culot obtenu est lavé avec 500µl d'éthanol froid (70%), puis séché sous vide par le Speed Vac. Le culot est ensuite re-suspendu dans 50µl de TE (pH7.4, Tris 10mM, EDTA 1mM), puis incubé à 4°C pendant une nuit. L'ADN est enfin purifié par l'ajout de 2µl d'ARNase (1mg/ml) et incubé à 37°C pendant 1h.

La concentration d'ADN est déterminée par la mesure de la densité optique à 260nm:  $C_i = DO_{260} \times 50 \times \text{facteur de dilution}$ . Avec 1DO= 50ng/µl.

### 2. 3. 3. Condition d'amplification

Afin d'amplifier les séquences d'ADN répétitives, naturellement présentes en plusieurs copies dans le génome des bactéries (Lupski et Weinstock, 1992), nous avons eu recours à l'utilisation de deux amorces universelles: REP R1 de séquence 5'-IIICGICGICATIGGC-3' et REP R2 de séquence 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3' (Versalovic et *al.*, 1991).

Le mélange réactionnel conçu pour l'amplification PCR est celui décrit par De Bruij (1992) avec de modifications. Ainsi, les réactions d'amplification ont été réalisées dans un volume de 28µl contenant les éléments cités dans le tableau (V. 1).

L'amplification de l'ADN a été conduite dans un thermocycleur (Amplifon Bioblock Scientific) selon le programme suivant, décrit par Grundmann et *al.*, (1997).

Dénaturation initiale de l'ADN: 94°C, 3min	} 30 cycles
Dénaturation de l'ADN: 94°C, 1min	
Hybridation des amorces sur l'ADN: 40°C, 1min	
Extension des amorces: 65°C, 8min	
Extension finale d'ADN hybridé: 65°C, 16min	
Maintient d'ADN amplifié: 4°C, + ∞	

**Tableau V. 1:** Composition du mélange réactionnel pour l'amplification PCR/REP

Composition du mixte	Concentration de la solution mère	Volume (µl) de prise pour 1 échantillon
<b>DdH2O</b>	1	14.2
Tampon (PCR)	10x	3
MgCl <sub>2</sub>	25mM	3.5
DNTP	10mM	1.2
DMSO	10%	3
REP R1	30pmol/µl	0.3

REP R2	30pmol/μl	0.3
BSA	20mg/ml	1
<i>Taq</i> polymerase	5U	0.5
<b>ADN</b>	100ng/μl	1

Pour matérialiser et interpréter les résultats de PCR/REP, 15μl de chaque produit d'amplification, additionné de 3μl du tampon de charge (loading day 6x, Promega), ont été déposés sur un gel d'agarose horizontal 1.2% dans un tampon de TBE (0.89M Tris; 0.89M Acide Borique; 25mM EDTA). La migration d'électrophorèse est déclenchée pour une durée de 4h à 80 volts. Deux marqueurs de poids moléculaires différents, 100pb et 1kb (Promega) ont été utilisés pour chaque gel, afin d'évaluer la taille des différents fragments amplifiés. Après la coloration des gels dans une solution de bromure d'éthidium (0.1%) pendant 20min, la visualisation des bandes est réalisée sur un transilluminateur UV, puis photographiées et scannées à l'aide du logiciel Perfect Image V. 6.

### 2. 3. 4. Analyse numérique

Les distances de migration des bandes de chaque marqueur de poids moléculaire dont les tailles sont connues, ont été mesurées pour tracer une courbe logarithmique spécifique à chaque gel. Allant du même principe, la taille des différents fragments obtenus, à partir de l'amplification d'ADN de chaque souche, a été déterminée. Ainsi, une matrice bidimensionnelle, basée sur la présence ou l'absence de bandes, a été construite permettant de comparer les profils entre eux. Sur la base de cette comparaison, un dendrogramme a été établi en utilisant le logiciel STATISTICA et la méthode de moyenne des groupements non associés (UPGMA). Cette dernière méthode a été appliquée par plusieurs auteurs pour analyser le polymorphisme des empreintes géniques engendrés par PCR/REP, notamment chez les souches rhizobiales (Van Belkum et *al.*, 1996; Versalovic et *al.*, 1994; Versalovic et *al.*, 1995).

## 3. RESULTATS ET DISCUSSION

### 3.1. Isolement de bactéries endophytes à partir des racines et épicotyles

L'isolement des bactéries à partir des racines et des épicotyles des plantules du caroubier âgées de six mois nous a permis de constituer une collection de bactéries endophytes (fig. V. 3). Cette collection est faite à partir de 9/11 accessions; les plantules originaires de Al-Houceima et de Taourirte n'ont révélé aucune infection ni de leur système racinaire ni de leur système épicotylaïre. Les endophytes isolés des racines et ceux isolés des épicotyles sont nommés, respectivement IRC (Isolat Racinaire de Caroubier) et IEC (Isolat Epicotyilaïre de Caroubier).

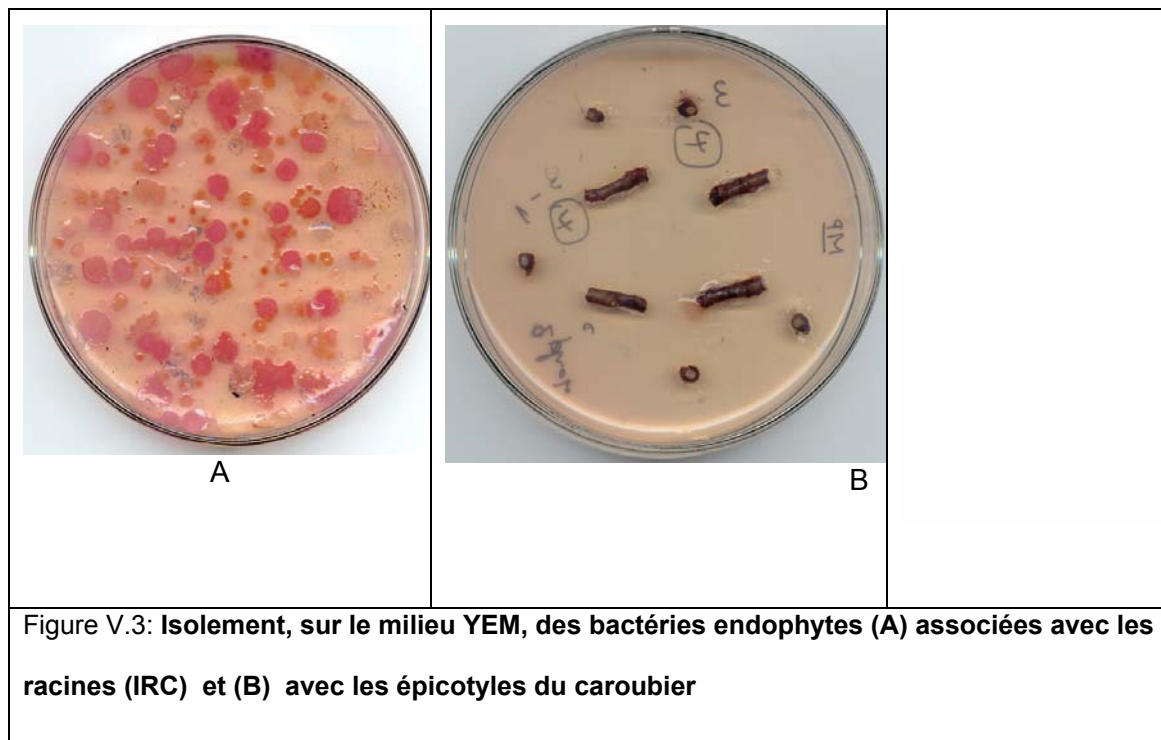


Figure V.3: Isolement, sur le milieu YEM, des bactéries endophytes (A) associées avec les racines (IRC) et (B) avec les épicotyles du caroubier

Au total, 73 bactéries endophytes ont été isolées à partir des racines, dont une grande proportion est issue des accessions de Taounate et de Ouazzane et la plus faible proportion est enregistré avec l'accession de Akchourt (Tableau V. 1). Par ailleurs, 11 endophytes ont été également isolés à partir des épicotyles des plantules originaires de trois accessions seulement. Plus de 50% de ces isolats sont obtenus des plantules provenant de l'accession de Sid Bou Othman.

Ces résultats témoignent clairement que des bactéries endophytes associatives peuvent nicher à l'intérieur des tissus des organes végétatifs du caroubier, en occurrence les racines et les épicotyles, sans pourtant lui induire de maladies symptomatiques ou latentes.

L'isolement d'un plus grand nombre de bactéries endophytes chez les plantules appartenant à l'accession de Taounate et la constatation de leur absence chez les plantules des deux accessions, Al-Houciema et Taourirte, cultivées dans les mêmes conditions (même type du sol), laissent suggérer qu'il existerait un certain niveau de compatibilité ou sélection entre les bactéries autochtones présentes dans le sol et les plantules de caroubier de différentes provenances. Ceci pourrait aussi être dû à la différence entre les exsudats racinaires que produit chaque plante, et qui déterminent la charge bactérienne présente dans la rhizosphère. En effet, la population de la rhizosphère est affectée par le génotype de la plante, car celui-ci influence sur la composition des exsudats racinaires. Le génotype des plantes diffère selon les accessions, ainsi chaque plante hôte sélectionne en quelque sorte les micro-organismes qui vont nicher à l'intérieur de ses organes et vivre endophytiquement.

**Tableau V. 2:** Bactéries endophytes isolées à partir des racines et des épicotyles des plantules de caroubier originaires de différentes régions de Maroc.

Accession	Origine d'accession	Présence de bactérie	Type d'organe	% de IRC	% de IEC
1	Taourirt	-	-	-	-
2	Al Houceima	-	-	-	-
3	Taounate	+	racine épicotyles	<b>26</b>	<b>36.4</b>
4	Aïn Safa	+	racine	5.5	0
5	Akchort	+	racine	1.4	0
6	Demnate	+	racine	9.6	0
7	Ouazane	+	racine	<b>20.5</b>	0
8	Sidi Bou Othmane	+	racine épicotyles	4.1	<b>54.5</b>
9	Essaouira	+	racine épicotyles	4.1	9.1
10	Tétouan	+	Racine	16.4	0
11	Oued Laou	+	racine	12.4	0
Total	11	<b>73 IRC</b> <b>11 IEC</b>		100	100

Dans un écosystème naturel (sol), les plantes développent un continuum d'interactions avec les micro-organismes rhizosphériques, notamment des relations associatives, et certaines bactéries peuvent passer du système racinaire aux tiges et aux feuilles *via* le xylème (Compant et al., 2005 ; Curl et Truelove, 1986; Weller, 1988). Naturellement, les plantes exercent une pression sélective sur les bactéries endophytes, leur fournissant une niche compatible, riche en source d'énergie et où les bactéries sélectionnées sont épargnées de toutes compétitions et protégées des stress environnementaux (Kleopfer et Beauchamp, 1992).

Le nombre d'isolats racinaires que nous avons obtenu est plus important que celui des isolats épicotylaires, ceci peut être expliqué par le fait que le système racinaire est le premier colonisé par les bactéries endophytes. Ces dernières, une fois à l'intérieur, sont confrontées aux différents obstacles inhérents à la plante réduisant leur densité dans les organes supérieurs de la plante. Selon Frommel et al., (1991) et Compant et al., (2005), un nombre substantiel de bactéries endophytes associatives ( $10^3$  à  $10^7$  cellules) peut coloniser le système vasculaire (Phloème et xylème) de la plante hôte avec une importante densité dans les racines et qui diminue progressivement en allant vers les feuilles.

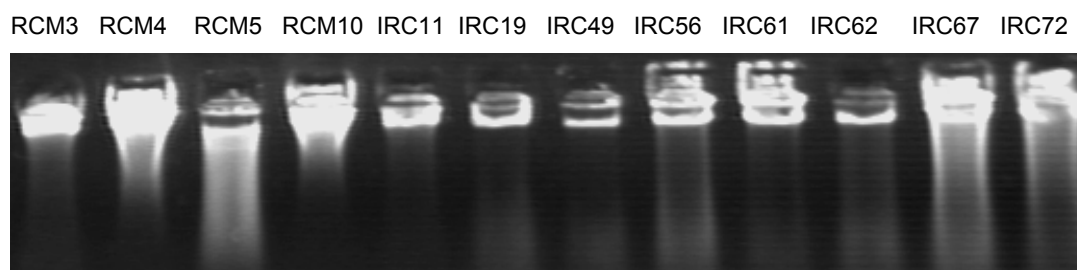
Actuellement, plusieurs auteurs ont rapporté la capacité de différentes bactéries d'infecter et de coloniser l'intérieur des racines, tiges et/ou feuilles d'une large gamme de plantes mono et dicotylédones. Ainsi, certaines plantes telle que la canne à sucre (Baldani et al., 1986a), la vigne (Compant et al., 2005), le riz (Christiansen-Weniger, 1996; Yanni et al., 1997), le maïs (Seghers et al., 2004), le caféier (Jimenez-Salgado et al., 1997), le sorgho (James et al., 1997), le blé (Sabry



et *al.*, 1997; Webster et *al.*, 1997), le bananier (Cruz et *al.*, 2001), etc..., ont été rapportées d'être capables de tisser une association bénéfique avec différents types de bactéries endophytes. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont rapporté l'association des rhizobiums en tant qu'endophytes naturelles avec le riz où ils peuvent migrer des racines aux feuilles. Ces rhizobiums endophytes associatives ont engendré des effets bénéfiques sur la croissance et la productivité des plantes légumineuses ou non légumineuses (Chi et *al.*, 2005).

### 3.2. Diversité génétique des isolats endophytes *via* la REP

Afin d'évaluer leur diversité génétique, 87 isolats endophytes du caroubier dont 69 IRC, 11 IEC, 7 RCM ainsi que 13 souches de référence de différents genres de rhizobium ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire par REP/PCR. L'extraction par la méthode phénol/chloroforme a donné une très bonne quantité et qualité d'ADN (figure V.5).



**Figure V. 5:** Extrait de l'ADN génomique d'une série de souches IRC et RCM

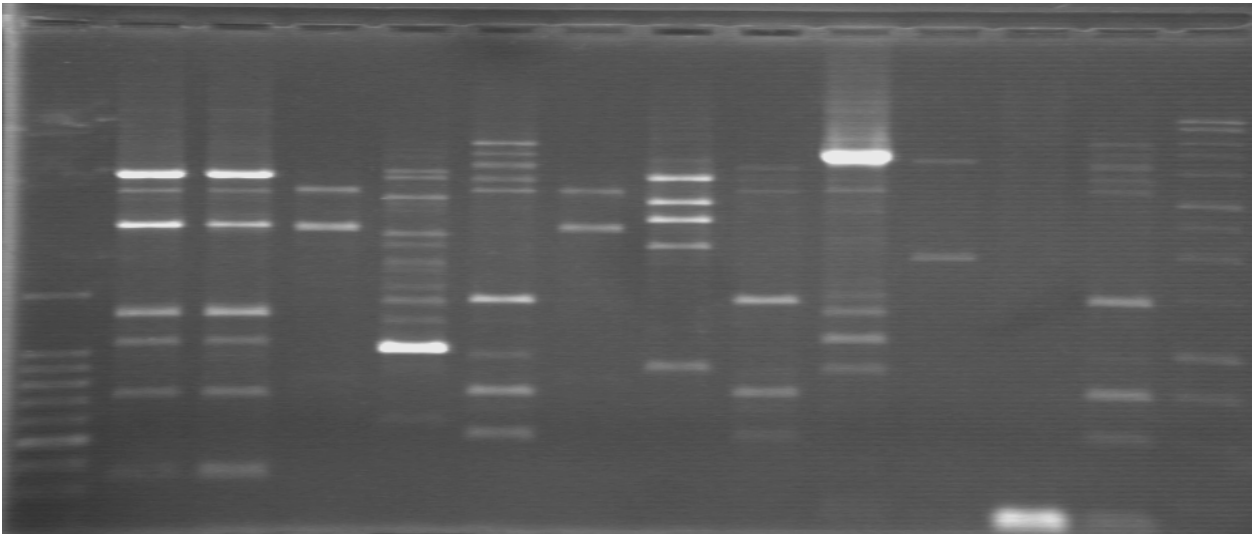
L'amplification de l'ADN génomique n'a pas été positive pour toutes les souches, seules 50 isolats racinaires (IRC) ont été amplifiées, par contre les isolats épicotylaires (IEC) et les souches de la collection RCM ont été toutes amplifiées. Le tableaux (Tableau V. 3, 4) résume les résultats de l'amplification des souches ainsi que le nombre des bandes obtenues et leur taille.

L'amplification des séquences répétitives de l'ADN des souches, utilisant les amorces spécifiques REP, a abouti à l'obtention des bandes d'ADN distinctes dont la taille est variable au sein de même groupe de souches et entre les groupes de différentes origines. Ainsi, pour les souches de IRC, la taille des fragments d'ADN amplifié est comprise entre 380 et 7250pb. Tandis qu'elle varie de 1740 à 6025pb pour les souches IEC et de 660 à 4170pb pour les souches de collection RCM (Tableau V. 3, 4). Par ailleurs, la taille des fragments d'ADN enregistrés par d'autres auteurs, variait de 250 à 5000pb (De Bruij, 1992; Bennani, 2004; Maâtallah, 2003; Spigalia et Mastrattonio, 2003).

Nous avons constaté, en outre, une grande variation dans le nombre de bandes l'ADN amplifié. Pour les souches originaires des racines, une seule bande a été obtenue avec les IRC52, IRC54, IRC60 et IRC68; et 11 bandes avec une seule souche IRC56. Concernant les souches de collection, nous avons obtenu 2 bandes avec RCM5 et 11 bandes avec RCM10 (Fig. V. 6). Pour les bactéries d'origine épicotylaire, 2 bandes ont été obtenues avec toutes les souches excepté IEC4 qui a donné 4 bandes (Fig. V. 7). Des auteurs ont estimé que l'application de cette technique

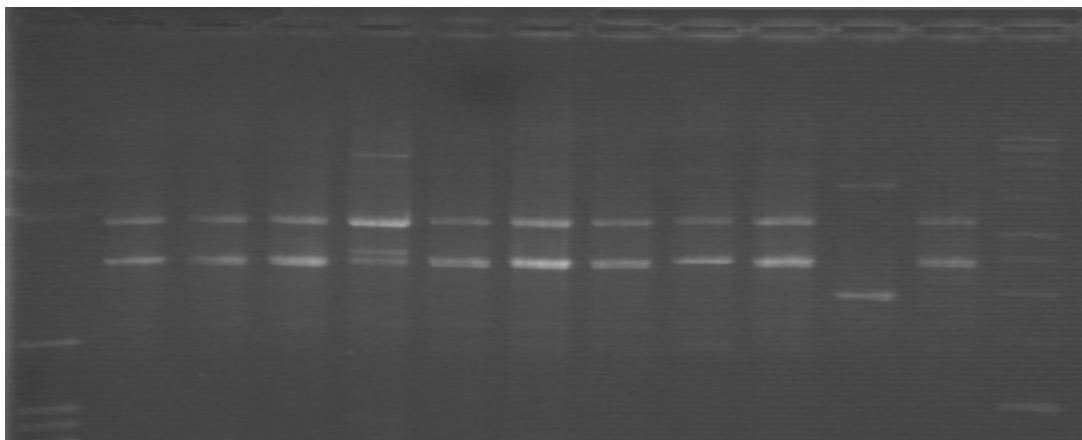
moléculaire peut engendrer un nombre variable de bandes, allant de 1 à 11 bandes (Spigalia et Mastratonio, 2003).

100pb RCM3 RCM4 RCM5 RCM10 IRC11 IRC19 IRC49 IRC56 IRC61 IRC62 IRC67 IRC72 1kb



**Figure V. 6:** Empreinte génomique PCR/REP de certains isolats racinaires (IRC) et symbiotiques de caroubier (RCM)

100pb IEC1 IEC2 IEC3 IEC4 IEC5 IEC6 IEC7 IEC8 IEC9 IEC10 IEC11 1kb



**Figure V. 7:** Empreinte génomique PCR/REP de certaines souches endophytes épicotylaires du caroubier (IEC)

**Tableau V. 3:** Isolats endophytiques des épicotyles (IEC) et symbiotiques (RCM) du caroubier analysés par la technique PCR/REP

Code d'isolat	Viabilité (+) ou (-)	Origine de la plante hôte	PCR-REP (+) ou (-)	Nombre de bandes	Taille de plus petite et grande bande (pb)
IEC 1	+	Sidi Bou Othman	+	2	2239 – 3162
IEC 2	+	Sidi Bou Othman	+	2	2239 – 3162
IEC 3	+	Sidi Bou Othman	+	2	2239 – 3162
IEC 4	+	Sidi Bou Othman	+	4	2239 – 6025
IEC 5	+	Sidi Bou Othman	+	2	2239 – 3162
IEC 6	+	Taounate	+	2	2239 – 3162
IEC 7	+	Taounate	+	2	2239 – 3162
IEC 8	+	Taounate	+	2	2239 – 3162
IEC 9	+	Taounate	+	2	2239 – 3162
IEC 10	+	Essaouira	+	2	1737 – 4570
IEC 11	+	Sidi Bou Othman	+	2	2239 – 3162
RCM3	+	Oujda	+	6	725 – 3981
RCM4	+	Oujda	+	6	725 – 3981
RCM5	+	Oujda	+	2	1230 – 3162
RCM7	+	Oujda	+	7	660 – 3801
RCM9	+	Oujda	+	6	725 – 2399
RCM10	+	Oujda	+	11	725 – 2399
RCM11	+	Oujda	+	6	955 – 4169

**Tableau V. 4:** Isolats endophytiques des racines du caroubier (IRC) analysés par la technique PCR/REP

Code d'isolat	Viabilité (+) ou (-)	Origine de la plante hôte	PCR-REP (+) ou (-)	Nombre de bandes	Taille des bandes (pb)
IRC 1	+	Oued Laou	+	2	832 – 3981
IRC 2	-	Oued Laou	-	-	-
IRC 3	+	Oued Laou	-	-	-
IRC 4	+	Oued Laou	+	2	832 – 3981
IRC 5	+	Oued Laou	+	2	725 – 3162
IRC 6	+	Ouazzane	+	5	725 – 3981
IRC 7	+	Tétouan	+	7	725 – 3311
IRC 8	+	Tétouan	+	4	955 – 3311
IRC 9	+	Taounate	+	7	725 – 4570
IRC 10	+	Taounate	+	7	725 – 4570
IRC 11	+	Taounate	+	9	525 – 6025
IRC 12	+	Taounate	+	4	955 – 3311
IRC 13	+	Demnate	+	2	1230 – 6025
IRC 14	+	Ouazzane	-	-	-
IRC 15	+	Tétouan	+	6	1047 – 4169
IRC 16	+	Ouazzane	-	-	-
IRC 17	+	Ouazzane	-	-	-
IRC 18	+	Ouazzane	+	6	2042 – 4169
IRC 19	+	Ouazzane	+	2	2511 – 3801
IRC 20	+	Tétouan	+	4	955 – 2884
IRC 21	+	Tétouan	-	-	-
IRC 22	+	Tétouan	+	4	955 – 2239
IRC 23	+	Taounate	+	5	2042 – 5623
IRC 24	+	Taounate	+	3	725 – 2884
IRC 25	+	Taounate	-	-	-
IRC 26	+	Taounate	-	-	-
IRC 27	+	Taounate	+	6	955 – 4570
IRC 28	-	Tétouan	-	-	-
IRC 29	+	Ouazzane	+	6	725 – 4570
IRC 30	+	Ouazzane	-	-	-
IRC 31	+	Ouazzane	+	2	2042 – 3802
IRC 32	+	Ouazzane	+	4	832 – 5248
IRC 33	+	Oued Laou	-	-	-
IRC 34	+	Oued Laou	-	-	-
IRC 35	+	Oued Laou	-	-	-
IRC 36	+	Oued Laou	+	2	832 – 3981

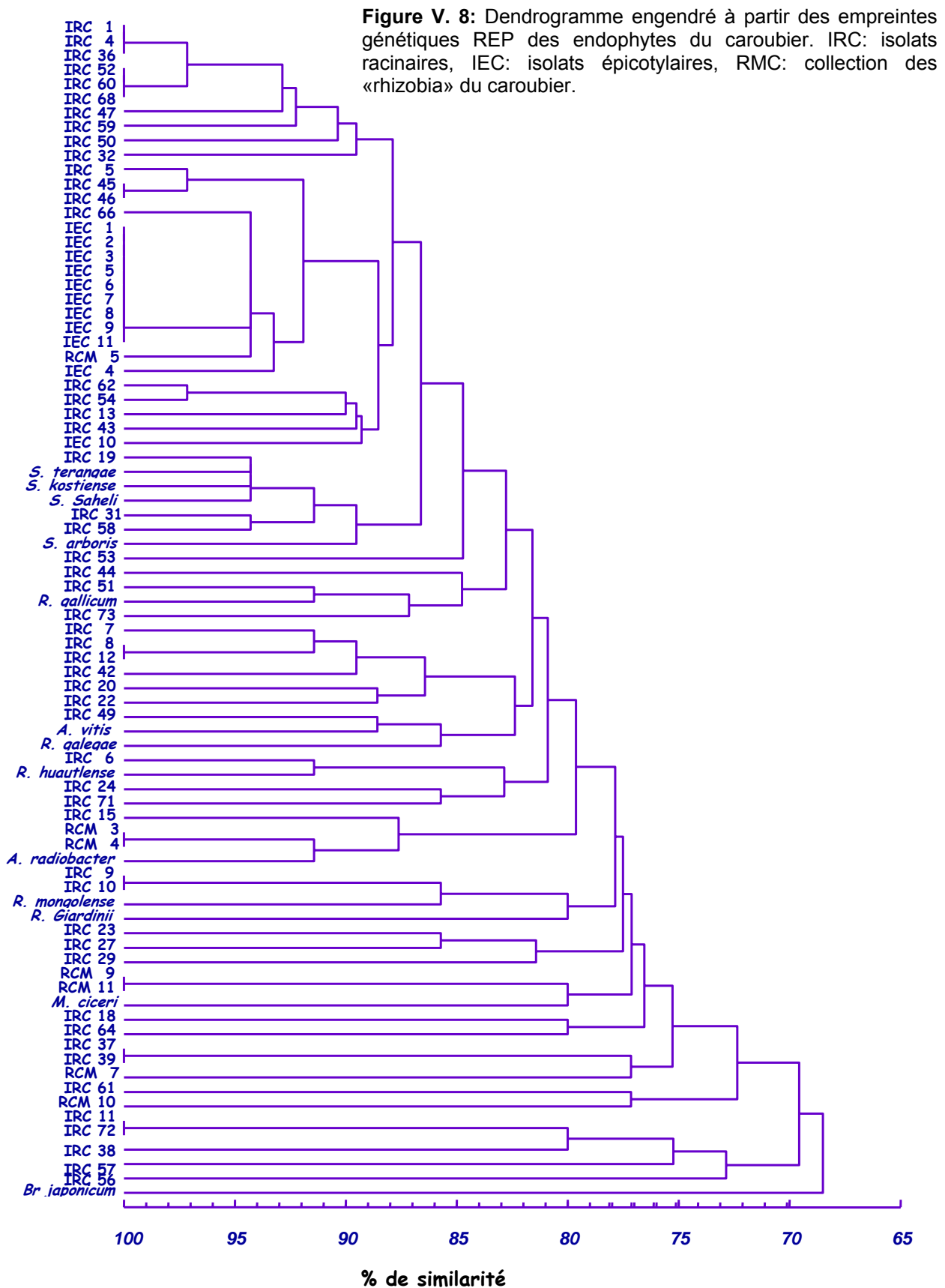
Tableau V. 4 (suite)

Code d'isolat	Viabilité (+) ou (-)	Origine de la plante hôte	PCR-REP (+) ou (-)	Nombre de bandes	Taille de plus petite et grande bande (pb)
IRC 37	+	Taounate	+	7	380 – 3162
IRC 38	+	Taounate	+	8	525 – 5623
IRC 39	+	Taounate	+	7	380 – 3162
IRC 40	+	Tétouan	-	-	-
IRC 41	+	Demnate	-	-	-
IRC 42	+	Sidi Bou Othman	+	4	725 – 1548
IRC 43	+	Tétouan	+	2	1445 – 2042
IRC 44	+	Essaouira	+	4	1047 – 2511
IRC 45	+	Essaouira	+	3	725 – 3162
IRC 46	+	Essaouira	+	3	725 – 3162
IRC 47	+	Tétouan	+	3	3162 – 7244
IRC 48	+	Akchort	-	-	-
IRC 49	+	Aïn Safa	+	6	955 – 5012
IRC 50	+	Aïn Safa	+	4	832 – 7244
IRC 51	+	Aïn Safa	+	6	380 – 1995
IRC 52	+	Tétouan	+	1	3981
IRC 53	+	Taounate	+	4	525 – 2239
IRC 54	+	Demnate	+	1	5012
IRC 55	-	Taounate	-	-	-
IRC 56	+	Taounate	+	11	382 – 6026
IRC 57	+	Taounate	+	7	525 – 6607
IRC 58	+	Aïn Safa	+	3	1995 – 4898
IRC 59	+	Taounate	+	3	832 – 3981
IRC 60	+	Taounate	+	1	3981
IRC 61	+	Demnate	+	7	955 – 5012
IRC 62	+	Demnate	+	2	2754 – 5012
IRC 63	-	Sidi bou Othman	-	-	-
IRC 64	+	Ouazzane	+	8	660 – 6025
IRC 65	+	Demnate	-	-	-
IRC 66	+	Ouazzane	+	2	832 – 3162
IRC 67	+	Ouazzane	-	-	-
IRC 68	+	Ouazzane	+	1	3981
IRC 69	+	Ouazzane	-	-	-
IRC 70	+	Demnate	-	-	-
IRC 71	+	Taounate	+	5	725 – 3311
IRC 72	+	Taounate	+	9	525 – 6025
IRC 73	+	Sidi Bou Othman	+	3	832 - 1995

Cette étude nous a permis de déceler un niveau élevé de polymorphisme au sein des endophytes du caroubier. La diversité est beaucoup plus prononcée chez les isolats racinaires (Fig. V. 6), et chez les souches de la collection de Missbah et *al.*, (1996). Toutefois, les souches d'origine épicotyloïde, se sont avérées moins diversifiées. Le polymorphisme a été aussi étudié par simple observation ou comparaison des profils entre eux. En effet, une simple constatation basée seulement sur la différence dans le nombre des bandes (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 11) engendrées par l'amplification de l'ADN de 50 souches IRC, témoigne l'existence d'une forte diversité moléculaire chez ces bactéries. Ainsi, sur cette base comparative, nous avons identifié 35 bandes polymorphes chez les isolats racinaires, 17 bandes polymorphes chez les souches de la collection RCM et 6 bandes différentes chez les isolats épicotyloïdes.

De Bruij (1992), utilisant la technique PCR/REP pour analyser un groupe des bactéries appartenant aux genres *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas* et *E. coli*, a appuyé la suggestion faite par Versalovic et *al.*, (1991) concernant l'utilité de cette méthode dans les études du polymorphisme génétique, voir de phylogénie. Par ailleurs, Spigaglia et Mastrantonio (2003), ayant eu recours à l'utilisation de cette technique pour des études moléculaires de 34 souches cliniques appartenant aux *Clostridium difficile*, ont rapporté son adaptation parfaite dans le typage des isolats bactériens. La méthode PCR/REP qui n'exige ni un extrait d'ADN purifié, car l'ADN issu de la lyse alcaline non traité par la protéinase K et par l'ARNase peut être amplifié, ni une restriction enzymatique, donne des résultats rapides sur un grand nombre d'isolats (Bennani, 2004; Maâtallah, 2003; Schneider et De Bruij, 1996; Vinuesa et *al.*, 1998). En conséquence, elle est reconnue par certains auteurs d'être fortement reproductible et pointue (Ellsworth et *al.*, 1993; Schneider et De Bruij, 1996; Spigaglia et Mastrantonio, 2003).

Par ailleurs, l'analyse des empreintes génomiques RCP/REP par la méthode UPGUMA, donnant lieu à la construction d'un dendrogramme (Fig. V. 8), a permis l'obtention des regroupements des souches de caroubier (IRC, IEC et RCM) en fonction de leur niveau de similarité. Ce dendrogramme a révélé une large diversité intra et inter-groupes, consolidant ainsi le polymorphisme précédemment révélé par l'observation directe des profils électrophorétiques.



Se basant arbitrairement sur deux niveaux de similitude 90% et 87%, nous avons obtenu des regroupements des souches endophytes associatives inter-mêlées, de fois, avec les souches symbiotiques. En effet, à 90% de similitude, nous distinguons 8 groupes et 35 lignées

indépendants. Le niveau de variabilité diminue légèrement à 87% d'identité où nous obtenons 2 grands clusters, 6 petits groupes et 24 lignées indépendants. Dans ce dernier cas, le premier grand cluster comprend exclusivement 18 IRC, toutes les souches de IEC et RCM5. Le second contient les *Sinorhizobium* sp. et 3 IRC. Tandis que les 6 petits groupes sont composés de 11 IRC, de RCM3 et RCM4, qui sont proches de différentes espèces de *Rhizobium* sp. et des *Agrobacterium* sp.

Ce premier criblage d'ordre moléculaire, nous a permis de re-évaluer le nombre de notre collection. Ainsi, nous avons pu déterminer, excluant les 19 IRC non amplifiés, 41 différentes souches pour les endophytes racinaires et 3 différentes souches pour les endophytes épicytaires. Par conséquent, différentes souches représentatives de différents groupes PCR/REP, à savoir, 30 souches IRC appartenant à 7 différentes accessions et 4 souches IEC appartenant à 2 différentes accessions, ont été sélectionnées pour d'autres analyses moléculaire et phénotypique.

A travers cette première étude moléculaire, il serait intéressant de signaler que les séquences répétitives contenues dans le matériel génétique de la plupart des bactéries isolées des organes végétatifs du caroubier, ont été amplifiées par la technique PCR/REP, au même titre que la majorité des rhizobactéries rapportées par De Bruij (1992) et Vinuesa et al., (1998). Certaines bactéries endophytes associatives, ainsi que des souches de la collection de Missbah et al., (1996) ont révélé un probable rapprochement à certaines espèces de rhizobia. En effet, un grand nombre de différentes espèces bactériennes de la rhizosphère, est rapporté par la littérature pour leur association naturelle et bénéfique avec diverses plantes hôtes. Au début, l'établissement d'une association endophytique avec les plantes légumineuses ou non, notamment les graminées, a été assigné à certaines bactéries du sol, telle que *Azospirillum* (Tarrand et al., 1978), *Azoarcus* (Reinhold-Harek et al., 1993), *Bacillus* (Gordon et al., 1973), *Beijerinckia* (Döbereiner et Castro, 1955), *Gluconacetobacter* (Yamada et al., 1997), *Herbaspirillum* (Baldani et al., 1986a) ...ect. Plus tard, des auteurs ont rapporté l'extension de l'habitat naturel des rhizobia à une troisième niche, à savoir, l'intérieur de tissus de différents organes (racines, tiges, feuilles, ...) de différentes plantes (Chaintreuil et al., 2000; Ladha et al., 1989; Yanni et al., 1997). Ainsi, des rhizobiums ont été rapportés, par plusieurs auteurs, pour leur effective implication dans l'activation de la croissance et de la productivité des plantes non/ou légumineuses, entant qu'endophytes associatives naturelles (Chabot, 1996a; Chi et al., 2005; Hoflich et al., 1995; Noel et al., 1996).

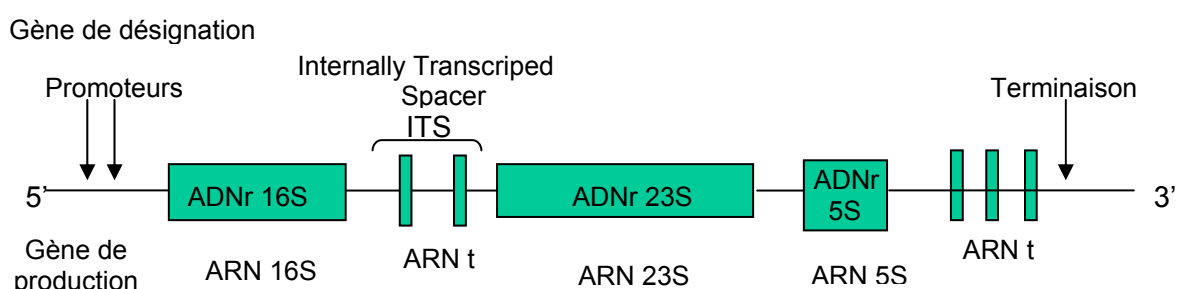


## Chapitre VI: Etude phylogénétique des endophytes du caroubier par analyse du segment 16S ADNr

### 1. INTRODUCTION

La découverte des techniques moléculaires, notamment celles basées sur l'analyse des séquences de certains gènes conservés dans l'espèce, a été décisive dans l'évolution progressive et consensuelle de la taxonomie de *Rhizobiaceae*. Parmi ces divers outils les ARN ribosomiaux (ARNr) et en particulier l'ARNr 16S se sont vite imposés comme étant un outil phylogénétique répondant aux critères nécessaires pour une étude évolutive. Ils sont particulièrement étudiés pour leur pouvoir discriminant permettant de séparer des genres, des familles, des classes et des sous-classe (Woese, 1987 ; De Ley, 1991; Vandamme et *al.*, 1996).

Les molécules des ARN ribosomiaux, dont les gènes correspondants sont organisés en un ou plusieurs opérons (Figure VI.1), sont omniprésentes chez toutes les espèces eucaryotes et procaryotes et assument la même fonction. En effet, ces ARNr font partie intégrale du ribosome qui est l'unité de la traduction des informations génétiques codées et portées par l'ARNm. La vitesse d'évolution de ces gènes est relativement constante à l'intérieur d'une même espèce, car ils contiennent de régions très conservées et d'autres beaucoup plus variables (Fox et *al.*, 1980; Vandamme et *al.*, 1996). Toute fois, sans compromettre la fiabilité des méthodes phylogénétiques, des auteurs ont rapporté l'apparition d'un nouveau phénomène portant sur les possibles transferts latéraux ou horizontaux, en partie ou en totalité, des gènes ribosomiaux et symbiotiques (Ochman et *al.*, 2000; Martinez et *al.*, 1987; Sullivan et Ronson, 1998; Sy et *al.*, 2001).



**Figure VI.1** : Représentation schématique de l'opéron ribosomal ADNr des procaryotes.

Les molécules de l'opéron ribosomal 16S et 23S ainsi que la région ITS sont considérés par rapport à 5S, très informatives. D'où leur utilisation intensive dans les études de la diversité génétique et de la phylogénie des rhizobactéries (van Berkum et *al.*, 2003; Woese, 1987; Young et Haukka, 1996).

L'amplification de l'ADN *in vitro* ou PCR (Polymerase Chain Reaction) est un élément de base dont découlent plusieurs nouvelles techniques moléculaires. En effet, le couplage de la PCR et de

l'analyse du polymorphisme des fragments d'ADN digérés par les enzymes de restrictions (PCR/RFLP) est de plus en plus utilisée pour identifier les micro-organismes. La technique PCR/RFLP de gène 16S ADNr, communément appelée ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) se caractérisant par sa simplicité et sa rapidité, a été largement utilisée par plusieurs auteurs (Cruz et *al.*, 2001; Herrera-Cervera et *al.*, 1999; Navarro et *al.*, 1992; Ponsonnet et Nesme, 1994; Weisburg et *al.*, 1991). En dehors de ses données jugées relativement préliminaires sur le plan des relations phylogénétiques, sa simplicité de mise en œuvre au laboratoire a fait d'elle un l'outil le plus utilisé surtout pour réduire le nombre de souches candidates au séquençage.

Pour avoir plus d'information sur notre collection des bactéries endophytes associatives isolées des racines et des épicotyles du caroubier, les relations phylogénétiques des souches sélectionnées sur la base de la PCR/REP, ont été sujettes d'une analyse par la technique PCR/RFLP de l'ADNr 16S. Les souches de collection de Missbah et *al.*, (1996) ainsi que des espèces de référence appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* ont été aussi incluses.

## **2. MATÉRIEL ET METHODES**

### **2. 1. Souches bactériennes et milieu de culture**

Les souches endophytes associatives de caroubier (30 IRC et 4 IEC) sélectionnées à l'issu de l'analyse moléculaire de toute la collection par PCR/REP (Tableau VI. 1), ont été utilisées dans cette étude. En plus, huit souches de la collection de Missbah et *al.*, (1996) (RCM3, RCM4, RCM5, RCM7, RCM9, RCM10 RCM11 et RCM12) et neuf souches de référence représentant les genres: *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium* ont été également incluses dans cette nouvelle analyse par ARDRA.

Toutes les souches utilisées ont été cultivées dans le milieu TY (Beringer, 1974) qui à pour rôle de réduire la production des polysaccharides.

### **2. 2. Extraction de l'ADN génomique**

Une autre méthode d'extraction de l'ADN génomique, plus simple et rapide par rapport à celle de Ausubel et *al.*, (1987), a été appliquée. Il s'agit en l'occurrence de la méthode de la lyse alcaline décrite par De Bruij (1992). Cette méthode ne nécessitant aucun traitement des extraits d'ADN avec le phénol-chloroforme, Protéinase K et ARNase, donne une bonne quantité et qualité d'ADN susceptible à l'amplification.

**Tableau VI. 1:** Isolats racinaires (IRC) et épicotytaire (IEC) du caroubier, analysés par ARDRA.

<b>Souche endophyte</b>	<b>Provenance de plante hôte</b>	<b>amplification de l'ANDr 16S par PCR/RFLP</b>
IRC1	Oued Laou	+
IRC6	Ouazzane	+
IRC7	Tétouan	+
IRC9	Taounate	+
IRC11	Taounate	+
IRC15	Tétouan	+
IRC18	Ouazzane	+
IRC19	Ouazzane	+
IRC20	Tétouan	+
IRC24	Taounate	+
IRC27	Taounate	+
IRC29	Ouazzane	+
IRC32	Ouazzane	+
IRC37	Taounate	+
IRC42	Sidi Bou Othman	+
IRC43	Tétouan	+
IRC44	Essaouira	+
IRC45	Essaouira	+
IRC47	Tétouan	+
IRC49	Aïn Safa	+
IRC50	Aïn Safa	+
IRC51	Aïn Safa	+
IRC53	Taounate	+
IRC54	Demnate	+
IRC56	Taounate	+
IRC57	Taounate	+
IRC58	Aïn Safa	+
IRC61	Demnate	+
IRC66	Ouazzane	+
IRC73	Sidi Bou Othman	+
IEC1	Sidi Bou Othman	+
IEC4	Sidi Bou Othman	+
IEC10	Essaouira	+
IEC11	Sidi Bou Othman	+

Une quantité suffisante de cellules, prélevée d'une culture fraîche à l'aide d'un cure-dent stérile, est vigoureusement mélangée avec 25µl d'eau bidistillée stérile dans un tube eppendorf. 25µl de

réactif de lyse fraîchement préparé (10µl de NaOH 5N, 25µl de SDS 10% et 465µl d'eau bidistillée stérile) sont ajoutés au mélange précédent ; le tube est ensuite vortexé puis placé dans un récipient d'eau bouillante (100°C) pendant 15 minutes. Après l'incubation, 200µl d'eau bidistillée stérile sont immédiatement ajoutés dans le tube, mélangés au vortex et centrifugés à 13.000g pendant 10 min. Le surnageant transparent est récupéré dans un nouveau tube stérile et conservé à 4°C avant son utilisation.

La qualité de l'ADN extraite a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose (0.6%). Le gel est visualisé sous la lumière UV après sa coloration dans une solution de bromure d'éthidium.

### 2. 3. Amplification du segment d'ADNr 16S par PCR

L'ARDRA consiste en l'amplification, *in vitro*, du segment ADNr 16S qui est omniprésent de façon stable dans tout type de bactéries. Les fragments issus de cette amplification sont immédiatement digérés par différentes enzymes de restriction.

#### 2. 3. 1. Amorces d'amplification

Toute amplification de l'ADN génomique par la technique PCR exige l'utilisation d'une ou plusieurs amorces appropriées qui s'hybrident de manière spécifique ou aléatoire avec les extrémités 3' de la portion des séquences d'ADN à amplifier. En effet, nous avons eu recours à l'utilisation de deux amorces décrites par Herrera-Cervera et *al.*, (1999) pour analyser nos souches bactériennes. Ces deux amorces sont 41f et 1488r dont les séquences respectives sont: 5'-GCTCAAGATTGAACGCTGGCG-3' et 5'-CGGTTACCTTGTTGACTTCACC-3'. Ces amorces ont été désignées selon la position correspondante aux séquences du gène ribosomal 16S chez *Escherichia coli* (Herrera-Cervera et *al.*, 1999).

#### 2. 3. 2. Conditions d'amplification

Les réactions d'amplification de l'ADN ont été conduites dans un volume réactionnel de 70µl. Ce volume est composé de: tampon de la réaction PCR 1x final, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50µM de chaque désoxynucléoside triphosphate (dNTPs), 5pmol de chaque amorce, 4 unités de *Taq* polymérase (Promega) et 4µl de lysat bactérien. Un témoin négatif, sans ADN, a été réalisé pour chaque expérience pour s'assurer de la non contamination de l'ADN amplifié. L'amplification a été faite dans un thermo-cycleur (Applied Biosystems) en appliquant le programme suivant:

- Dénaturation initiale de l'ADN: 94°C, 2min
  - Dénaturation de l'ADN: 94°C, 40s
  - Fixation des amorces sur l'ADN: 60°C, 1min
  - Elongation des amorces: 72°C, 2min
- } 10 cycles
- Dénaturation de l'ADN: 94°C, 40s
  - Hybridation des amorces sur l'ADN: 50°C, 1min
  - Extension des amorces: 72°C, 2min
- } 25 cycles

- Extension finale: 72°C, 5min
- Maintient des amplifia à 4°C, +∞

Pour s'assurer de la réussite et la qualité de l'amplification, 10µl du produit d'amplification et 2µl du tampon de charge (loading dye 6x, Promega), ont été mis à migrer dans un gel d'agarose (0.8%) horizontal dans du tampon TBE à 80 volts pendant une heure. Un seul marqueur de poids moléculaire 100pb (Promega) a été utilisé sur ce gel test. Après l'électrophorèse, le gel est coloré dans un bain de Bromure d'éthidium (0.1%) pendant 15min, observé sous lumière UV (320nm), photographié et scanné à l'aide du logiciel Perfect Image V. 6.

### 2. 3. 3. Digestion enzymatique du segment ADN amplifié

Les produits de l'amplification (10 à 12µl) ont été digérés dans un volume réactionnel de 30µl en présence de 0.25 à 0.5µl d'enzyme (5U), 3µl de tampon de l'enzyme (10 fois concentré) et 0 à 3µl de BSA (10mg/ml). Le mélange réactionnel est incubé dans un bain mari pendant 1heure à 37°C ou 65°C conformément aux instructions recommandées par le fournisseur pour chaque enzyme. Les quatre endonucléases utilisées dans cette étude sont: *Msp* I, *Hinf* I, *Taq* I (Promega) et *Hha* I (Pharmacia).

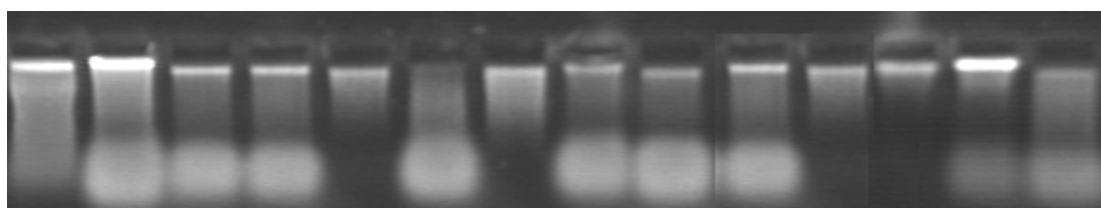
Les fragments de restriction obtenus, ont été séparés par électrophorèse horizontale dans un gel d'agarose à 1.4%. Seul le 100pb (Promega) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Après 4 heures de migration à 80 voltes, le gel a été, coloré, photographié et scanné selon le processus précédemment expliqué.

### 2. 3. 4. Analyse numérique

Afin de définir les relations génétiques existantes entre les souches, les photographies des gels scannés ont été transférées dans le logiciel GelCompar II pour leur traitement. Le coefficient de similitude et la méthode UPGMA ont été utilisées pour analyser les différents profils de restriction afin d'établir la phylogénie des différentes souches.

## 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

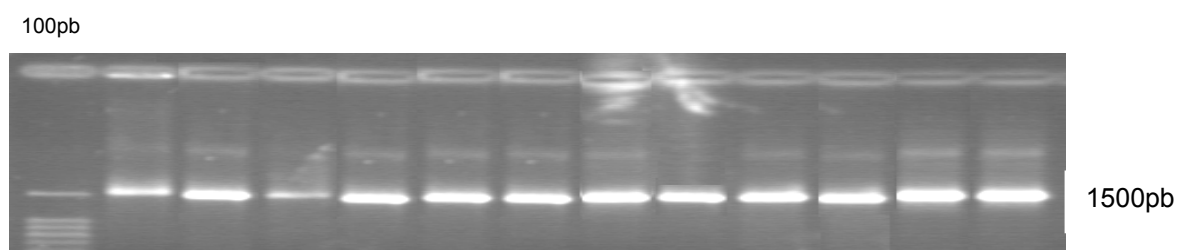
L'application de la méthode de la lyse alcaline décrite par De Bruij (1992) a permis l'obtention d'une bonne quantité et qualité d'extrait d'ADN (Fig. VI. 2).



**Figure VI. 2:** Extrait d'ADN génomique de 14 souches IRC obtenu par l'usage de la méthode de lyse alcaline (De Bruij, 1992).

La petite sous unité de l'ARNr (ADNr 16S) des souches endophytes associatives (IRC et IEC), des souches de la collection de Missbah et *al.*, (1996) ainsi que des souches types des espèces de

référence de la famille *Rhizobiaceae*, a été positivement amplifiée par l'utilisation des deux amorces 41f et 1488r (Herrera-Cervera et al., 1999). En effet, l'analyse électrophorétique des produits d'amplification PCR a donné lieu, dans les conditions astringentes, à une bande de 1500pb chez toutes les souches étudiées. Le résultat obtenu à l'issue de l'amplification du gène 16S ADNr de 12 souches IRC (Fig. VI. 3), est identique aussi bien pour les endophytes associatives que pour les souches RCM et les souches de référence utilisées. Ce-ci a été aussi rapporté par plusieurs auteurs travaillant sur les bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* ou des endophytes associatives (Cruz et al., 2001; Herrera-Cervera et al., 1999; Khabay et al., 1998; Soares-Ramos et al., 2003). Toutefois, l'utilisation de deux amorces U2 et R1n (Weisburg et al., 1991) pour amplifier le segment de l'ADNr 16S de rhizobia a donné naissance à une bande unique caractérisée par un poids moléculaire de 1000pb (Mouhsine, 2000).



**Figure VI. 3:** Profils génomiques obtenus par amplification du gène ADNr 16S chez 12 souches endophytes racinaires du caroubier marocain.

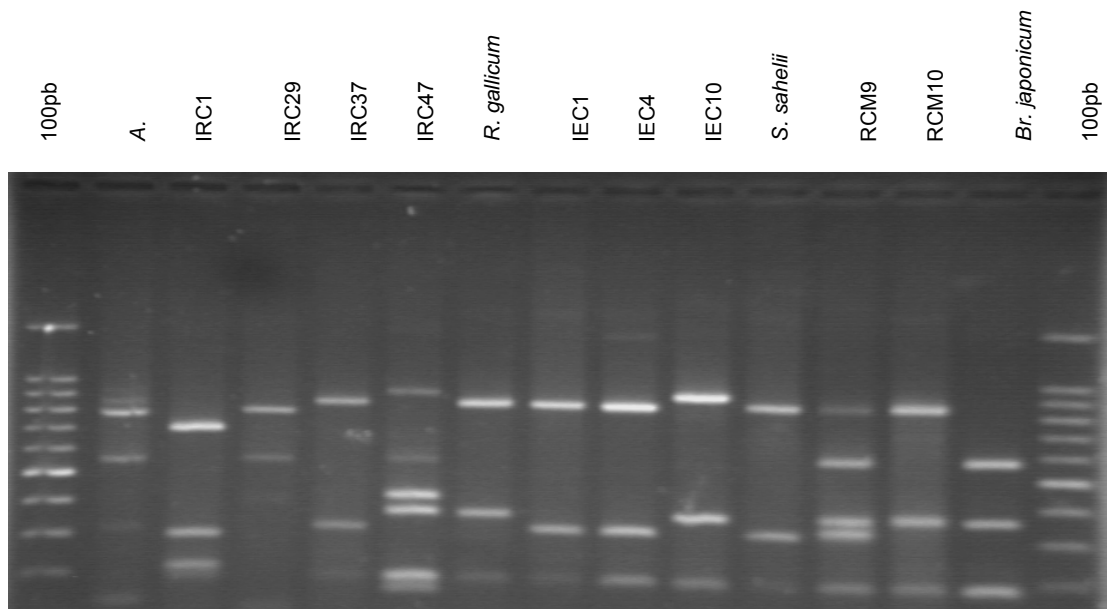
Il est à noter que selon la bibliographie, les amorces utilisées pour l'amplification spécifique de l'ADNr 16S diffèrent d'un auteur à l'autre (Tableau VI. 2). Ainsi, Cruz et al., (2001) utilisant les deux amorces Y1 (Young et al., 1991) et Y3 (Brosius et al., 1981), ont pu amplifier le gène ribosomal 16S de 52 bactéries endophytes isolées à partir des racines, tiges et feuilles des plantes de banane et d'ananas.

**Tableau VI. 2:** Certaines amorces utilisées pour l'amplification totale du gène ADNr 16S

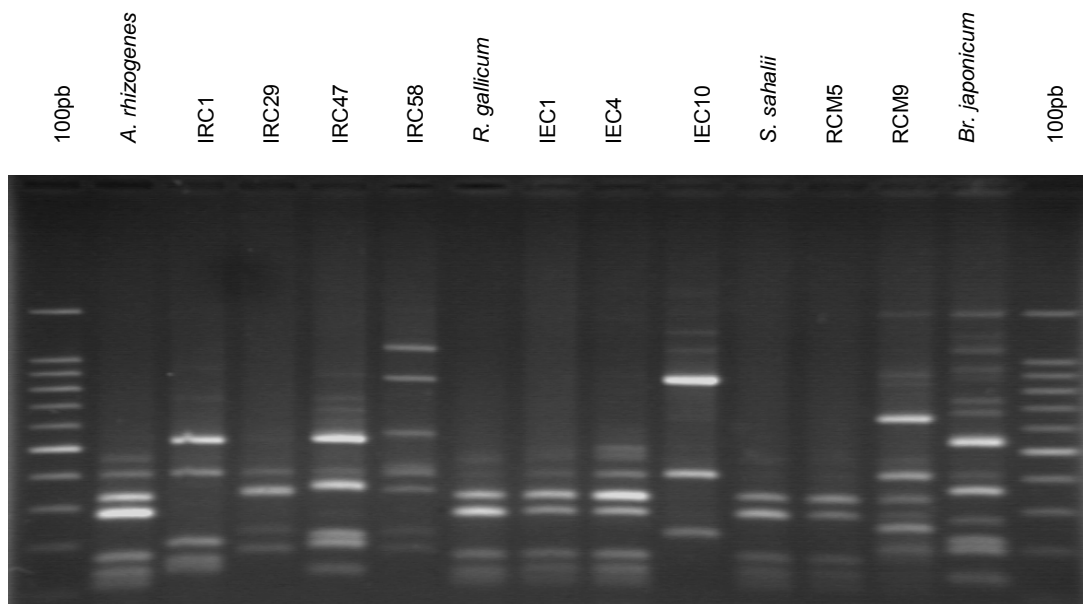
Amorce	Séquence 5'-3'	Référence	bactéries analysée	Utilisateur
<b>41f</b> <b>1488r</b>	GCTCAAGATTGAACGCTGGCG CGGTTACCTTGTTGACTTCACC	Herrera-Cervera et al., 1999 Herrera-Cervera et al., 1999	Rhizobia et Endophyte*	Maâtallah, 2003; Sharma et al., 2005
<b>FGPS6</b> <b>FGPS1509</b>	GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG AAGGAGGGGATCCAGCCGCA	Normand et al., 1992 Normand et al., 1992	Rhizobia et Endophyte	Chaintreuil et al., 2000
<b>FGPS4</b> <b>FGPS1509'</b>	ATGGAGAAGTCTTGATCCTGGCTC AAGGAGGGGATCCAGCCGCA	Normand, 1995 Normand, 1995	Rhizobia et Agrobacteria	Willems et Collins, 1993; Khabaya et al., 1998.
<b>Y1</b> <b>Y3</b>	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC	Young et al., 1991 Brosius et al., 1981	Endophyte	Cruz et al., 2001
<b>Y1</b> <b>Y2</b> <b>362f</b> <b>786f</b> <b>1203f</b> <b>1110r</b> <b>805r</b>	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG CTCCTACGGGAGGCAGTGGGG CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC GACTACCAGGGTATCTAATCCTG	Young et al., 1991 Young et al., 1991 Soares-Ramos et al., 2003 Soares-Ramos et al., 2003 Soares-Ramos et al., 2003 Soares-Ramos et al., 2003 Soares-Ramos et al., 2003	Endophyte	Soares-Ramos et al., 2003
<b>U2</b> <b>R1n</b>	ACATTTCAACAACACGAGCTG GCTCAGATTGAACGCTGCCG	Weisburg et al., 1991 Weisburg et al., 1991	Rhizobia	Mouhsine, 2000

\*Endophyte associative

Par ailleurs, le gène ribosomal 16S amplifié a été digéré par quatre différentes enzymes de restriction choisies selon leur pouvoir discriminant. Cette restriction enzymatique a donné naissance à plusieurs bandes de taille différente correspondant au nombre de sites spécifiques rencontrés dans la séquence de l'ADNr 16S. Les figures (VI. 4 a et b) illustrent le résultat de la digestion, par les enzymes *Msp* I, *Hinf* I, *Taq* I et *Hha* I, d'une série de souches endophytes associatives et symbiotiques. Ces bandes selon leur taille et leur nombre caractérisent un type de profil de digestion pour chaque endonucléase et chaque souche étudiée. En effet, les enzymes de restriction utilisées ont permis chacune de différencier entre huit et douze profils différents pour l'ensemble des endophytes du caroubier. Ainsi, les différents profils de restriction obtenus par chaque enzyme et pour chaque souche ont été désignés par des lettres majuscules et groupés dans le tableau VI. 3. L'analyse de ces différents profils a révélé que *Msp* I est l'endonucléase la plus discriminante, engendrant 16 profils différents d'ARDRA. Par contre, l'enzyme *Hha* I s'est avérée la moins discriminante ne donnant que 8 profils différents.



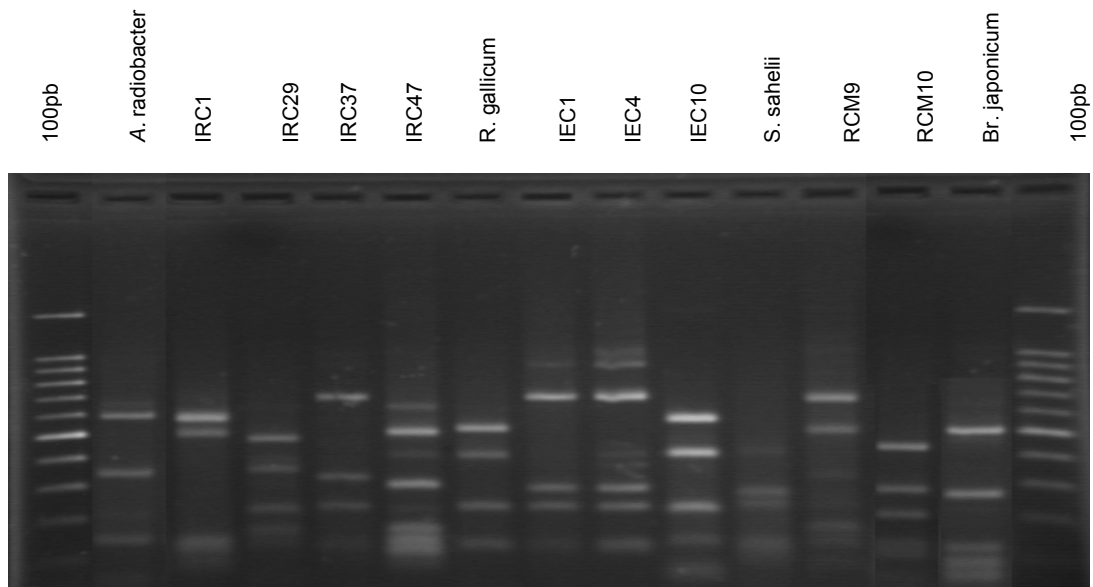
A.



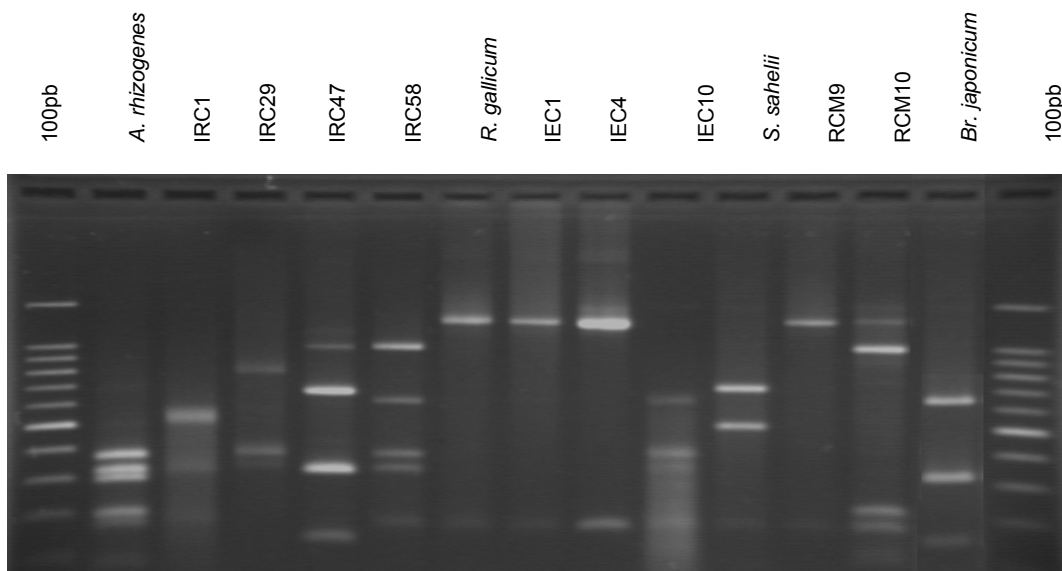
B.

**Figure VI. 4a:** Polymorphisme de taille des fragments de restrictions (RFLP) obtenus après la digestion par *Taq* I (A) et par *Hha* I (B) du gène ADNr 16S chez 7 endophytes associatives, 2 RCM et 4 souches de référence.





C.



D.

**Figure VI. 4b:** Polymorphisme de taille des fragments de restrictions (RFLP) obtenus après la digestion par *Msp* I (C) et par *Hinf* I (D) du gène ADNr 16S chez 7 endophytes associatives, 2 RCM et 4 souches de référence.

Ces résultats confirment la révélation faite précédemment par la technique PCR/REP, en ce qui concerne l'existence d'un niveau élevé de diversité moléculaire au sein des souches isolées des racines, des épicotyles et des «nodules» du caroubier. En effet, au total 33 combinaisons différentes de profils, correspondant chacune à un ribotype ou génotype, ont été identifiées dans cette collection (Tableau VI. 3). Un grand nombre de ces génotypes a été recensé chez les endophytes racinaires avec 25 ribotypes différents. Cependant, les souches de la collection RCM et celles isolées des épicotyles (IEC) n'ont respectivement donné que 5 et 3 génotypes différents.

**Tableau VI. 3:** Profils de restriction du gène ADNr-16S et génotypes des souches endophytes associatives (IRC et IEC) et symbiotique (RCM), déterminés par analyse PCR/RFLP,

Souches	Profils de restriction* du gène ADNr-16S amplifié par PCR et digéré par:				Génotypes 16S
	Msp I	Hinf I	Hha I	Taq I	
IRC1	A	A	A	A	AAAA
IRC6	J	C	C	C	JCCC
IRC7	B	B	A	B	BBAB
IRC9	C	C	C	C	CCCC
IRC11	C	C	C	C	CCCC
IRC15	J	C	C	C	JCCC
IRC18	D	D	D	D	DDDD
IRC19	J	C	C	C	JCCC
IRC20	J	C	E	C	JCEC
IRC24	F	I	C	D	FICD
IRC27	G	F	C	D	GFCD
IRC29	E	E	D	D	EEDD
IRC32	P	F	E	K	PFEK
IRC37	C	C	E	C	CCEC
IRC42	K	C	E	C	KCEC
IRC43	L	K	G	H	LKGH
IRC44	G	F	C	D	GFCD
IRC45	F	F	D	E	FFDE
IRC47	G	G	E	F	GGEF
IRC49	L	C	C	C	LCCC
IRC50	L	F	E	F	LFEF
IRC51	N	C	G	I	NCGI
IRC53	I	H	A	G	IHAG
IRC54	L	A	H	F	LAHF
IRC56	C	C	G	I	CCGI
IRC57	L	A	H	J	LAHJ
IRC58	M	G	C	H	MGCH
IRC61	L	A	H	J	LAHJ
IRC66	O	J	C	D	OJCD
IRC73	K	C	A	C	KCAC
IEC1	J	C	G	C	JCGC
IEC4	N	C	G	C	NCGC
IEC10	L	G	H	H	LGHH
IEC11	J	C	G	C	JCGC
RCM3	A	F	A	H	AFAH
RCM4	A	F	A	H	AFAH
RCM5	B	F	A	F	BFAF
RCM7	A	F	A	H	AFAH
RCM9	C	C	F	C	CCFC
RCM10	K	B	G	I	KBGI
RCM11	C	C	F	C	CCFC
RCM12	H	F	C	L	HFCL
Nombre des profils	16	11	8	12	32

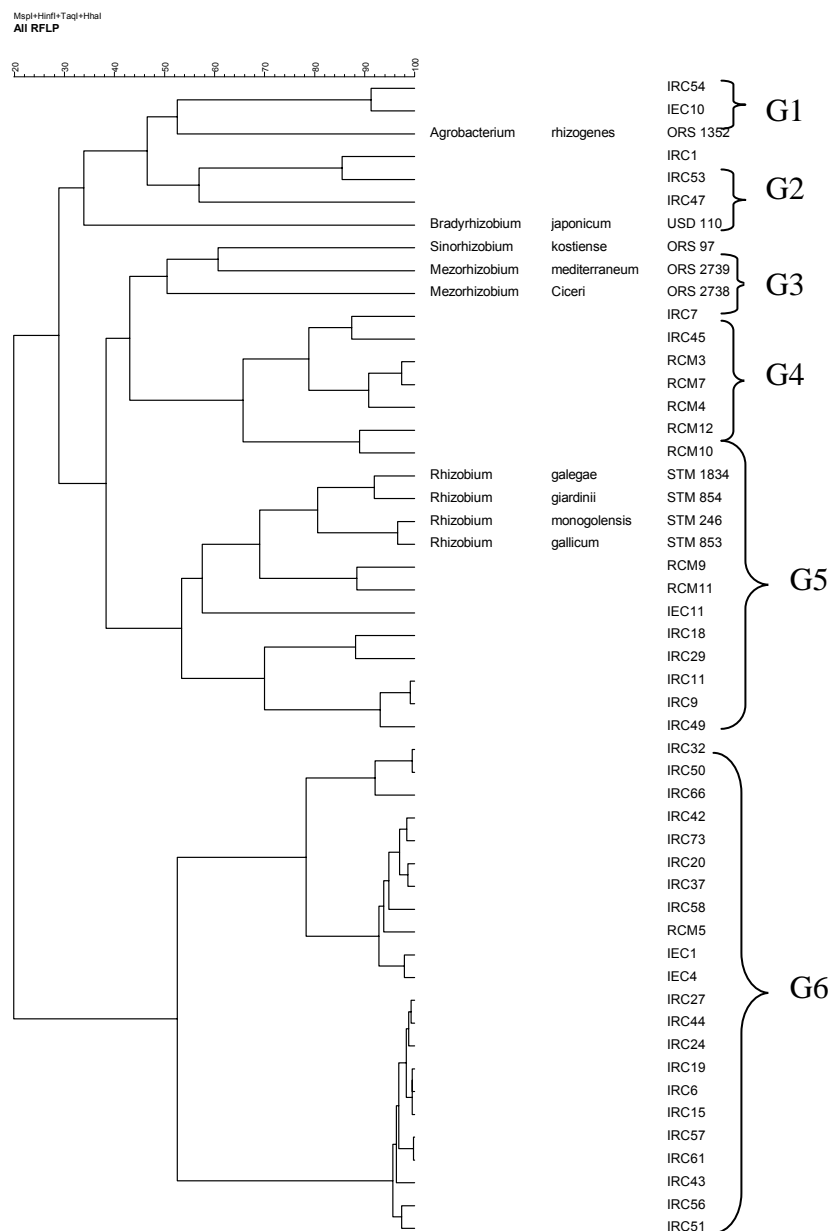
\* Les différents types de profils obtenus après la digestion, par chacune de quatre endonucléases, du gène

ADNr 16S amplifié sont présentés par des lettres majuscules

L'analyse statistique des différents profils ARDRA de chaque souche et de chaque endonucléase, à l'aide du logiciel GelCompart II, utilisant la méthode UPGMA, nous a permis de construire un dendrogramme qui est en accord avec le positionnement phylétique classique des différents représentants de la famille *Rhizobiaceae* utilisés (Fig. VII. 5). A travers ce dendrogramme, nous avons constaté que l'analyse des souches (IRC et IEC) et RCM par cette technique ARDRA a sensiblement réduit le niveau de la diversité génétique. En effet, à 50% de similitude nous avons obtenu six clusters distincts dont trois (2, 4 et 6) sont exclusivement constitués de souches endophytes associatives et RCM. Ainsi, le cluster 6 formé en grande partie par des souches IRC se subdivise, à niveau de similarité de 55%, en deux sous groupes distincts: le premier sous groupe est principalement composé de 8 souches IRC originaires de cinq accessions différentes, de 2 souches IEC provenant de Sidi Bou Othman et d'une souche RCM5; le second sous groupe est composé entièrement de 11 souches IRC issues de plantules appartenant à cinq accessions différentes et ayant 95% de similarité entre elles. Le cluster 4 est composé de 5 souches RCM et 2 souches IRC provenant des accessions Essaouira et Tétouan. Par contre, le cluster 2 comporte seulement 3 souches IRC issues de trois accessions différentes.

Par ailleurs, les trois branches phylétiques restantes renferment certaines souches de référence de rhizobia. Le cluster 1 contient deux souches endophytes associatives (IRC54 et IEC10) qui ont montré 53% de similarité avec *Agrobacterium rhizogenes*. Le cluster 3 ne comporte que les souches de référence appartenant aux genres *Mesorhizobium* et *Sinorhizobium*. Le cluster 5 se subdivise, à 54% de similitude, en deux sous groupes: le premier sous groupe, contenant une souche épicytaire IEC11 et deux souches RCM (9 et 11), montre plus de rapprochement avec les souches de référence du genre *Rhizobium*, par rapport au second sous groupe composé de 5 souches IRC provenant de trois accessions différentes.

Bien que l'analyse des isolats bactériens par la technique ARDRA semble ne donner qu'un schéma préliminaire et simplifié des relations phylogénétiques, elle reste cependant l'une des méthodes la plus sollicitée, dans plusieurs laboratoires, pour sa rapidité et sa rentabilité dans l'étude de plusieurs individus en même temps. Elle est également estimée comme étant une méthode fiable et très utilisée pour regrouper les nouveaux isolats et déterminer leur génotypes ainsi que leur position phylogénétique (Cruz et al., 2001; Laguerre et al., 1994; Normand, 1995; Wang et al., 1999; Weisburg et al., 1991; Willems et Collins, 1993). Certains auteurs ont, par ailleurs, rapporté la concordance des résultats obtenus par la technique ARDRA avec ceux révélés par d'autres méthodes, telle que le séquençage de l'ADNr-16S, l'hybridation ADN/ADN et l'analyse isoenzymatique (Chaintreuil et al., 2000; Chen et al., 2003; Cruz et al., 2001; Herrera-Cervera et al., 1999; Nour et al., 1995; Young et Haukka, 1996).



**Figure VI. 5:** Dendrogramme issu de l'analyse des profils PCR/RFLP du gène 16S par méthode UPGMA, montrant la relation phylogénétique des souches endophytes associatives (IRC et IEC) et symbiotiques (RCM) du caroubier, par rapport aux souches de référence.

Cependant la validité des informations fournies par l'analyse de l'ADNr 16S par la méthode de PCR/RFLP dépend du choix et du nombre des enzymes de restriction. Il a été rapporté que l'utilisation d'au moins quatre enzymes de restrictions discriminantes est nécessaire et suffisante pour définir la totalité des espèces de rhizobia déjà connues (Laguerre et *al.*, 1994). En effet, Cruz et *al.*, (2001) utilisant quatre endonucléases *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I et *Rsa* I, ont pu caractériser 52 bactéries diazotrophes isolées à partir des tissus de *Musa* spp. et *Ananas comosus* L. Par ailleurs, Chaintreuil et *al.*, (2000) utilisant cinq enzymes de restriction *Hinf* I, *Dde* I, *Mwo* I, *Alu* I et *Hha* I ont pu identifier 30 bactéries diazotrophes isolées à partir des racines du riz (*Oryza breviligulata*) et affiliées aux espèces de *Bradyrhizobium* photosynthétiques. Dans le cadre de notre travail, les quatre enzymes utilisées n'ont permis que la réduction de la diversité génétique par la formation

d'un nombre de groupes phylétiques très restreint. Il s'avère donc important d'inclure dans l'analyse d'autres enzymes et d'autres souches de références parmi les endophytes déjà identifiés à travers le monde.

## *Chapitre VII: Caractérisation phénotypique des bactéries endophytes du caroubier*

### **1. INTRODUCTION**

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées. Elle constitue chez les rhizobiums les mieux étudiés, la base de la description formelle de taxon, depuis les espèces et les sous-espèces jusqu'aux genres et familles (Vandamme et *al.*, 1996). Par ailleurs, elle a été beaucoup exploitée chez les bactéries endophytes associatives pour la séparation des espèces (Baldani et Baldani, 2005).

En dehors de ces informations utiles et utilisables dans l'étude de la biodiversité et la taxonomie, notamment polyphagique, les caractères phénotypiques offrent d'opportunités pour sélectionner des souches efficaces, compétentes et indifférentes aux divers stress environnementaux. Ainsi, ces approches d'ordre fondamental et pratique permettent la détermination d'une inoculation efficace et bénéfique pour les plantes hôtes.

### **2. MATERIEL ET METHODES**

#### **2. 1. Souches bactériennes et milieu de culture**

L'étude phénotypique a concerné 34 bactéries endophytes associées avec le caroubier (30 IRC et 4 IEC) sélectionnées sur la base de l'étude moléculaire REP-PCR; ainsi que 8 souches de collection RCM. Le milieu YEM solide est utilisé pour l'ensemble des tests entrepris. Les boîtes de Pétri sont subdivisées en petits secteurs (18 à 22 carrés) dont chacun estensemencé avec 10 $\mu$ l d'une préculture fraîchement préparée, de densité optique voisine de 1 ( $\approx 10^9$  cellules/ml), à raison d'une souche par secteur. Les tests sont réalisés en double pour chaque traitement. Les cultures sont incubées à 28°C pendant une semaine et la lecture est effectuée par comparaison de la croissance aux témoins.

#### **2. 2. Tolérance à la salinité**

La tolérance des souches à la salinité est évaluée par détermination de la croissance sur milieu YEM solide additionné de NaCl à des concentrations allant de 0 à 12%. Les boîtes de Pétri sont inoculées à partir des précultures bactériennes préparées sur milieu YEM liquide sans sel. La croissance des bactéries est estimée par l'importance du diamètre de la colonie en comparaison à des témoins sans sel.

### 2. 3. Tolérance aux pHs

La tolérance des souches bactériennes aux pHs acides et alcalins est réalisée sur milieu YEM solide. Le pH acide est ajusté par le tampon MES (20mM) (SIGMA) pour les valeurs comprises entre 5.5 et 6.7 et par HCl pour les pHs < 5. Le tampon MOPS (20mM) (SIGMA) est utilisé pour ajuster les pHs variant de 6.5 à 7.9 et le NaOH pour les pHs ≥8.

### 2. 4. Résistance intrinsèque aux antibiotiques

La résistance intrinsèque des souches bactériennes est déterminée sur le milieu YEM solide contenant les antibiotiques suivants: acide nalidixique, ampicilline, chloramphénicol, erythromycine, kanamycine, rifampicine, Spéctinomycine, streptomycine et tétracycline. Ces antibiotiques étant stérilisés par filtration, ont été additionnés aux milieux à des concentrations de 10, 50 et 100 µg/ml.

### 2. 5. Résistance aux métaux lourds

Ce test a été également réalisé sur le milieu YEM solide. Les métaux testés sont additionnés au milieu après stérilisation par filtration aux concentrations suivantes: CdCl<sub>2</sub>: 10-50µg/ml, AlCl<sub>3</sub>: 400-500µg/ml, HgCl<sub>2</sub>: 50-100µg/ml, MnCl<sub>2</sub>:500-600µg/ml et ZnCl<sub>2</sub>: 50-100µg/ml.

### 2. 6. Solubilisation de phosphate

Le test de solubilisation du phosphate a été effectué sur milieu PVK bicalcique solide de bleu de bromophénol, composé de [(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5g/l; extrait de levure, 0.5g/l; phosphate bicalcique, 5g/l; KCl, 0.2g/l; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O, 0.1g/l; glucose, 10g/l; Agar, 15g/l; MnSO<sub>4</sub> en trace; FeSO<sub>4</sub> en trace] pH<sub>6.7</sub> et de Bleu bromophénol, 4ml/l (Pikovskaya, 1948). Les boîtes de Pétri sont inoculées avec 10µl de suspensions bactériennes issues de précultures fraîches, diluée pour avoir une DO de 0.1 à raison de 3 à 4 souches par boîte de Pétri. Les boîtes sont incubées à 28°C. La lecture des résultats est faite après 7j par mesure du diamètre de solubilisation (halo + colonie) et celui de la colonie bactérienne. L'indice de solubilisation est ensuite calculé par le rapport du diamètre total (halo+colonie) et le diamètre de la colonie (Edi-Premono et *al.*, 1996).

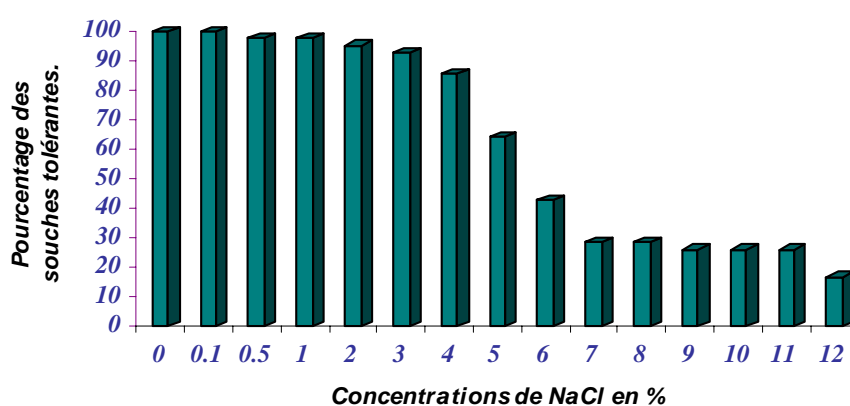
## 3. RESULTATS ET DISCUSSION

La coloration de Gram a montré que toutes les bactéries endophytes (IRC et IEC) ainsi que les souches de la collection RCM, sont des bacilles Gram négatif.

### 3. 1. Tolérance à la salinité

Les souches endophytiques du caroubier montrent une grande tolérance à la salinité, mais cette tolérance est variable suivant les souches et leur origine. En effet, la quasi-totalité des souches testées tolèrent une concentration de NaCl de 3%, plus de 60% peuvent croître sur un milieu contenant 5% de sel. Au-delà de cette concentration le nombre de souches tolérantes diminue pour atteindre 20% à une concentration de sel de 12% (figure VII. 1).

Concernant les souches endophytes d'origine épicotylaires, elles ont toléré une concentration en sel jusqu'à 5%, excepté IEC10 qui a montré une grande tolérance à NaCl (12%). D'autre part, les souches endophytes d'origine racinaire se sont montrées plus tolérantes que les épicotylaires. En effet, 75% d'entre elles tolèrent des concentrations en sel allant jusqu'à 6%. Les 25% restantes de ces isolats racinaires ont une tolérance plus élevée puisqu'elles sont capables de croître à des concentrations de NaCl qui peuvent atteindre 12%. Les résultats consignés dans le tableau VII.1 nous permet de repérer les souches racinaires les moins tolérantes (IRC24 et IRC49), et les souches les plus tolérantes telles que IRC45, IRC50, IRC53, IRC58, IRC61, etc. En ce qui concerne les souches RCM, elles ont toléré pour la majorité 3 à 6 % de sel, seules RCM5 et RCM10 ont poussé sur un milieu contenant 7 à 12% de NaCl. Ces résultats confirment ceux obtenus par Missbah et *al.*, (1996). Ces souches présentent un caractère de tolérance au NaCl semblable aux souches de notre collection (tableau VII.1).



**Figure VII. 1:** Tolérance des endophytes du caroubier à différentes concentrations de NaCl

De nombreuses études ont rapporté que la plupart des endophytes symbiotiques sont sensibles à des concentrations de sel supérieures à 1.5% (Graham et Parker, 1964; Batzli et *al.*, 1992). Au-delà de cette concentration, une grande diversité dans l'osmotolérance des souches, est observée par plusieurs auteurs. En effet, la croissance des espèces *R. galegae*, *M. loti* et *S. fredii* était totalement inhibée en présence de 2% de NaCl, et seule *R. leguminosarum* et *S. meliloti* tolèrent cette concentration (Lindström et Lehttomäki, 1988). Toute fois, les rhizobia isolées des plantes ligneuses (*Acacia*, *Prosopis*, etc.) peuvent tolérer une concentration en NaCl de 3 à 5% (Mohammed et *al.*, 2000; Tilak et *al.*, 2005). Par ailleurs, Zahran et *al.*, (1994) et El Hilali et *al.*, (2007) ont constaté que les isolats du Lupin étaient capables de croître en présence de 10% de NaCl.



**Tableau VII. 1:** Tolérance à NaCl des souches endophytes associatives (IRC et IEC) et symbiotiques (RCM) du caroubier

Souches	0%	0.1%	0.5%	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%	11%	12%
IRC1	3+	3+	3+	3+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC6	3+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	1+	-	-	-	-	-	-	-
IRC7	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC9	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-
IRC11	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-
IRC15	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC18	3+	3+	2+	2+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC19	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC20	2+	3+	2+	2+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC24	3+	3+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC27	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	-	-	-	-	-	-
IRC29	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	-	-	-	-	-	-
IRC32	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	-	-	-	-	-	-
IRC37	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-
IRC42	2+	2+	2+	1+	1+	1+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC43	2+	2+	1+	1+	1+	3+	2+	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC44	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	-	-	-	-	-	-
IRC45	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	1+
IRC47	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	-
IRC49	3+	3+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC50	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+
IRC51	3+	3+	3+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC53	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+
IRC54	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	-
IRC56	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-
IRC57	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	-
IRC58	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	1+
IRC61	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+
IRC66	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	-
IRC73	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	-	-	-	-	-	-
IEC1	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-
IEC4	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-
IEC11	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-
IEC10	2+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	1+	1+
RCM3	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-	-
RCM4	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-	-
RCM5	2+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	-	-	-	-
RCM7	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-	-	-	-
RCM9	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	1+	-	-	-	-	-	-	-
RCM10	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	1+
RCM11	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	1+	-	-	-	-	-	-
RCM12	3+	3+	3+	3+	3+	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3+ : très bonne croissance    2+ : croissance moyenne    1+ : faible croissance    - : pas de croissance.

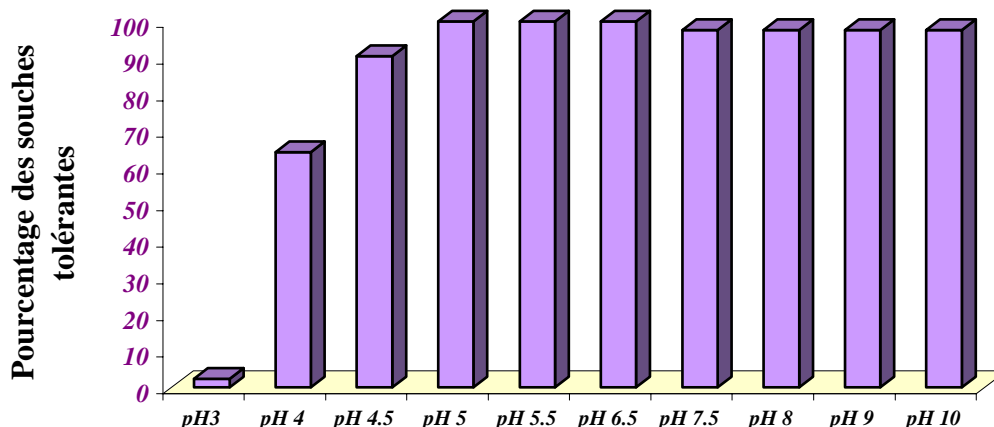
1% NaCl = 0.17M = 99g de NaCl/l.

Lecture des résultats: 7j après l'incubation à 37°C

Les endophytes symbiotiques et associatives peuvent tolérer et survivre en présence d'une salinité élevée, que se soit en culture pure (El Sheikh et Wood, 1989; El Sheikh et Wood 1990; Reva et *al.*, 2002) ou dans le sol (Tilak et *al.*, 2005), supérieure à celle de la plante hôte et c'est le cas des bactéries associatives et symbiotiques du caroubier où la plante tolère 3% de NaCl (Winer, 1980) tandis que les bactéries qui leur sont associée peuvent tolérer 12% de NaCl. Cette remarquable osmotolérance constatée chez les souches de notre collection, est sans doute en relation avec leur capacité à accumuler des solutés compatibles osmoprotectants dont la recherche et l'identification feront l'objet d'une étude en perspective.

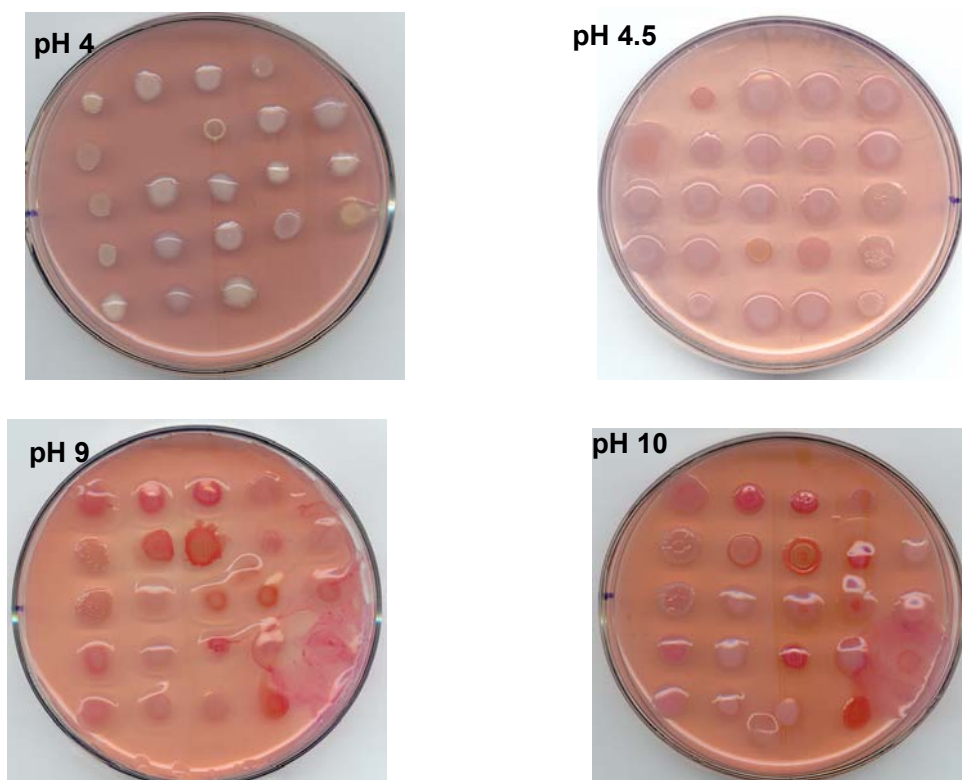
### 3. 2. Tolérance aux pHs

L'effet du pH sur la croissance des souches endophytes du caroubier a révélé que celles-ci se comportent de manière indifférente vis-à-vis du pH du milieu de culture. En effet, la quasi-totalité des souches poussent convenablement à des pHs allant de 4.5 à 10; 60% d'entre elles tolèrent le pH 4 alors qu'elles sont complètement inhibées à pH 3 (figure VII.3, tableau VII. 2).



**Figure VII. 3:** Effet du pH sur la croissance des souches endophytes du caroubier

L'observation macroscopique de ces bactéries en culture sur le milieu YEM à différents pHs montre que les souches tolérant les pHs alcalins (pH 9-10) se comportent de manière identique que lorsqu'elles se trouvaient dans un milieu témoin à pH 7, par contre en milieu acide (pH 4-4.5), les souches acidophiles montrent certains changements à savoir une diminution de la production de gommés avec changement de la couleur des colonies qui deviennent blanchâtres (figure VII. 4).



**Figure VII. 4:** photos montrant la croissance des bactéries à différents pHs.

De manière générale, les résultats obtenus avec les endophytes du caroubier concordent parfaitement avec ce qui a été rapporté par Jordan (1984) qui a constaté que les bactéries appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*, endophytes symbiotiques, tolèrent parfaitement les pHs allant de 4.5 à 9. La tolérance aux pHs les plus acides allant de 3.5 à 4.5, a été rapportée aussi pour les souches appartenant aux espèces de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Mesorhizobium* (Wood et Cooper, 1985; Aurag et Sasson, 1992 ; Maâtallah et *al.*, 2002). Par ailleurs, les études menées par Meghvansi et *al.*, (2005) ont montré que des souches de *Bradyrhizobium japonicum* pouvaient croître dans des sols pauvres en nutriments et à pH 8.4 tout en gardant leur performance symbiotique. Cette expérience confirme que les pHs alcalins ne sont pas aussi néfastes que les pHs acides.

La plasticité de la plupart des isolats du caroubier vis-à-vis du pH, est en parfaite accord avec les rapports selon lesquels les bactéries endophytes associatives sont généralement des neutrophiles et basophiles (Döbereiner, 1976; Nautiyal et *al.*, 2000; Reva et *al.*, 2002). En effet, les souches de *Spirillum lipoferum*, associées avec *Digitaria*, ont montré une croissance optimale et une capacité fixatrice d'azote aux pHs compris entre 6.8 et 7.8 (Day et Döbereiner, 1976). Toutefois, certaines espèces endophytiques, telle que *Gluconacetobacter diazotrophicus* ont montré sur le milieu de culture, non seulement, une croissance optimale à pH5.5, mais aussi la faculté de croître à pH3 et de fixer l'azote atmosphérique à pH2.5 (Gillis et *al.*, 1989; Stephan et *al.*, 1991).

**Tableau VII. 2:** Tolérance aux pHs des souches endophytes du caroubier

Souches	pH 3	pH 4	pH4.5	pH5	pH5.5	pH6.5	pH7.5	pH 8	pH 9	pH 10
IRC 1	-	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
<b>IRC 6</b>	-	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+
IRC 7	1+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+
IRC 9	-	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+
IRC 11	-	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
IRC 15	-	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
IRC 18	-	-	1+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
IRC 19	-	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
IRC 20	-	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+
IRC 24	-	-	1+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
IRC 27	-	-	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+
IRC 29	-	-	1+	1+	2+	3+	2+	2+	2+	2+
IRC 32	-	-	-	2+	2+	2+	1+	1+	1+	1+
IRC 37	-	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
IRC 42	-	-	-	1+	2+	2+	2+	2+	1+	1+
IRC 43	-	-	-	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
IRC 44	-	-	1+	1+	2+	3+	2+	2+	2+	2+
IRC 45	-	-	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+
IRC 47	-	-	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	2+
IRC 49	-	1+	2+	2+	3+	3+	2+	2+	2+	1+
IRC 50	-	-	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
IRC 51	-	1+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+
IRC 53	-	1+	1+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	2+
IRC 54	-	1+	2+	2+	2+	3+	3+	2+	2+	2+
IRC 56	-	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+
IRC 57	-	1+	1+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
IRC 58	-	1+	1+	2+	3+	3+	3+	2+	2+	2+
IRC 61	-	1+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+
IRC 66	-	-	2+	2+	2+	3+	3+	2+	2+	2+
IRC 73	-	-	-	2+	2+	3+	2+	2+	1+	1+
IEC 1	-	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+
IEC 4	-	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+
IEC 11	-	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+
IEC 10	-	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
RCM 3	-	1+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	2+	2+
RCM 4	-	1+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	2+	2+
RCM 5	-	-	1+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+
RCM 7	-	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
RCM 9	-	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RCM 10	-	-	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+
RCM 11	-	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
RCM 12	-	2+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	2+

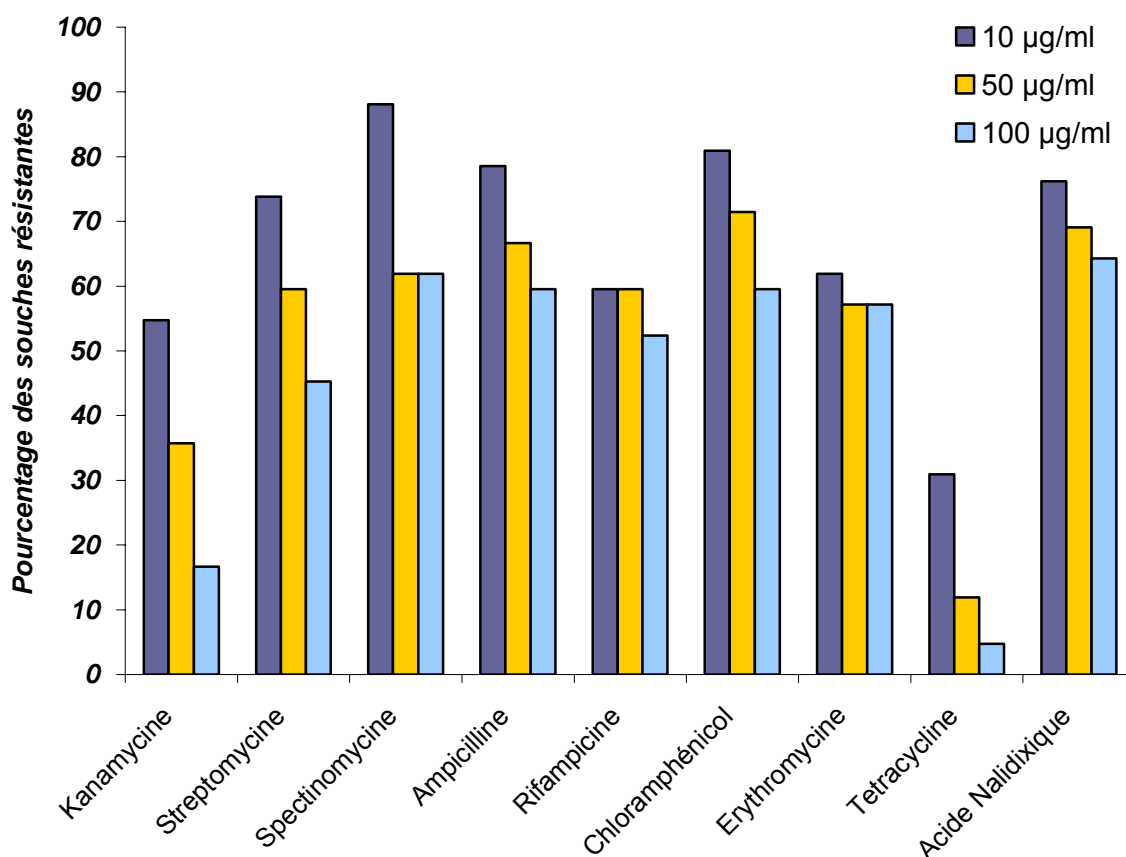
3+ : très bonne croissance    2+ : croissance moyenne    1+ : faible croissance    - : pas de croissance.

La corrélation entre le comportement des bactéries vis-à-vis du pH du milieu de culture et celui de leur sol d'origine est controversée par plusieurs auteurs. Par contre, d'autres auteurs ont conclu que les souches tolérantes à la salinité pourraient être isolées des sols à différents pHs (Wood et Cooper, 1985; Berraho, 1996; Zrhari et *al.*, 2000). Concernant notre résultat, nous constatons que le caractère basophile de nos endophytes issues d'un même sol est plutôt en relation avec la préférence du caroubier pour les sols calcaires à pH alcalin. Il serait légitime de penser que ces souches auraient un caractère adaptatif au pH basique. Néanmoins, aucune généralisation ne peut être faite concernant la relation entre la tolérance au pH extrême et le pH du sol d'origine (Lowendorf et *al.*, 1981).

### 3. 3. Résistance intrinsèque aux antibiotiques

De manière générale, les isolats endophytiques du caroubier ont exhibé une grande résistance aux antibiotiques testés. Il ressort des résultats obtenus (Fig. VII.4) que l'effet inhibiteur de l'antibiotique dépend de sa nature, de sa concentration dans le milieu de culture et de la souche bactérienne. En effet, nous remarquons qu'à une concentration de 10µg/ml d'ampicilline (amp), de chloramphénicol (Chl), d'érythromycine (Ery), de spectinomycine (Spe), de streptomycine (Str), de rifampicine (Rif) et d'acide nalidixique (ac. Nal), 62 à 90% des isolats montraient une bonne résistance. Tandis qu'à la même concentration de tétracycline et de kanamycine, seul 30 à 50% d'isolats toléraient ces antibiotiques. A fortes doses (50 et 100 µg/ml), l'effet inhibiteur est hautement marqué surtout dans le cas de ces deux derniers antibiotiques, tétracycline et kanamycine. Par contre, dans le cas des autres antibiotiques, l'augmentation de leur concentration dans le milieu ne semble pas affecter profondément le profil de résistance des souches de la collection.

Il ressort de cette étude qu'aucun antibiotique n'entrave totalement la croissance de l'ensemble des souches testées. Elle nous a permis également d'identifier, au sein de chaque groupe, des souches ayant un caractère de multiple résistance ou sensibles. En effet, en comparant les isolats entre eux et selon qu'ils soient originaires des racines ou des épicotyles (Tableau VII. 4), on note que les endophytes du caroubier, toute origine confondue, se répartissent en 3 groupes: (i) les souches sensibles ne résistant qu'à un seul si non aucun antibiotique (ex. IRC32, IRC47, IRC61, IEC10, RCM 10,...); (ii) les souches les plus résistantes qui poussent sans entraves en présence de tous les antibiotiques testés sauf la tétracycline et/ou la kanamycine (ex. IRC7, IRC18, IRC19, IRC56, IEC11, RCM9,...); (iii) les souches qui présentent une sensibilité ou une résistance variable selon l'antibiotique.



**Figure VII. 4:** Effet des antibiotiques sur la croissance des endophytes du caroubier

Notre résultat s'accorde beaucoup avec certains travaux réalisés sur d'autres bactéries endophytiques d'origine symbiotique ou associative. En effet, les antibiotiques tels que l'acide nalidixique et l'érythromycine ont été rapportés pour leur faible effet inhibiteur sur les rhizobies nodulant le pois chiche (Maâtallah, 2003). Selon Mohammed et *al.*, (2000) et Zrhari et *al.*, (2000), la rifampicine est l'antibiotique le moins efficace pour affecter la croissance des rhizobies nodulant l'*Acacia*. Par ailleurs, plusieurs espèces de *Bacillus* incluant *B. endophyticus* isolées de l'intérieur des tissus de cotonnier (*Goussypiums* sp.) ont résisté et montré une croissance normalement en présence de 100µg/ml de l'ampicilline (Reva et *al.*, 2002). Ces quatre antibiotiques, même à forte dose, affectent moins la croissance des souches de caroubier.

Par ailleurs, le caractère de multiple résistance, exhibé par la majorité des bactéries endophytes du caroubier vis-à-vis de plusieurs antibiotiques, a été rapporté pour d'autres bactéries. Gillis et *al.*, (1995) ont constaté que des souches de *Burkholderia*, notamment *B. vietnamiensis*, isolées à partir des tissus du riz, ont montré un caractère de résistance multiple aux antibiotiques. La même constatation a été faite chez différentes espèces du genre *Rhizobium* (Schwinghamer, 1967; Cole et Elkan, 1979).

**Tableau VII. 3:** Résistance intrinsèque aux antibiotiques des endophytes du caroubier

Souche	Strep			Spect			Amp			Rif			Kan			Chlo			Ac. nal			Ery			Tet		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
IRC1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
IRC6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
IRC7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IRC9	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IRC11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IRC15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
IRC18	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
IRC19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
IRC20	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
IRC24	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
IRC27	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IRC29	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
IRC32	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
IRC42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC43	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
IRC45	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC47	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC49	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
IRC50	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
IRC51	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
IRC53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IRC54	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
IRC56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
IRC57	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
IRC58	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC61	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IRC66	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
IRC73	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
IEC1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IEC4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IEC10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
IEC11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
RCM3	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
RCM4	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
RCM5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	
RCM7	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
RCM9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
RCM10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RCM11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RCM12	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

1 correspond à 10µg/ml. 2 correspond à 50µg/ml. 3 correspond à 100µg/ml. (+) résistante, (-) sensible

### 3. 4. Résistance aux métaux lourds

Les résultats obtenus montrent que les endophytes associatives du caroubier ont une grande résistance aux métaux lourds testés (Figure VII. 5). Le mercure est le métal le plus toxique, à une concentration de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , seules 18% des souches lui résistent. Tandis que les autres métaux, même à des concentrations relativement élevées sont moins néfastes pour la majorité des souches testées.

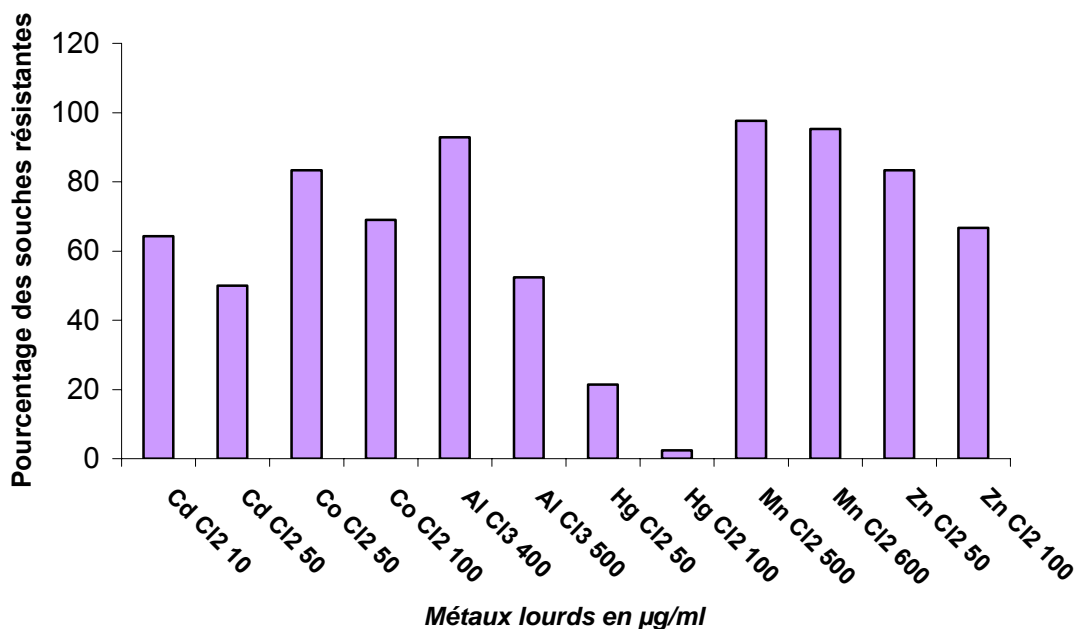


Figure VII. 5: Effet des métaux lourds sur la croissance des endophytes du caroubier

Le manganèse est le métal le moins toxique car même à très forte concentration, la croissance des souches n'est pas affectée. L'aluminium à une concentration de 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  inhibe 10% des souches, et à 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  inhibe la moitié des souches. Pour le cobalt et le zinc, plus de 60% des souches résistent à une concentration de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Pour le cadmium, 65% des souches résistent à une concentration de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et la moitié des souches à 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Selon que les souches, soient d'origine épicotylaire ou racinaire, leur résistance est très variable (tableau VII.4). Parmi les souches racinaires (IRC), 6 d'entre elles résistent aux 6 métaux lourds, et seule une souche IRC32 résiste à un seul métal qu'est le manganèse. Les souches épicotylaires (IEC) ne sont sensibles qu'au mercure sauf la souche IEC10 qui n'est résistante qu'au manganèse. Toutes les souches de la collection RCM résistent au moins à 3 métaux lourds. Les résultats obtenus avec ces « rhizobia » s'accordent avec les résultats de Missbah et *al.*, (1996) et concordent avec les résultats obtenus avec les souches de notre collection.



**Tableau VII. 4:** Résistance intrinsèque aux métaux lourds des souches endophytes du caroubier

Souche	CdCl <sub>2</sub>		CoCl <sub>2</sub>		AlCl <sub>3</sub>		HgCl <sub>2</sub>		MnCl <sub>2</sub>		ZnCl <sub>2</sub>	
	10	50	50	100	400	500	50	100	500	600	50	100
IRC1	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
IRC6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
IRC7	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
IRC9	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
IRC11	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
IRC15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IRC18	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
IRC19	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
IRC20	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
IRC24	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
IRC27	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
IRC29	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
IRC32	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
IRC37	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
IRC42	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
IRC43	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
IRC44	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
IRC45	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
IRC47	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
IRC49	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
IRC50	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
IRC51	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
IRC53	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
IRC54	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
IRC56	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
IRC57	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
IRC58	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
IRC61	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
IRC66	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
IRC73	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
IEC1	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
IEC4	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
IEC10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
IEC11	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
RCM3	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
RCM4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
RCM5	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
RCM7	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
RCM9	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
RCM10	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
RCM11	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
RCM12	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+

(+ ) résistante

(- ) sensible

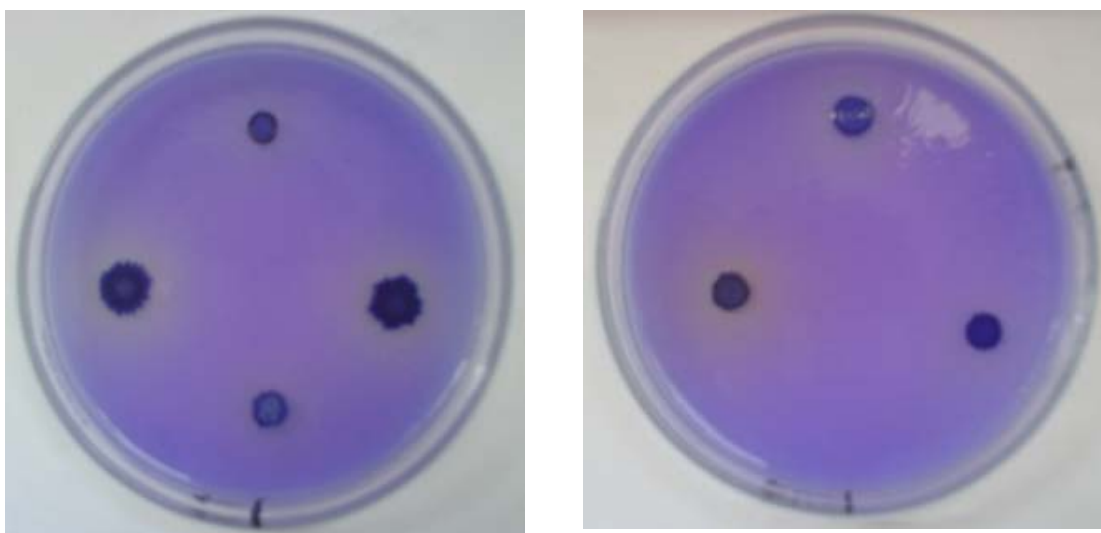
[C] en µg/ml

Le niveau de résistance aux métaux lourds exhibé par les endophytes du caroubier, apparaît relativement élevé par rapport à celui manifesté en générale par les rhizobia. Toute fois, leur résistance aux métaux est très proche de celle manifestée par des souches rhizobiales nodulant

*Acacia* sp. (Mohamed et al., 2000), mais peu différente de celle exhibée par les souches de rhizobium isolées chez *Cicer arietinum* (Maâtallah et al., 2002). De manière générale, comparés à différentes espèces de rhizobia, les endphytes isolées des racines et des épicotyles du caroubier ainsi que celles de la collection RCM exhibent une bonne tolérance aux métaux lourds. Cette caractéristique pourrait être exploitée ultérieurement dans les essais de bioremédiation qui visent à améliorer la qualité des sols des sites contaminés par des métaux lourds.

### 3. 5. Solubilisation de phosphate

Le test de solubilisation du phosphate montre que 70% des bactéries endophytes du caroubier étaient capables de solubiliser le phosphate inorganique sous forme bicalcique. Cette solubilisation est révélée par la présence d'un halo autour de la colonie bactérienne; la variation du diamètre de ce halo montre qu'il y a une variabilité dans le pouvoir de solubilisation du phosphate entre les souches testées (figure VII. 6). Le calcul de l'indice de solubilisation permet d'évaluer le pouvoir solubilisateur d'une souche bactérienne et la comparer à d'autres (tableau VII. 5).



**Figure VII. 6:** photos des colonies bactériennes avec le halo de solubilisation.

Parmi les endophytes racinaires, 4 souches IRC (42, 53, 61 et 73) ont été, par rapport aux autres, très efficaces avec un indice de solubilisation (IS) variant de 1.63 à 1.70. Chez les endophytes épicotylaires, 3/4 souches ont été positives et leurs IS varie de 1.63 à 2.13. Par contre, parmi les souches de la collection RCM, seules RCM5 et RCM9 ont montré une activité solubilisatrice de phosphate satisfaisante.

**Tableau VII. 5:** Solubilisation du phosphate par les endophytes associatives et symbiotiques du caroubier

Souches	Diamètre colonie (cm)	Diamètre halo+colonie (cm)	Halo+colonie/colonie
IRC1	-	-	-
IRC6	-	-	-
IRC7	-	-	-
IRC9	0,9	1,2	1.33
IRC11	0,8	1	1.25
IRC15	-	-	-
IRC18	-	-	-
IRC19	0,9	1,2	1.33
IRC20	1,7	1,1	1.24
IRC24	0,9	1,2	1.33
IRC27	0,7	1	1.43
IRC29	-	-	-
IRC32	-	-	-
IRC37	0,8	1,1	1.38
IRC42	1,1	1,8	1.64
IRC43	1,2	1,6	1.33
IRC44	0,9	1,1	1.22
IRC45	1,7	2,3	1.35
IRC47	1,2	1,7	1.42
IRC49	1	1,6	1.6
IRC50	1,9	1,4	1.36
IRC51	-	-	-
IRC53	0,8	1,3	1.63
IRC54	1,1	1,7	1.55
IRC56	0,8	1,2	1.5
IRC57	1,2	1,7	1.42
IRC58	1,1	1,7	1.55
IRC61	1	1,7	1.7
IRC66	1,6	2,2	1.36
IRC73	1,1	1,8	1.64
IEC1	1,2	1,4	1.17
IEC4	0,8	1,3	1.63
IEC10	0,8	1,7	2.13
IEC11	-	-	-
RCM3	-	-	-
RCM4	-	-	-
RCM5	1	1,5	1.5
RCM7	-	-	-
RCM9	0,7	1	1.43
RCM10	1,1	1,4	1.27
RCM11	0,8	1	1.25
RCM12	-	-	-

L'indice de solubilisation obtenu avec les endophytes du caroubier, qui sont des bacilles Gram négatif, est plus au moins en accord avec les résultats rapportés par Rashid et *al.*, (2004) selon

lesquels les bactéries Gram négatif sont souvent plus efficaces dans la solubilisation du phosphate minéral grâce à leur capacité de produire de l'acide gluconique impliqué dans ce phénomène. Plusieurs travaux ont démontré la capacité des bactéries rhizosphériques telles que les espèces de *Bacillus* et de *Pseudomonas* de solubiliser les phosphates. (Rodriguez et Fraga, 1999; Verma et al., 2001). Récemment, une équipe iranienne a examiné cette activité solubilisatrice chez différents rhizobies natifs des sols iraniens. Elle a constaté leur que IS est compris entre 2,48 pour *Rhizobium leguminosarum* bv. *Vicia* et 1,41 pour *Mesorhizobium ciceri*, *M. mediterraneum* et *Sinorhizobium meliloti* (Alikhani et al., 2006). Par ailleurs, Piyush et al., (2005) ont isolé une souche bactérienne du genre *Burkholderia* sp. MSSP à partir des nodules racinaires de *Mimosa pudica* et qui est caractérisée par un très grand pouvoir de solubilisation du phosphate tricalcique, avec un IS de 2,15.

Ces endophytes associatives du caroubier, tous des bacilles Gram négatif et dotés pour la plupart d'entre eux, de capacité à solubiliser le phosphore, ont montré des comportements analogues à ceux des rhizobies vis-à-vis de différents tests phénotypiques effectués. Parmi elles, certaines ont montré, sur le plan moléculaire, une tendance de rapprochement à certaines espèces de rhizobies. Par conséquent, le caroubier qui apparaît incapable de former en symbiose des nodules racinaires avec les rhizobies, tisse en contre partie des relations associatives avec différents types de bactéries du sol. La présence de ces bactéries endophytes associatives à l'intérieur des tissus végétatifs ne serait pas fortuite, elle contribuerait probablement d'une manière significative dans la palliation aux insuffisances nutritionnelles du caroubier qui s'installe favorablement sur des sols pauvres. Ces bactéries endophytes associatives sont, en générale, reconnues pour les rôles importants qu'elles jouent dans le développement et dans l'amélioration de la productivité de leurs plantes hôtes. Plusieurs auteurs ont rapporté leur efficacité dans la fixation de l'azote moléculaire, à l'intérieur des tissus des plantes hôtes (en dehors de nodules), (Baldani et Baldani, 2005; Boddy et al., 1995; Boddy et Döbereiner, 1982; Chaintreuil et al., 2000; Egner et al., 1999; Urquiga et al., 1992). En plus, elles possèdent une grande faculté de solubiliser et libérer certains éléments d'origines minérales ou organiques essentiels pour la nutrition des plantes, tels que le phosphore et le fer (Gaur, 1990; Gaur et al., 2004; Kole et Hajra, 1998; Nautiyal, 1999; Rodriguez et Frag, 1999; Sundara et al., 1963; Tilak et al., 2005). Par ailleurs, elles sont très utilisées comme étant des agents de biocontrôle et donc une alternative à l'usage des fongicides (Barka et al., 2002; Benhamou et al., 1996; Chen et al., 1995). Elles jouent un rôle significatif dans la protection des plantes contre les champignons et d'autres micro-organismes ou insectes pathogènes, entraînant ainsi la protection de la productivité globale de l'écosystème agricole (Akutsu et al., 1993; Frommel et al., 1991b; Hallman et al., 1997; Li et al., 2005; Sturz et al., 2000).

## *Conclusion générale et perspectives*

Le caroubier, une légumineuse typiquement méditerranéenne, largement repartie au Maroc sous forme de peuplements spontanés ou artificiels. Comparativement aux essences forestières, cette espèce agro-sylvo-pastorale, ayant d'énormes intérêts socio-économiques et écologiques, reste encore très peu étudiée. Le présent travail qui traite du polymorphisme phénotypique et moléculaire du caroubier provenant de différentes régions du Maroc a été concluant. En effet, il a permis d'atteindre les objectifs que nous nous sommes fixés au début, à savoir la définition et disposition de procédures phénotypiques et moléculaires nécessaires pour établir des bases génétiques utiles pour la gestion et l'exploitation rationnelle de ces ressources génétiques du caroubier marocain.

Au cours de ces travaux de recherche, nous avons pu, en premier lieu, catégoriser les différentes provenances de caroubier en se basant sur l'analyse des traits morpho-argonomiques liés aux fruits, ensuite étudier leur diversité moléculaire et établir leur phylogénie. En second lieu, nous avons isolé des bactéries endophytes associatives à partir des organes végétatifs des plantules de différentes accessions puis les caractériser génétiquement et phénotypiquement.

L'étude phénotypique basée sur les traits des gousses de différentes provenances de caroubier a permis de révéler un polymorphisme inter accessions et de catégoriser et d'établir une fiche descriptive préliminaire pour chaque accession. Selon l'importance morpho-agronomique et économique de certains traits du fruit, nous avons distingué 4 catégories d'accessions. La 1<sup>ère</sup> catégorie renfermant Ouazzane et Aïn Safa est dotée d'une qualité notable de fruits ; la 2<sup>ème</sup> ayant une qualité acceptable englobe les provenances de Al Houceima et Akhort ; la 3<sup>ème</sup> dotée d'une «mauvaise» qualité de fruits inclus Taounate, Sidi Bou othmane, Demnate et Taourirt ; tandis que la 4<sup>ème</sup> catégorie contenant l'unique accession d'Essaouira est qualitativement chevauchante entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> catégorie. Cette séparation des accessions a été en grande partie appuyée et confirmée, d'une part, par une classification hiérarchique *via* la méthode UPGMA et d'autre part, par l'étude de la variabilité de la dureté tégumentaire des graines estimée par digestion sulfurique. Ainsi, pour avoir un meilleur taux de germination, les graines ont été tributaires à une durée de 60, 45 ou 30min de trempage dans l'acide sulfurique concentré selon la catégorie d'accession.

L'analyse moléculaire des accessions a été précédée par la mise au point d'un protocole d'extraction de l'ADN génomique et des méthodes d'amplification en PCR par ISSR, RAPD et AFLP. L'usage du protocole de Ouenzar et *al.* (1998) profondément modifié a permis d'obtenir, à partir des feuilles fraîches du caroubier, des extraits d'ADN de très bonne quantité variant de 955 à 1765ng/μl et de qualité et dont le rapport de ADN/protéine varie de 1.70 à 2.

L'analyse de ces dix accessions par les marqueurs ISSR a permis significativement leur différenciation. Les 16 amorces utilisées en PCR pour amplifier l'ADN bulk de chaque accession

se sont révélées polymorphes. Au total, 176 bandes reproductibles dont 137 polymorphes (77.27%) ont été amplifiées. 13 amorces ayant générées des marqueurs monomorphes (22.73%) ont été identifiées et pourraient être proposées comme étant des amorces spécifiques à l'espèce de *Ceratonia siliqua* L. L'usage de ces bandes ISSR dans l'analyse statistique UPGMA a montré une large diversité génétique notamment à un niveau de similarité voisinant 86-90 %.

Toutefois, l'analyse moléculaire faite par la technique RAPD a été par rapport à celle de ISSR plus éloquente et discriminante. L'utilisation de 52 amorces RAPD a généré 373 marqueurs polymorphes et permis d'identifier 10 amorces, ayant des bandes monomorphes, qui seraient liées à cette plante. Le dendrogramme construit à l'issue de l'analyse statistique de ces marqueurs par la méthode UPGMA a montré un degré élevé de diversité génétique et un réarrangement significatif des accessions. Ainsi, à 85% d'identité, chaque accession constitue une branche indépendante. Par contre, à 70% de similitude, on a obtenu un cluster composé de cinq accessions: Aïn Safa, Demnate, Sidi Bou Othmane, Essaouira et Ouazzane; et cinq accessions individuelles, Taourirt, Akchort, Tétouan, Al Houceima et Taounate, constituant chacune une branche libre et génétiquement éloignée les unes des autres.

Par ailleurs, l'analyse des marqueurs cumulés, ISSR, RAPD et la durée de scarification sulfurique des graines de chaque accession, a généré *via* méthode UPGMA, une classification analogue à celle révélée par la RADP et qui est, en grande partie, en désaccord avec leur répartition géographique. En effet, six accessions proches génétiquement appartiennent à trois différentes régions (NE, E, SE) du Maroc. Tandis que, les deux accessions (Tétouan et Al Houceima) situées sur la côte méditerranéenne et celles de Taourirt et de Taounate situées sur le flanc Nord continental, ont montré une forte tendance d'indépendance et probablement seraient des populations naturelles ou spontanées. Par ailleurs, l'éloignement génétique de l'accession de Taounate par rapport aux autres suppose qu'elle serait composée de type sauvage du caroubier propre au Maroc. Cependant, les six accessions proches génétiquement et éloignées géographiquement, seraient le résultat du phénomène de dissémination ou dérive génétique. Ainsi, le polymorphisme inter-accession révélé dans ces analyses témoigne du pouvoir discriminant des marqueurs ISSR et RAPD.

La légumineuse *Ceratonia siliqua*, d'après les observations *in situ*, les essais de piégeage au laboratoire et d'authentification des souches dites « rhizobium » de la collection de Missbah et *al.* (1996), n'a pu être nodulée. Cependant, l'utilisation dans un test de rhizogénèse en culture *in vitro*, des plantules qui ont servi pour authentifier les souches RCM, a occasionné l'observation des bactéries émanant de ces explants, d'où l'initiative d'isoler directement des bactéries à partir des organes végétatifs du caroubier. Ainsi, une large collection de bactéries endophytes associatives isolée des racines et des épicotyles des plantules de différentes accessions a été établie. Au total, 73 bactéries endophytes ont été isolées des racines (IRC) dont 26% sont originaires de l'accession de Taounate considérée auparavant comme étant le type sauvage du Maroc, et 11 sont isolées

des épicotyles (IEC). Ces nouveaux isolats et les souches RCM ont fait l'objet de caractérisations moléculaires et phénotypiques.

L'analyse du polymorphisme des empreintes génomiques par la PCR/REP a montré que les souches du caroubier sont caractérisées par une importante hétérogénéité. Le niveau de la diversité a été très élevé notamment au sein des isolats racinaires. Cette technique également utilisée comme moyen de criblage, a permis la sélection des souches représentatives de chaque groupe Rep dont 30 IRC, 4 IEC et RCM. Par ailleurs, la caractérisation de ces souches sélectionnées via l'analyse du gène 16S ADNr par PCR/RFLP a également confirmé cette variabilité. L'analyse statistique des différents profils de restrictions enzymatiques donnant lieu à l'établissement de leur phylogénie, a subdivisé ces souches en six clusters distincts à 50% de similarité. Deux clusters renfermant certaines souches IRC, IEC et RCM, ont montré certain rapprochement avec les souches de référence de rhizobia utilisées. Tandis que le sixième cluster composé de 52.4% des souches sélectionnées, a été hétérogène et très éloigné de tous les autres clusters.

L'étude des caractéristiques phénotypiques a permis, d'une part, de montrer que ces bactéries endophytes associatives et symbiotiques du caroubier sont très proches aux rhizobiums et d'autre part, de repérer des souches plus tolérantes aux différents stress environnementaux. En effet, ces souches sont Gram négatives et 70% d'entre elles sont capables de solubiliser le phosphate. Elles ont montré une forte tolérance et variable au sel (NaCl) et aux pHs. En effet, elles sont susceptibles de tolérer et de croître en présence des concentrations en sel de l'ordre de 12% (2M NaCl) et des pHs allant de 4 à 10. Concernant leur résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds, les souches du caroubier se sont avérées sensibles à la tétracycline et la kanamycine. Par contre, elles ont exhibé une résistance même à fortes doses d'acide nalidixique, d'ampicilline, de chloramphénicol, d'érythromycine, de rifampicine, de spectinomycine et de streptomycine. Par ailleurs, elles ont manifesté un caractère de résistance multiple aux différents métaux lourds testés, excepté pour le mercure qui est néfaste même à faibles concentrations.

La biodiversité révélée, lors de ces études, par les outils moléculaires et phénotypiques et la forte ressemblance phénotypique de ces souches aux rhizobia, témoigne solidement que le caroubier abrite dans ses organes végétatifs des bactéries endophytes associatives. Par ailleurs, Bryan et *al.* (1996), sans avoir isolé de bactéries, *in vitro*, ont détecté l'activité de la nitrogénase dans les racines et bourgeons du caroubier.

L'originalité de ces travaux, permettant l'évaluation de la diversité phénotypique et génétique du caroubier et des bactéries endophytes qui lui sont associées, constitue une valeur scientifique considérable et prometteuse. Cependant, l'ouverture de nouvelles perspectives, dans le but de rentabiliser davantage nos investigations, reste judicieuse:

1. L'élargissement de cette collection du caroubier en y apportant de nouvelles accessions provenant de toutes les régions du Maroc non étudiées.

2. Enrichir les données de différentes collections ou accessions avec d'autres informations utiles telles que la nature de plantation (cultivée ou spontanée), âge, production, exposition,.....
3. Evaluer la diversité génétique intra-accession et entre les types sauvages et cultivés au Maroc.
4. Confronter les résultats d'analyse de ressource génétique marocaine du caroubier à ceux de certains pays méditerranéens afin de construire un arbre phylogénétique global.
5. Repérer, sur le terrain, les pieds mâles, femelles et hermaphrodites et les exploiter dans un programme axé sur la détermination de potentiels marqueurs moléculaires liés au sexe *via* les techniques ISSR, RAPD et AFLP.
6. Procéder à l'inoculation de ces bactéries endophytes du caroubier à d'autres plantes légumineuses pour pouvoir vérifier leur faculté à noduler.
7. Confirmer certains précédents tests phénotypiques en milieu liquide et parallèlement réaliser de nouveaux tests tels que l'utilisation des sources de carbone, production de sidérophore,...
8. Mener des études histologiques qui permettent la localisation de ces bactéries à l'intérieur des tissus des plantes inoculées et procéder au moyen de détection de l'activité de nitrogénase *in vivo*.
9. Examiner le pouvoir de ces endophytes à contribuer à la bioprotection du caroubier contre certains agents pathogènes tels que les champignons *Oidium ceratoniae* et *Polyporus sulphureus*.
10. Préciser la position taxonomique des souches candidates et intéressantes du caroubier *via* séquençage complet de l'ADNr 16S.



## Références bibliographiques

- Aafi A. (1996).** Note technique sur la caroubier (*Ceratonia siliqua* L.). Centre Nationale de la Recherche Forestière. Rabat (Maroc). 10p.
- Achhal A., Akabli O., Barbro M., Benabide A., M'Hirit O., Peyre C., Quezel P. et Rivaz-Martinez S. (1980).** A propos de la valeur bioclimatique et dynamique de quelques essences forestières au Maroc. *Ecologia Mediterranea*, n°5.
- Adam A. F. et Dron M. (1993).** Les outils moléculaires et leur applications à l'amélioration des plantes. Dans: Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire et des gènes? Ed. AURELP-UREF. John Libbey Eurotex, Paris, pp. 23-46.
- Aggarwal R. K., Brar D. S., Nandi S., Huang N. and Khush G. S. (1999).** Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 98:1320-1328.
- Ahmad M., McNeil D. L., Fautrier A. G., Armstrong K. F. and Paterson A. M. (1996).** Genetic relationships in len species and parentage determination of their interspecific hybrid using RAPD marker. *Theor. Appl. Genet.* 92:1091-1098.
- Akutsu K., Hirata A., Yamamoto M., Hirayae K., Okuyama S. and Hibit T. (1993).** Growth inhibition of *Botrytis* sp. by *Serratia marcescens* B<sub>2</sub> isolated from tomato phylloplane. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 59: 18- 25.
- Albanell E., Caja G. and Plaixats J. (1991).** Characterization of Spanish carob pod and nutritive value of carob kibbles. *Options Méditerranéennes* 16: 135- 136.
- Alikhani H.A., Saleh-Rastin N. and Antou H. (2006).** Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant and Soil*, 287, 35–41.
- Alonso-Blanco C., Peeters A. J., Koornneef M., Lister C., Dean C., van der Bosch N., Pot J. and Kuiper M. T. (1998).** development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *Plant J.* 2:259-271.
- Alorda M. and Medrano H. (1988).** Posibilidades del estaquillado como técnica alternativa de propagación del algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.). pp. 379-386. in Proceedings of the II International Carob Symposium (P. Fito and Mulet, eds.). Valencia, Spain.
- Alorda M. and Medrano H. (1996).** Micropropagation of *Ceratonia siliqua* L.: a method to clone nature carob tree selected from the field. In Proceedings of the III International Carob Symposium. Cabanas, Tavira, Portugal (in press).
- Alorda M., estades J., Galmes J. and Medrano H. (1987).** Promotion of rooting in carob cuttings. *Gartenbauwissenschaft.* 52 (1):31-34.
- Amarger N., Macheret V. and Laguerre G. (1997).** *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules, *Int. J. Bacteriol.* 47: 996- 1006.
- Amellal N., Burtin G., Bartoli F. and Heulin T. (1998).** Colonization of wheat roots by EPS-producing *Pantoea agglomerans* and its effect on rhizosphere soil aggregation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 3740-3747.
- Andrews J. H. and Harris R. F. (2000).** The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 145- 180.
- Angers D. A. and Mehuys G. R. (1989).** Effects of cropping on carbohydrate content and water stable aggregation of a clay soil. *Can. J. Soil Sci.* 69: 373- 380.
- Ann M. H., Dietz B. W., David B. M., Julie C., Brett T. and John I. Y. (2003).** Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecological Society of America* 84 (4), pp. 858- 868.
- Anyango B., Wilson K. J. and Giller K. E. (1995).** Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenya soils with contrasting pHs. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4016- 4021.

- Appana V.D. and Preston, C.M., (1987).** Manganese elicits the synthesis of o novel exopolysaccharides in an arctic Rhizobium. *FEBS Letters*, 215, 79-82.
- Armstrong W. (1978).** Root aeration in the wet land condition. Pages 269- 297 in: Plant Life in Anaerobic Environments. D. D. Hook and R. M. M. Crawford, eds, *Ann. Arbor. Science Pub. Ann. Arbor. M.I.*
- Arnold M. L., Buckner C. M. and Robinson J. J. (1991).** Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in *Louissiana irises*. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:1398-1402.
- Arreghini R. I. (1972).** Presowing treatment of seed of *Prosopis caldenia*. Seventh World Forestry Congress, Proceeding, (Buenos Aires, Argentina, October, 1972).
- Arumuganthan K. and Earle E. D. (1991).** Estimation of nuclear DNA content of plant by flow cytometry. *Plant Mol. Biol. Repr.* 9,3:229-233.
- Aurag J. and Sasson A. (1992).** Tolerance of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity and drought. *World J. Microbiol. Biotech.* 8:532-533.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moor D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl. (1987).** Current protocols in molecular biology. Volume 1, Wiley Inter Science. Chapitre 1.2.1.
- Azam F., Mulvaney R. L. and Stevenson F. J. (1989).** Synthesis of <sup>15</sup>N-labelled microbial biomass in Soil *in situ* and extraction of biomass N. *Biol. Fert. Soil.* 7: 180- 185.
- Bacilio-Jiménez M., Aguilar-Flore S., del Valled M. V., Pérez A., Zepeda A. and Zenteno E. (2001).** Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry.* 33: 167- 172.
- Baird W. V., Ballard R. E., Rajapakse S. and Addott A. G. (1996).** Progress in *Prunus* mapping and application of molecular to germplasm improvement. *HortScience.* 31:1099-1106.
- Bajpai M. A. and Totawat K. L. (1976).** Efficacy of sulphuric-acid seed treatment on germination of *Prosopis spicigera*. *Rajasthan J. Aric. Sci.* 2:18-20.
- Baldani J. I. and Baldani V. L. D. (2005).** History on the biological nitrogen fixation research graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Brass. Sci.* 77: 549- 579.
- Baldani V. L. V. and Döbereiner J. (1980).** Host-plant specificity in the interaction of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.* 12: 433- 439.
- Baldani J. I., Baldani V. L. D. Sampaio M. J. A. M. and Döbereiner J. (1984).** A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. *Ann. Acad. Bras. Cien.* 56: 365.
- Baldani J. I., Baldani V. L. V., Seldin L. and Döbereiner J. (1986a).** Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 86-93.
- Baldani J. I. et al. (1996).** Emended description of *Herbaspirillum*: a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. comb. nov.; and classification of a group of clinical isolated (E. F. group1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 802- 810.
- Baldani J. I., Baldani V. L. D., Goi S. R. and Döbereiner J. (1997).** Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.*, 29: 911- 922.
- Baldani V. L. D., Oliveira E., Balota E., Baldani J. I., Kirchhof G. and Döbereiner J. (1997b).** *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma espécie de bacteria diazotrófica endofítica. *An Acad Bras Cienc.* 69: 116.
- Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J. V., Vangronsveld J. and Lelie D. V. L. V. (2004).** Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation water-soluble, volatile, organic pollutant. *Nature Biotechnology.* 22: 583- 588.
- Barka E. A., Gognies S., Nowak J., Audran J. and Belarbi A. (2002).** Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control.* 24: 135-142.
- Barracosa P., Almeida M. T. and Cenis J. (1996).** Characterization of cultivars of carob tree in Algarve (Portugal). In Proceedings of the III International Carob Symposium. Cabanas-Tavira, Portugal (in press)
- Batista M. T., Amaral M. T. and Proença Da Cunha A. (1996).** Carob fruits as source of natural antioxidant. In Proceeding of the III International Carob Symposium. Cabanas-Tavira, Portugal.
- Battle I. (1997).** Current situation and possibilities of development of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) in the Mediterranean region. Unpublished FAO Report. Rome. Italy.

- Batlle I. and Tous J. (1988).** Lineas de investigación sobre el algarrobo (*Ceratonía siliqua* L.) en el IRTA, Cataluña (España). In: Brito de Carvalho JH, ed. I Encorto Linhas de Investigaçao de Alfarroba. AIDA, Oeiras: AIDA, 92-104.
- Batlle I. and Tous J. (1997).** Carob tree. *Ceratonía siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetic and Crops Plant Research. Gatersleben/International Plant Resources Institute. Rome. Italy.
- Batlle I., Rovira M. and Tous J. (1996).** Carob germplasm characterization using isozymes. In Proceedings of the III International Carob Symposium. Cabanas-tavira, Portugal (in press).
- Batzli J. M. C., Graves W. R. and Berkum P. V. (1992).** Diversity among rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2137-2143.
- Baytop T. (1984).** Therapy with medicinal plant in Turkey (Past and Present). Publication of the Istanbul University. No: 3255. Istanbul.
- Beaggar M., Andersen O., Neilsen J. D. and Rytting K. L. (1996).** Dietary fibre reduce blood pressure serum total cholesterol and platelet aggregation in rats. *British J. Nutr.* 75: 483- 493.
- Beckmann J. S. and Söller M. (1986).** RFLP in plant genetic improvement. Oxford Surveys in *Plant Molecular and Cell Biology*.
- Belaizi M., Blen M. R. et Boxus P. (1994).** Régénération des plantes? Ed. AUPEL-UREF.J.L. Eurotex. Paris. P: 227-232.
- Belaj A., Trujillo I., de la Rosa R. and Rallo L. (2001).** Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in Olive germplasm bank. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:64-71.
- Belkadi B. (2003).** Diversité génétique et phylogénie des Aegilops L. du Maroc. Thèse Doc. Univ. Mohammed V. Fac. Sci. Rabat. Maroc.
- Bell C. R., Dickie G. A., Harvey W. L. G. and Chan J. W. Y. F. (1995).** Endophytic bacteria in grapevine. *Can. J. Microbiol.* 41: 46- 53.
- Benhamou H., Gagné S., Le Quéré D. and Dehbi L. (2000).** Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: Beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia phymthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Am. Phthopathol. Sc.* 90:45-56.
- Benhamou N., Kloepper J. W., Quandt-Hallman A. and Tuzons S. (1996).** Induction of defense-related ultrastructural modification in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiol.* 112: 919-929.
- Bennani N. (2004).** Diversité physiologique et moléculaire des bactéries totales isolées du désert marocain. Dans: mémoire du DESA. Univ. Abdelmalek Essaadi. Fac. Sci. Tétouan.
- Beringer J. E. (1974).** R. Factor transfert in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84:188-198.
- Berraho EL. (1996).** Contribution à l'étude de la biodiversité des souches de *Rhizobium* nodulant le pois chiche isolées de zones arides et semi-arides du Maroc et de leur nutrition ferrique. Thèse du Doctorat d'Etat Es-Sciences. Univ. Mohammed V. Rabat.
- Bertheau Y., Darrasse A., Jouan B., Kotousky A. and Priou S. (1993).** Amplification enzymatique *in vitro* d'ADN et ses applications. In: Le progrès génétique passe t'il par le repérage et l'inventaire des gènes? Ed. AUPELF-UREF. John Libey Eurotext. Paris, pp. 3-22.
- Bertrand H., Plassard C., Pinochet X., Touraine B., Normand P. and Cleyet-Marel J. C. (2000).** Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth- promoting rhizobiums (*Achromobacter* sp). *Can. J. Microbiol.*, 46: 229- 36.
- Bezzate S., Aymerich S., Chambert R., Czarnes S., Berge O. and Heulin T. (2000).** Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 2(3): 333- 342.
- Birkam S. and Kimber G. (1974).** A new C- bading technique for cereal chromosomes. Cereal Research Communications, vol. 2,2:87-94.
- Bloemberg G. V., Otool G. A., Lugtenberg B. J. J. and Kolter R. (1997).** Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4543- 4551.
- Boddey R. M. and Döbereiner J. (1982).** Association *Azospirillum* and other diazotrophs with tropical gramineae. In: *International Congress of Soil Science, 12, New Delhi, India.* Non-symbiotic nitrogen fixation and organic matter in the tropics, p. 28- 47.

- Boddey R. M. (1995).** Biological nitrogen fixation in sugarcane: A key to energetically viable bio-fuel production. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14: 263- 279.
- Boddey L. H. (2003).** Ocorrência e diversidade de bactérias diazotrófica do gênero *Burkholderia*, isoladas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) cultivadas na Austrália e no Brasil. *DSc Thesis, Univ. Federal Rural do Rio Janeiro, R J. Brasil.*
- Boddey R. M., Oliveira O. C., Urquiaga S., Reis V. M., de Olivares F. L., Baldani V. L. V. and Döbereiner J. (1995).** Biological nitrogen fixation association with sugarcane and rice: contribution and prospects for improvement. *Plant Soil.* 174: 195- 209.
- Boivin C. And Giraud (1999).** Molecular symbiotic characterization of rhizobia: Toward a polyphasic approach using Nod factors and *nod* genes, in: Martinez-Romero E., Hernandez G. (Eds.), *Highlights of Nitrogen fixation Research*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 295- 299.
- Bolonos M. (1955).** Rapport sur le caroubier. Instituto forestal de Investigaciones y experiencias Madrid (Espagne) 9p.
- Boncompagni E., Ostrerás M., Poggi M. and Le Rudulier D. (1999).** Occurrence of choline and glycine betaine uptake metabolism in rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2072- 2077.
- Botstein D., White R. L., Scolnick M. and Davis R. W. (1980).** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Bradshaw J. E., Hackett C. A., Meyer R. C., Milbourne D., McNichol J. W., Philips M. S. and Waugh R. (1998).** Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globedera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 97:202-210.
- Branlard G., Autran J. C. and Monneveux P. (1989).** High molecular weight glutenin subunit in durum wheat (*T. durum*). *Theor. Appl. Gen.* 78:353-358.
- Brewbaker J. L., Willers K. B. and Macklin W. (1990).** Response of intracellular carbohydrates to a NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1 and *R. meliloti* SU-47. *Gen. Microbiol.* 139:3157-3163.
- Brito de Carvalho J. H. (1988a).** Criteria for evaluation of carob varieties. Pp. 558-566 in *Proceedings of the II International Carob Symposium* (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain.
- Brosius J., Dull T.J., Sleeter D.D. and Noller H. F. (1981).** Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148:107-127.
- Brown S. C., Devaux P., Marie D., Bergounoux C. and Petit P. X. (1991).** Cytometrie en flux: Application à l'analyse de la ploïdie chez les végétaux. *Biofutur n°105, Cahier n°47.*
- Bruford M. W. and Wayne R. K. (1993).** Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3:939-943.
- Bryan J.A., Berlyn G.P. and Gordon J.C. (1996).** Towards a new concept of the evolution of symbiotic nitrogen fixation in the Leguminosae. *Plant Soil*, 186, 151–159.
- Bureš P., Pavliček T., Horová L. and Nevo E. (2004).** Microgeographic genome size differentiation of the carob tree, *Ceratonia siliqua*, at 'Evolution Canyon'. *Israel. An. Bot.* 93: 529-535.
- Cabrita R., Graça J. M., Schwab L. and Martins-Loução. (1988).** Evaluation of parameters affecting the rootings of hardwood cutting in *Ceratonia siliqua* L. pp. 237-244 in *Proceedings of the II International Carob Symposium* (P. Fito and Mulet, eds.). Valencia, Spain.
- Caetano-Anolles G., Gresshoff B. J. and Bassam P. M. (1991).** DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnol.* 9: 553- 559.
- Caja G., Albanell E. and Casanova R. (1988).** Caracterización morfológica de fructose de algarrobo cultivados en España. Pp. 119-229 in *Proceedings of the II International Carob Symposium* (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain.
- Calixto F. S. and Cañellas J. (1982).** Components of nutritional interest in carob pods (*Ceratonia siliqua*). *J. Sci. Food Agric.* 33: 1319- 1323.
- Callaham D., Del Tredici P. and Torrey J. G. (1978).** Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science.* 199: 899- 902.
- Cao W., Scoles G., Hucl P. and Chibbar R. N. (1999).** The use of RAPD analysis to classify *Triticum* accessions. *Theor. Appl. Genet.* 98:602-607.

- Cardle L., Ramsay L., Milbourne D., Macaulay M., Marshall D. and Waugh R. (2000).** Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics*. 156:847-854.
- Carr J. D. (1976).** The South African Acacias (Conservation Press: Johannesburg). Academy of Sciences: Washington, D. C.).
- Castragna R., Gnocchi S., Perenzi M. and Heun H. (1997).** Genetic variability of the wild diploid wheat *Triticum urartu* revealed by RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet*, 94:424-430.
- Cavalcante V. A. and Döbereiner J. (1988).** A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Pl. Soil* 108: 23- 31.
- Cavanagh A. K. (1980a).** A review of some aspects of the germination of acacias. *Proc. R. Soc., Vict.* 91:161-180.
- Chabot R., Antoun H. and Cescas M. C. (1996a).** Growth promotion of maize and Lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant Soil*. 184: 311- 321.
- Chabot R., Antoun H., Kloepper J. W. and Beauchamp C. J. (1996b).** Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2767-2772.
- Chaintreuil C., Giraud E., Prin Y., Lorquin J., Bâ A., Gillis M., de Lajudie P. and Dreyfus B. (2000).** Photosynthetic *Bradyrhizobium* are natural endophytes of the African wild rice, *Oriza breviligulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5437- 5447.
- Chalfie M., Tu Y., euskirchen G., Ward W. and Prasher D. G. (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263: 802- 805.
- Charalamabous J. and Papaconstantinou J. (1966).** Current result on the chemical composition of the carob bean. In the composition uses of carob bean (J. Charalambous, ed.). Cyprus Agricultural Research Institute Ministry of Agriculture and Natural Resources Nicosia, Cyprus.
- Chen W. X., Yan G. H. and Li J. L. (1988).** Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 392-397.
- Chen W. X., Ly G. S., Qi Y. L., Wang H. L. and Li J. L. (1991).** *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodule of *Astragalus sinicus*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 275- 280.
- Chen C., Bauske E. M., Musson G., Rodríguez-Cabaña R. and Kloepper J. (1995).** Biological control of *Fusarium* on cotton by use of endophytic bacteria. *Boil. Control*. 5: 83- 91.
- Chen W. X., Tan Z. Y., Goe J. L., Li Y and Wang E. T. (1997).** *Rhizobium hainanens* sp. nov. isolated from tropical legumes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 870-873.
- Chen W. M., Laevens S., Lee T. M., Coenye T., De Vos P. Mergeay M. and Vandamme P. (2001).** *Rastonia taiwanensis* sp. nov. isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1729- 1735.
- Chen W. M., James E. K. Prescott A. R., Kierans M. and Sprent J. I. (2003).** Nodulation of *Mimosa* spp. by the beta-proteobacterium *Rastonia taiwanensis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 1051- 1061.
- Chen L. and Yamguchi S. (2005).** RAPD markers for discriminating tea germplasm at the specific level in China. *Plant Breeding*, 124:404-409.
- Chi F., Schi S. H., Cheng H. P., Jing Y. X., Yanni. Y. G. and Dazzo F. B. (2005).** Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7271- 7278.
- Christiansen-Weniger C. (1996).** Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* through auxin-induced root tumours of rice (*Oryza sativa* L.). *Biol. Fert. Soil.* 21: 293- 302.
- Christodoulakis N. S., Menti J. and Galatis B. (2002).** Structure and development of stomata on the primary root of *Ceratonia siliqua* L. *Annals of Botany*, 89:23-29.
- Coit J. E. (1949).** Carob culture in the semi-arid southwest. Ed. W. Rittenhouse, San Diego, California.
- Coit J. E. (1951).** Carob or St. John's Bread. *Eco. Bot.* 5:82-85.
- Coit J. E. (1962).** Carob culture in the semi-arid southwest. Vista, CA: J. Eliot Coit. 6p.
- Cole M. A. and Elkan G. H. (1979).** Multiple antibiotic resistance in *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 867- 870.

- Compant S., Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clément C. and Barka E. A. (2005).** Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1685- 1693.
- Cooper J. E. (1982).** Acid production, acid tolerance and growth rate of *Lotus* Rhizobia in laboratory media. *Soil Biol. Biochem.* 14: 127- 131.
- Cooper R., Lavie D., Gutterman Y. and Evenari M. (1994).** The distribution of rare phenolic type compounds in wild and cultivated wheats. *J. Arid Environ.* 27:331-336.
- Corniquel B. and Mercier L. (1994).** Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar identification by RFLP and RAPD. *Plant Sci.* 101:163-172.
- Coventry D. R. and Evans J. (1989).** Symbiotic nitrogen fixation and soil activity. In *Soil Acidity and Plant Growth*, ed. A. D. Robson, pp. 103- 107. *Aca. Press, Sydney*.
- Craig G. F., Atkins K. A. and Bell D. T. (1991).** Effect of salinity on growth of four strains of *Rhizobium* and their infectivity and effectiveness on two species of *Acacia*. *Plant Soil.* 133: 253- 262.
- Craig W. J. and Nguyen T. T. (1984).** Caffeine and theobromine level in cacao and carob products. *J. Food Sci.* 49:302-305.
- Crescimanno F. G., Dr Michele A., Di Lorenzo R., Occorso G. and Raimoudo A. (1988).** Aspetti morfologici e carpologici di cultivar di carrubo (*Ceratonia siliqua* L.). pp. 169-181 in *Proceedings of the II International Carob Symposium* (P. Fito and A. Mulet. Eds.). Valencia, Spain.
- Crossa-Raynaud P. (1960).** Caroubiers. *Annales Inst. Nat. Recherche Agric. Tunisie.* 33:79-83.
- Cruz C., Lips S. H. and Martins-Loução M. A. (1997).** Changes in the morphology of roots and leaves of carob seedling induced by nitrogen source and atmospheric carbon dioxide. *Annals of Botany*, 80:817-823.
- Cruz L. M., De Souza. E. M., Weber O. B., Baldani J. I., Döbereiner J. and Pedroso F. D. (2001).** 16S Ribosomal DANN characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2375-2379.
- Culley T. M. and Wolfe A. D. (2000).** Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (*Violaceae*), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*, 86:545-556.
- Curl L. M. and Truelove B. (1986).** The rhizosphere aspect, Springer, Berlin, pp. 288.
- D'Souza-Ault M. R., Smith L. T. and Smith G. M. (1993).** Roles of N-acetyl-glutaminy-glutamine and glycine-betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2137- 2147.
- Dangeard P. A. (1926).** Recherche sur les tubercules radicaux des légumineuses. *Le Botaniste*, Série 16 Paris, 270p.
- Datta M., Banik S. and Gupta R. K. (1982).** Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. *Plant Soil.* 69: 365- 373.
- Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Paris: Collection Mieux Comprendre, Inra Edition; 383P.
- Davis P. H. and Heywood V. H. (1973).** *Principal of Angiosperm plant taxonomy*, Robert E. Krieger publishing company, Huntington, New York.
- Day J. M., Neves M. C. P. and Döbereiner J. (1975).** Nitrogénase activité on the roots of tropical forage grasses. *Soil Biol. Biochem.* 7: 107- 112.
- Day J. M. and Döbereiner J. (1976).** Physiological aspect of N<sub>2</sub> fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* root. *Soil Biol. Biochem.* 8:45-50.
- De Bruijn J. F. (1992).** Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2180- 2187.
- De Candolle A. (1983).** *L'origine des plantes cultivées*. Balière, Paris, France.
- de Lajudie P., Willems A., Nike G., Moreira F., Molouba F., Hoste B., Torch U., Neyra M., Collins M. D., Lindström K., Dreyfus B. and Gillis M. (1998).** Characterisation of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 369- 382.
- de Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettink D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M. D., Dreyfus B. L., Kerster K. and Gillis M. (1994).** Polyphasic taxonomy of rhizobia, emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov. *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 715- 733.

- De Ley J. (1991).** The Proteobacteria: ribosomal RNA citron similarities and bacterial taxonomy. In *The Prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> edn, pp, 2109-2140. Edited by A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and Schleifer. New York: Springer.
- De Vienne D. (1990).** L'analyse du déterminisme génétique des caractères quantitatifs chez les végétaux médecines/sciences: 10(6), XI-V.
- De Vienne D., Causse M., Maurice A. and Santoni A. (1995).** Les principales ressources de marqueurs moléculaires. Dans: les marqueurs moléculaires et leurs applications. Biotechnologies végétales. UNISTA Univ. Audiovisuelle Francophone. CNED/AUPELF. UREF:11-18.
- Dedryver F., Jubier M. F., Thouvenin J. and Goyeau H. (1996).** Molecular marker linked to the leaf rust resistance gene Lr24 in different wheat cultivars. *Genome*, 39:830-835.
- Dellaporta S. L., Wood. J. and Hicks J. B. (1983).** A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 4:19-21.
- Devos K. M. and Gale M. D. (1992).** The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84:567-572.
- Dewan G. I. and SubbaRao N. R. (1979).** Seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Azobacter chroococcum* and the root biomass of rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Soil.* 53: 295- 302.
- Di Lorenzo R. (1991).** Carrubo Frutticoltura speciale. Ed. REDA, Rome.
- Diamantoglou and Mitrakos K. (1981).** Leaf longevity in Mediterranean evergreen sclerophylls. In *Components of Productivity of Mediterranean Climate Region. Basic and Applied Aspects* (N.S.Margaris and H.A. Mooney, eds), pp: 17-19. Junk Publishers, The Hague ISBN. 90: 6193-9445.
- Divaret I. and Thomas G. (1998).** Use of RAPD markers to analyse the genetic variability of a collection of *Brassica oleracea* L. In: Thomas G., Monteiro A. A. (eds), *Proceeding of the International Symposium on Brassica. Acta Hort.* 459:255-262.
- Döbereiner J. and Castro A. F. (1955).** Ocorrência e capacidade de fixação de nitrogênio de bactérias do gênero *Beijerinckia* nas séries de solos da area territorial do Centro nacional de eusino e pesquisas agrônômicas. *Bol. Inst. Ecol. Agric.* 16: 1- 18.
- Döbereiner J. and Ruschel A. P. (1958).** Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Rev. Biol.* 1: 261- 272.
- Döbereiner J. (1961).** Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. *Pl. Soil.* 15: 211- 216.
- Döbereiner J., Day J. M. and Dart P. J. (1972a).** Nitrogen activity in the rhizosphere of sugarcane and some other tropical grasses. *Pl. Soil.* 37: 191- 196.
- Döbereiner J., Day J. M. and Dart P. J. (1973).** fixação de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum notatum* e de cana-de-açúcar. *Presq Agropec Brass Ser Agron.* 8: 153- 157.
- Döbereiner J., Marriel I. E. and Nery M. (1976).** Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464- 1473.
- Döbereiner J. (1992a).** Recent changes in concept of plant bacteria interaction: Endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. *Ci. Cult.* 44: 310- 313.
- Döbereiner J. (1992b).** History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis.* 13: 1- 13.
- Dobert R. C., Breil B. T. and Triplett E. W. (1994).** DAN sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationships to those of other nodulating bacteria. *Mol. Plant-Microb Interaction*, 7: 564- 572.
- Dommergues Y., Balandreau J. P., Rinaudo G. and Weinhard P. (1973).** Non symbiotic nitrogen fixation in the rhizosphere of rice, maize and different tropical grasses. *Soil Biol. Biochem.* 5: 83- 89.
- Dong Z., Haydrich M., Bernard K. and McCully M. E. (1995).** Further evidence that N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems in *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1846- 1846.
- Doyle J. J. and Doyle J. L. (1987).** A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bul.* 19:11-15.
- Dooley J. J., Harrison S. P., Mytton L. R., Skot L., Dye M. Cresswell A. and Reeching J. R. (1993).** Phylogenetic grouping and identificatio of *Rhizobium* isolates on basis of random amplified polymorphic DNA profiles. *Can. J. Microbiol.* 39: 665- 673.

- Dreyfus B., Garcia J. L. and Gillis M. (1988).** Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. Nov., sp. Nov., a stem nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 89- 98.
- Dubcovsky J., Luo M. C., Zhong G. Y., Bransteitter R., Desai A., Kilian A., Kleinhofs A. and Dvorac J. (1996).** Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics*, 143:983-999.
- Dweikat I., Ohm H., Patterson F. and Cambron S. (1997).** Identification of RAPD marker for 11 Hessian fly resistance genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 94:419-423.
- Dwivedi S. L., Gurtu S., Chandra S., Yuejin W. and Nigam S. N. (2001).** Assessment of genetic diversity among selected groundnut germplasm. I: RAPD analysis. *Plant Breeding*, 120:345-349.
- Echt C. S., Erdaht A. and McCoy T. J. (1991).** Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated *alfalfa*. *Genome*. 35:84-87.
- Edi-Premono M., Moawad A. M. and Vlek P. L. G. 1996.** Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian J. Crop Sci.* 11:13-23.
- Egener T., Hurek T. and reinhold-Hurek B. (1998).** Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 11: 71- 75.
- Egener T., Hurek J. and Reinhold-Hurek B. (1999).** Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp strain BH72 in rice root. *Mol. Plant-Microbe interac.* 12: 813- 819.
- El Hilali I., Brhada F., Thami Alami I., Filali Maltouf A. (2007).** Evidence of the presence of genetically different rhizobial strains in a single cluster of a lupinoid nodule, the case of *Lupinus luteus*. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 5:352-359.
- El Sheikh E. A. E. and Wood M. (1989).** Response of chickpea and soybean Rhizobia to salt: osmotic and specific ion effects of salts. *Soil. Biol. Biochem.* 21: 889- 985.
- El Sheikh E. A. E. and Wood M. (1990).** Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean Rhizobia. *Soil. Biol. Biochem.* 22: 343- 347.
- Ellsworth D. L., Rittenhouse K. D. and Honeycutt R. L. (1993).** Artificial variation in randomly amplified polymorphic DNA banding pattern. *Biotechniques.* 14:214-217.
- El-Shatnawi M. K. and Ereifej K. (2001).** Chemical composition and livestock ingestion of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seeds. *J. Range Manage.* 54:669-673.
- Elustondo J., Anger D. A., Laverdière M. R. and N'Dayegamiye A. (1990).** Etude comparative de l'agrégation et de la matière organique associée aux fractions granulométriques et sept sols sous culture de maïs en prairie. *Can. J. Soil Sci.* 70: 395- 402.
- Emberger L. (1938).** Les arbres du Maroc et comment les connaître. La rose, Edit. Paris, 317 p.
- Emberger L. et Maire R.. (1941).** Catalogue des plantes du Maroc (Spermaphytes et Pteridophytes). Imprimerie Minerva. Alger.
- Emmert E. A. B. and Handelsman J. 1999.** Biocontrol of plant disease: a (Gram<sup>+</sup>) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 171: 1- 9.
- Evreinoff V. A. (1947).** Agriculture tropicale; Le caroubier ou *Ceratonia siliqua* L., *Rev. Bot. Appl.* 389-401.
- Fallik E., Sarig S. and Okon Y. (1994).** Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: *Azospirillum-Plant Associations* (ed. Okon, Y.), *CRC Press. Boca Raton.* 77- 84.
- Fallik E., Sarig S. and Okon Y. (1996).** Inoculation of *Azospirillum brasilense*: biomass production survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem.* 28: 123- 126.
- FAO (1996).** Report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome, 75pp. Hammer K. A. Diederichsen and M. Spahillari. Basic studies toward strategies for conservation of plant genetic resources.
- FAO/IAEA Divison of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, (2002).** Mutant germplasm characterization using molecular markers. Training course n°19. International Atomic Energy Agency. Vienna.
- Felix D. D. (2003).** Defining new roles for plant and rhizobia nodules in sole and mixed plant culture involving symbiotic legumes. *New Phytologist.* 158: 39- 49.
- Ferguson I. K. (1980).** The pollen morphology of *Ceratonia* (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Kew bull.* 35(2):273-277., pls 6-7.



- Flachowsky H., Schumann E., Webber W. E. and Peil A. (2001).** Application of AFLP for the detection of sex-specific markers in hemp. *Plant Breeding*. 120:305-309.
- Folch I Guillen R. 1981:** La vegetació dels Països Catalans. Ed. Ketres, Barcelona.
- Formmel M. I., Nowak J. and Lazarovits G. (1991b).** Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grow potato (*Solanum tuberosum* spp. *Tuberosum*) as affected by a non fluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol*. 96: 928- 936.
- Förster J. and Knaak C. (1995).** Estimation of the genetic distance of 21 winter rapeseed varieties by RAPD analysis in comparison to RFLP results. Proceedings 9<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Cambridge, 4:1184-1186.
- Fournier P. (1977).** Les quatre flores de la France (générale, alpine, méditerranéenne, littorale) Lechavalier. Paris.
- Fox G. E., Stackebrandt E., Hespell R. B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T. A., Wolfe R. S., Balch W. E., Tanner R. S., Magrum L. J., Zablen L. B., Blakemore R., Gupta R., Bonen L., Lewis B. J., Stahl D. A., Luehrsen K. R., Chen K. N. and Woese C. R. (1980).** The phylogeny of prokaryotes. *Science*. 209: 457-463.
- Frank B. (1889).** Über die pilzsymbiose der leguminosen, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 7: 332-346.
- Fred E. B., Balwin I. L. and McCoy E. (1932).** Root nodule bacteria taxonomy and ADN relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan Province, China. *International J. of Syst. Bacteriol.* 44. 151-158.
- Friesen N., Pollner S. and Bacmann O. (1999).** RAPDs and non coding chloroplast DANN reveal a single origin of the cultivated *Allium fistulosum* from *A. altaicum* (*Alliaceae*). *Am. J. Bot.* 86(4):554.
- Frommel M. I., Nowak J. and Lazarovits G. (1991).** Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol*. 96: 928- 936.
- Frommel M. I., Nowak I. and Lazarovits G. (1991b).** Plant growth stimulation and biocontrol of *Fusarium* wild by co-inoculation of tomato seeds with *Serratia pyhmothica* and *Pseudomonas* sp. *Fitopatologia*. 26: 66- 73.
- Frutos D. (1988).** Efecto de los ácido sulfúrico y giberelico (GA<sub>3</sub>) en la germinación del galgarrobo (*Ceratonía siliqu* L.). pp. 265-280 in *Proceeding of the II International Carob Symposium* (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain.
- Fuentes- Ramírez I. H., Salgado J. T., Ocampo A. I. R. and Caballero-Mellado J. (1993).** *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil*. 15: 145- 150.
- Gage D. J., Bobo T. and Long S. R. (1996).** Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Bacteriol.* 178: 7159- 7166.
- Gao J. L., Turner S. L., Kan F. L., Wang E. T., Tan Z. Y., Qiu Y. H., Gu J., Terefework Z., Young J. P. W., Lindström K. and Chen W. X. (2004).** *Mezorhizobium septentrionale* sp. nov., and *Mezorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the nothem of China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2003- 2012.
- García-Ochao F. and Casas J. A. (1992).** Viscosity of locust bean (*Ceratonía siliqua*) gum solutions. *J. Sci. Food Agri.* 59: 97- 100.
- Gaur, 1990.** Phosphate solubilisation microorganisms as biofertilizers. *Omega Scientific Publisher, New Delhi*. pp. 176.
- Gaur R., Shani N., Kawaljeet, Johri B. N., Rossi P. and Aragno M. (2004).** Diacety phloroglucanol-producing *Pseudomonas* do not influence AM fungi in wheat rhizosphere. *Curr. Sci.* 86: 543- 557.
- Gentzbittel L. (1990).** Construction d'une polygénie moléculaire du genre *Helianthus*. Application à l'analyse des stérités mâles cytoplasmiques du tournesol. Thèse Univ. Claude Bernard, Lyon I:144p.
- Geraci A., Divaret I., Raimondo F. M. and Chèvre A. M. (2001).** Genetic relationships between Sicilian population of *Brassica* analysed with RAPD markers. *Plant Breeding*, 120:193-196.
- Geratas T., De Keukeleire P., Deblaere R., Van Montagu M. and Zethof J. (1995).** Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) mapping in *Petunia*: a fast and reliable method for obtained a genetic map. *Acta. Hort.* 420:58-61.
- Germida J. J., Siciliano S. D., de Freitas J. R. and Seid A. M. (1998).** Diversity of root-associated bacteria associated with held-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) *FEMS Microbiol. Ecol.* 26: 43- 50.

- Gharnit N. (1997).** Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.), Essais de propagation *in vitro* et intérêt socio-économique au cercle de MOKRISSET (NW. Maroc). Dans le mémoire du D.E.S.A., n° 576.5 GHA. Univ. Abdel Malek E. Fac. Sci. Tétouan.
- Gharnit N., Et Mtili N., Ennabili A. T. and Ennabili A. (2001).** Social characterization and exploitation of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) from Mokrisset and Bab Taza (NW of Morocco). *Sci. Lett.* 3 n°2.
- Gharnit N., El Mtili N., Ennabili A. and Sayah F. (2004).** Floral characterization of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) from the province of Chefchaouen (NW of Morocco). *Moroccan J. Biol.* 1:41-51.
- Gilbert B. and Frenzel P. (1998).** Rice roots and CH<sub>4</sub> oxidation: The activity of bacteria, their distribution and the microenvironment. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1903- 1916.
- Gill K. S., Hassawi D., Raupp W. J., Fritz A. K., Gill B. S. et al. (1992).** An updated genetic linkage map of *Triticum tauschii*, the D-genome progenitor of wheat, pp. 27-29 in Progress in Genome Mapping of Wheat and related Species, edited by B. S. Gill, W. J. Raupp and H. Corke. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Triticeae Mapping Initiative, Manhattan, Kansas, Published by Genetic Conservation Program of the University of California.
- Giller K.E., Witter E. and McGraith S.P. (1998).** Toxicity of heavy metals to micro-organisms and microbial processes in agricultural soils. *Soil Biology Biochem.*, 30, 1389-1414.
- Gillis M., Tran van T., Bardin R., Goor M., Herbar P., Willems A., Seger P., Kersters K., Heulin T. and Fernandez M. P. (1995).** Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and preposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov., for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 45: 274- 289.
- Gillis M., Kerster K., Hoste B., Janssens D., Kroppenstedt R. M., Stephan M. P., Teixeira K. R. S. and Döbereiner J. (1989).** *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. A nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 361- 364.
- Godwin I. D., Aitken E. A. B. and Smith L. W. (1997).** Application of intersimple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis.* 18:1524-1528.
- Gogorcena Y. and Parfitt D. E. (1994).** Evaluation of RAPD for detection of polymorphism in aprico. *Sci. Hort.* 59:163-167.
- Goldblatt P. (1981).** Cytology and phylogeny of the leguminosea. Pp. 427-464 in Advances in legume systematic. Vol. 2 (R. M. Polhill and P. H. Raven, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- Goldstein A. H. and Roger R. D. (1999).** Biomediated contuous release phosphate fertilizer. *Lockheed Idaho Technologies Co., USA*, pp 19.
- Goor A. Y. and Barney C. W. (1968).** Forest tree planting in arid zones. New York: Ronald Press. 409p.
- Gopaldaswamy G., Kannaiyan S., O'Callaghan K. J., Davey M. R. and Cocking E. C. (2000).** The xylem of rice (*Oryza sativa*) is colonized by *Azorhizobium caulinodans*. *Proceeding of the Royal Society of London, B.* 267: 103- 107.
- Gordon R. E., Haynes W. C. and Pang C. H. N. (1973).** The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook n°427. Washington, DC: US Department of Agriculture.
- Gorg A., Postel W., Westermier R., Gianazzu E. and Righetti P. G. (1980).** Gel gradient electrophoresis. Isoelectric focusing and two dimentional techniques in horizontal, ultrapolyacrylamide layers. *I. Biochem. Biophys.* 3:273-284.
- Gotteib L. D. (1977).** Electrophoretic evidence and plant systematic. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 64:161-180.
- Gough C., Webster G., Vasse J., Galera C. Batchelor C., O'Callaghan K., Davey M. R., Kothari S., Dénarié J. and Cocking E. (1996).** Specific flavonoids stimulate intercellular colonization of non-legumes by *Azorhizobium caulinodans*. In Biology Plant Microbe interaction (ed. G. Stacey, B. Mullin and P. M. gresshoff) pp. 409- 415. Minnesota: International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions.
- Gough C., Galera C., Vasse J., Wesbter G., Cocking E. C. and Dénarié J. (1997a).** Specific flavonoids promote intercellular root colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 560- 570.
- Graham P. H. (1963).** Vitamin requirement of root nodule bacteria. *J. Can. Microbiol.* 30: 245- 248.
- Graham P. H. (1964a).** The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.*35: 511- 517.
- Graham P. H. and Parker C. A. (1964).** Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant Soil.* 20:383-396.

- Grime J. P. (1983).** Prediction of weed and crop response to climate based on measurement of DNA content. *Aspect of Applied Biol.* 4:87-98.
- Grundmann H. J., Towner K. J., Dijkshoorn L., Gerner-Smidt P., Maher M., Seifert H. and Vanechoutte M. (1997).** Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 35:3071-3077.
- Gruning Ch. R., Sieber T. N. and Holdenrieder O. (2001).** Characterization of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. *Mycol. Res.* 105:24-32.
- Guinochet M. and Vilmorin R. (1984).** Flore de France. Edit. CNRS, Paris.
- Gyaneshwar P., James E. K., Mathan N., Reddy P. M., Reinhold-Hurek B. and Laqha J. K. (2001).** Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia macescens*. *J. Bacteriol.* 183:2634-2645.
- Hadrys H., Balick M. and Schierwater B. (1992).** Application of random amplified polymorphic DANN (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1:55-63.
- Hallaksela A. M., Vaisanen O. and Salkinoja-Salonen M. (1991).** Identification of *Bacillus* species isolated from *Picea abies* by physiological tests, phage typing and fatty acid analysis. *Scand. J. Forest. Res.* 6: 365- 377.
- Hallmann J., Quandt-Hallman A., Mahafee W. F. and Kloepper J. W. (1997).** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J. Microbiol.* 43: 895- 914.
- Hamed T. E., Ezzat A. and Al-Okbi S. Y. (2003).** Therapeutic diets for diarrhea: biological evaluation in rats. *Pak. J. Biological Sci.* 6:1501-1508.
- Harrison S. P., Mytton L. R., Skot L. Dye M. and Cresswell A. (1992).** Characterization of *rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. *Can. J. Microbiol.* 38: 1009- 1015.
- Hartmann A. and Amarger N. (1991).** Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting, and insertion sequence typing. *Can. J. Microbiol.* 37: 600- 608.
- Hartmann H.T. and Kester D. E. (1983).** Plant propagation. Principles and Practices. 4<sup>th</sup> edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J.
- Hartmann A. and Zimmer W. (1994).** Physiology of *Azospirillum*. In: Okon Y. (Eds), *Azospirillum/plant associations*. Boca Raton: CRC, p. 15- 39.
- Haselberg C. von. (1996).** Factors influencing flowers and fruit development in carob (*Ceratonia siliqua* L.). In III International Carob Symposium. Cabanas-Tavira, Portugal. (in press).
- Hauk K., Lindström K. and Young P. W. (1998).** Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* gene in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 419- 426.
- Hedley M.J., Hussin A. and Bolan N.S. (1990).** New approaches to phosphorus fertilisation. Phosphorus requirements for sustainable agricultura in Asia and Oceania. Proceedings of a symposium, 6-10 March 1989.: pp. 125-142.
- Herrera-Cervera J. A., Caballero-Mellado J., Lageurre G., Hans-Volker T., requena N., Amarger N., martinez-Romero E., Olivares J. and Sanjuan J. (1999).** At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish Soil. *FEMS Microbiol. Ecolgy.* 30: 87- 97.
- Heun M., Schäfer-Pregl R., Klawan D., Castagna R., Accerbi M., Borghi B. and Salamini F. (1997).** Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science.* 278:1312-1314.
- Hillcoat D., Lewis G. and Verdcourt B. (1980)** A new species of *Ceratonia* (Leguminocea-Caesalpinoideae) from Arabia and the Somali Republic. *Kew bull.* 35(2):261-271.
- Hinsinger P. (1998).** How do plant root acquire mineral nutrient? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy.* 64: 225- 265.
- Hirana S. S. and Upper D. (2000).** Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 624- 653.
- Hirsch A. M., and LaRue T. A. (1998).** Is the legume nodule a modified root or stem or organ sui generis? *Crit. Rev. Plant Sci.* 16: 361- 392.
- Hirsch A. M., Lum M. R. and Downie J. A. (2001).** What makes the rhizobial-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* 127: 1484- 1492.

- Hoflich G., Wiehe W. and Buchholz C. H. (1995).** Rhizosphere colonization of different crops with growth promoting *Pseudomonas* and *Rhizobium* bacteria. *Microbiol. Res.* 150: 139- 147.
- Hokanson S. C., Szewc-McFadden A. K., Lamboy W. F. and McFerson J. R. (1998).** Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. Core subset collection. *Theor. Appl. Genet.* 97:671-683.
- Hong T. D., Linington S. and Ellis R. H. (1996).** Seed storage behaviour: a Compendium. Handbooks for Genebanks: No. 4. International Plant Genetic Institute, Rome.
- Hormaza J. I., Dollo L. and Polito V. S. (1994).** Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.* 89:9-13.
- Huang H. C., Kokko E. G., Yanke L. J. and Phillippe R. C. (1993).** Bacteria suppression of basal pod rot and end rot of dry peas caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Microbiol.* 39: 227- 233.
- Hunt G. H. and Page R. E. J. (1992).** Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel type of polymorphism in the honey bee. *Theor. Appl. Genet.* 85:15-20.
- Hurek T., Handley L. L., Reinhold-Hurek B. and Piché Y. (2002).** *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant-Microbe interac.* 15: 233- 242.
- Hurek T., Reinhold B. and Niemann E. G. (1987b).** Effect of oxygen on ammonium-grown continuous culture of *Azospirillum* spp. And diazotrophic rods closely associated with kallar grass. *Can. J. Microbiol.* 33: 919- 922.
- Igual J.M., Valverde A., Cerevantes E. and Válezquez E. (2001).** Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*, 21, 561–568.
- Illmer P. and Schnner F. (1992).** Solubilization of inorganic phosphate by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24: 389- 395.
- Imrie F. (1973).** The production of fungal protein from carob in Cyprus. *J. Sci. Food Agric.* 24:639.
- Indira B. N. and Bagyaraj D. J. (1997).** Associative diazotrophs of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. *Indian. J. Microbiol.* 37: 95- 98.
- Irwin H. S. and Barneby R. C. (1981).** Cassieae. Pp. 97-106 in *Advances in Legume Systematic*. Vol. 1 (R. M. Polhill and P. H. Raven, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- Jain A., Bhatia S., Banga S. S., Prakash S. and Lakshmikumarn M. (1994).** Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) an its relationships to reterosis. *Theor. Appl. Genet.* 88:116-122.
- James E. K., Olivares F. L., Baldani J. I. and Döbereiner J. (1997).** *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *J. Exp. Bot.* 48: 785- 797.
- James E. K., Reis V. M., Olivares F. L., Baldani J. I. and Döbereiner J. (1994).** Infection of sugarcane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J. exp. Bot.* 45: 757- 766.
- James K. and Olivares F. L. (1997).** Infection and colonisation of sugarcane and other Gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17: 77- 119.
- Jarne P. and Lagoda P. J. L. (1996).** Microsatellites, from molecules to population and back. *Trends Ecol. Evol.* 11:424-429.
- Jarvis B. D. W., Pankhurst C. E. and Patel J. J. (1982).** *Rhizobium loti* a new species of legume root nodule bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 378- 380.
- Jarvis B. D. W., van Berkam P., Chen W. X., Nour S. M., Fernandez M. P., Cleyet-Marel J. C. and Gillis M. (1997).** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. Nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 895- 898.
- Jayat C. and Ratinaud M. H. (1993).** Cell cycle analysis by flow cytometry: principales and applications. *Review Biol. Cell.* 78:15-25.
- Jefferson R. A., Kavanagh T. A. and Bevan M W. (1987).** GUS fusion:  $\beta$ -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBOJ.* 6: 3901- 3908.
- Jimenz-Salgado T., Fuentes-Ramirez L. E., Tapia-Hernandez A., Mascarua-Esperanza A. M., Martinez-Romero E. and Caballero-Mellado J. (1997).** *Coffea arabica* L. a new hoste for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing *Acetobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3676-3683.
- Johnson S., Bruun P. and Okkala P. (1988).** Application of LBC in food and pet food systems. Pp. 577-587 in *Proceedings of the II International Carob Symposium* (P. Fito anf A. Mulet, eds.). Valencia, Spain.

- Jones D. K. (1953).** Carob culture in Cyprus. FAO 53/2/1225. FOA. Rome.
- Jones W. T. and Mangan J. L. (1977).** Complexes of the condensed of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *J. Sci. Food. Agric.* 28:126-136.
- Jordan D. C. and Allen, (1974).** Dans la huitième édition du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.
- Jordan D. C. (1982).** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. Nov., a gene of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants. In *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 136- 139.
- Jordan D. C. (1984).** Genus I, *Rhizobium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. ed. Holt, J. G. & Kreig, N. R. pp. 235- 242. London; Williams & Wilkins Co.
- Jourand P. Giraud E., Béna G., Sy A., Willems A., Gillis M., Dreyfus B. and. de Lajudie P. (2004).** *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic facultatively methylotrophic legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2269- 2273.
- Junhua P., Korol A. B., Fahima T., Röder M. S., Robin Y. I., Li Y. C. and Nevo E. (2000).** Molecular genetic map in wild emmer wheat. *Triticum dicoccoides*: genome-wide coverage massive negative interference and putative quasi-linkage. *Genome Res.* 10,10:1509-1531.
- Kahl G. (2001).** The Dictionary of Gene Technology. Wiley- VCH, Weinheim.
- Kalaitzakis J., Mitrakos K. and Marakis S. (1988).** Carob tree varieties from Crete (Greece). Pp. 291-301 in *Proceedings of the III International Carob Symposium* (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain.
- Kardolus J. P., van Eck H. J. and van den Berg R. G. (1998).** The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (*Solanaceae*). *Plant Systematic and Evolution.* 210:87-103.
- Karp A. and Edwards K. (1997).** Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity. In: Ayad W., Hodgkin T., Jaradat A., Rao V. (eds.), *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*, 9-11 October 1995, IPGRI, Rome, Italy, pp 11-22.
- Karp A., Kresovish S., Bhat K. V., Ayand W. G. and Hodgkin T. (1997).** Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technology. IPGRI Technical Bulletin No. 2, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Karschon R. (1960).** Studies in nursery practices for carob (*Ceratonia siliqua* L.). *J. South African Forestry Association*, 4:78-80.
- Karschon R. (1975).** Seed germination of *Acacia radiana* Savi and *A. tortillas* Hayne as related to infestation by bruchids. Agricultural Research Organization, Leaflet n°. 52. Bet Dagan.
- Kazan K., Manners J. M. and Cameron D. F. (1993).** Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 85:882-888.
- Keim P., Schupp J. M., Travis S. E., Clayton K., Zhu T., Shi L., Ferreira A. and Webb D. M. (1997).** A high-density genetic map of soybean based upon AFLP markers. *Crop Sci.* 37:537-543.
- Khabaya B., Neyra M., Normand P., Zerhari K. and Filali-Maltouf A. (1998).** Genetic diversity and phylogeny of rhizobia nodulating *Acacia* spp. in Morocco assessed by analysis of the rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4912-4917.
- Khadari B., Lashermes P. and Kjellberg F. (1994).** Identification variétale et ressources génétiques chez le figuier (*Ficus carica* L.): utilisation des marqueurs RAPD. In: *Quel avenir pour l'amélioration des plantes?* Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 399-412.
- Khadari B., Breton C., Moutier N., Roger J. P., Besnard G., Bervillé A. and Dosba F. (2003).** The use of molecular marker of germplasm management in a French olive collection. *Theor. Appl. Genet.* 106:521-529.
- Kirchhof G., Eckert B., Stoffels M., Baldani J. I., Reis V. M. and Hartmann A. (2001).** *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fiber plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 157- 168.
- Kivçak B. and Mert T. (2002).** Antimicrobial and cytotoxic activities of *Ceratonia siliqua* L. extracts. *Turk J. Biol.* 26:197-200.
- Klassen G., Pedrosa F. O., Souza E. M; and Rigo L. U. (1999).** Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS Microbil. Lett.* 181: 165- 170.

- Klein-Lankhorst R. M., Vermunt A., Weid R., Liharska T. and Zabel P. (1991).** Isolation of molecular markers for tomato (*L. Rsculentun*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83:1549-1551.
- Kloeppert J. W., Zablutowicz R. M., Tipping E. M. and Lifshitz R. (1991).** Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: Keister D. L., Cregow P. B. (eds). *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 315- 326.
- Kleoppper J. W. and Beauchamp C. J. (1992).** A review of issues related to measuring colonization of plant root by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38:1219-1232.
- Kole S. C. and Hajra J. N. (1998).** Occurrence and acidity of tricalcium phosphate and rock phosphate solubilizing microorganisms in mechanical compost plant of calcutto and an alluvial soil of *West Bengal*. *Environ. Ecol.* 16: 344- 349.
- Kombrik E. and Somssich I.E. (1997).** Pathogenesis-related proteins and plant defence. In: Carroll, G., Tudzynski, P., eds. *The Mycota V Part A: Plant Relationships*. Belin: Springer-Verlag, 107-128.
- Konaté I. (2001).** Amélioration de la culture du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) via la multiplicatiojn in vitro et la fixation biologique de l'azote. Dans le mémoire du D.E.S.A., Univ. Ibn Tofail. Fac. Sci. Kénitra, Maroc.
- Krauss S. L. (1999).** Complete exclusion of non sires in an analysis of paternity in a natural plant population using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology.* 8:217-226.
- Kresovich A. S., Williams J. C. K., Mc Ferson J. R., Routman E. J. and Schaal B. A. (1992).** Characterization genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assays. *Theor. Appl. Genet.* 85:190-196.
- Kumar P. and Purkayastha B. K. (1972).** Note on germination of the seeds lac hosts. *Indian J. Agric. Sci.* 42, 430-1.
- Kuykendall L. D., Saxena B., Devine T. E. and Udell S. E. (1992).** genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov., *Can. J. Microbiol.* 38: 501- 505.
- Ladha J. K., Triol-Padre A., Punzalan G. C., Watanabe I. and De Datta S. K. (1988).** In nitrogen fixation: Hundred years after (eds Rothe, H., de Bruijn F. J. and Newton W. E.), Gustar Fisher, New york. 747- 752.
- Ladha J. K., Garcia M., Miyan S., padre A. T. and Reddy P. M. (1989).** Survival of *Azospirillum caulinodans* in the soil and rhizosphere of wetland rice under *Sesbania rostrata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 454- 460.
- Laguerre G., Allard M. R., Revoy F. and Amarger N. (1994).** Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 56- 63.
- Lageurre G., van Berkum P., Amarger N. and Prevost D. (1997).** Genetic diversity of rhizobial symbiont isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytopis* and *Onobrychis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4748- 4758.
- Lageurre G., Nour S. M., Macherel V., Sanjuan J., Drouin P. and Amarger N. (2001).** Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationships among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiol.* 147: 981- 993.
- Lashermes P., Cros J., Marmey P. and Charrier A. (1993).** Use of random amplified polymorphic DNA markers to analyse genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Crop Evol. Gent. Res.* 40:91-99.
- Law J. R., Donini P., Koebner R. M. D., Jones C. R. and Cooke R. J. (1998).** DNA profiling and plant variety registration III. The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms. *Euphytica.* 102:335-342.
- Lazarovits G. and Nowak J. (1997).** Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *Hort. Sci.* 32: 188- 192.
- Le Rudulier D. and Bernard T. (1986).** Salt tolerance in *Rhizobium*: a possible role for betaines. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 67- 72.
- Ledoigh C. and Coudret A. (1992).** Stress hydrique: étude des mécanismes moléculaires et modification de l'expression du génome. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 139. *Lettres Bot.* 2:175-190.
- Lee C. L., Paul J. L. and Hackett W. P. (1977).** Promoting of rooting in stem cutting of structure plant by pre-treatment with acid or base. *Hort Science.* 12 (1): 41-42.
- Lee S., Reth A., Miletzus D., Sevilla M. and Kennedy C. (2000).** Characterization of a major cluster of *nif*, *fix*, and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Bacteriol.* 182: 7088- 7091.

- Leford Buson M., Rodilphe F. and Charcosset A. (1990).** De nouvelles perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatifs. La sélection assistée par marqueur. Biofuture, Juillet/Août. 42-47.
- Leroy A. (1929).** Elevage rationnel des animaux domestiques. Hachette ed., 448p.
- Li B., Xie G., Soad A. and Coosemans J. (2005).** Suppression of *Meloidogyne javanica* by antagonistic and plant growth-promoting rhizobacteria. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 6: 496- 501.
- Li R. P. and MacRae I. C. (1991).** Specific association of diazotrophic *Acetobacter* with sugarcane. *Soil Biol. Biochem.* 23: 999- 1002.
- Li Z. and Nelson R. L. (2001).** Genetic diversity among soybean accession from three countries measured by RADPs. Published in *Crop Sci.* 41:1337-1347.
- Li Z. and Nelson R. L. (2002).** RAPD marker diversity among cultivated and wild soybean accession from Chinese provinces. Published in *Crop Sci.* 42:1737-1744.
- Lindsay W.L. (1979).** Chemical Equilibria in Soils. John Wiley and Sons, NY.
- Lindström K. (1989).** *Rhizobium galegae*, a new species of legum root nodule bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 365- 367.
- Lindström K. and Lehtomäki S. (1988).** Metabolic properties, maximum growth temperature and phase sensibility of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 50:277-287.
- Link W., Dixkens C., Singh M., Schwall M. and Melchinger A. E. (1995).** Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90:27-32.
- Linskens H. and Scholten W. (1980).** The flower of carob. *Potug. Acta. Bilo. (A)* XVI (1-4):95-102.
- Liu Z. and Furnier G. R. (1993).** Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theor. Appl. Genet.* 87:97-105.
- Lizardo R., Cañellas J., Mas F., Torrallardona D. et Brufau J. (2002).** L'utilisation de la farine de caroube dans les aliments de sevrage et son influence sur les performances et la santé des porcelets. Journées de la Recherche Porcine. 34:97-101.
- Lorquin J., Molouba F. and Drefus B. L. (1997).** Identification of the carotenoid canthaxanthin from photosynthetic *Bradyrhizobium* strains, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1151- 1154.
- Lortet G., Mear N., Lorquin J., Dreyfus B., de Lajudie P., Rosenberg C. and Boivin C. (1996).** Nod factors thin-layer chromatography profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of rhizobia strains: application to *Sinorhizobium saheli*, *S. teranga* and *Rhizobium* sp. strains isolated from *Acacia* and *Sesbania*, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 736- 747.
- Louca A. and Paps A. (1973).** The effect of different proportions of carob pod meal in the diet on the performance of calves and goats. *Anim. Prod.* 17:139-146.
- Lowendorf H. S., Baya A. M. and Alexander M. (1981).** Survival of *Rhizobium meliloti* for inoculation of alfalfa acid soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47:935-938.
- Lupski J. R. and Weinstock K. H. (1992).** Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174: 4525- 4529.
- Lupway N., Clayton G., Hanson K., Rice W. and Bierderbeck. (2004).** Endophytic bacteria in barley, wheat and canola roots. *Can. J. Plant Sci.* 84: 37- 45.
- Lynch J. M. (1990).** Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant ant soil. In: *The Rhizosphere* ed. J. M. Lynch, 1- 10. Wiley Interscience, New york.
- Lynch J. M. and Bragg E. (1985).** Microorganisms and soil aggregation stability. *Adv. Soil Sci.* 2: 133- 171.
- Lysák M. A., Rostková A., Dixon J. M., Rossi G. and Doležel J. (2000).** Limited genome size variation in *Sesleria albicans*. *An. Bot.* 86:399-403.
- M'Ribu H. K. and Hilu K. W. (1994).** Detection of interspecific and interspecific variation in *Panicum* millets through random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 88:412-416.
- Maâtallah J., Berraho E. B., Muñoz S., Sanjuán J. and Lluch C. (2002).** Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *J. Appl. Microbiol.*, 93: 531- 540.
- Maâtallah J., Berraho E. B., Sanjuan J. and Lluch C. (2002).** Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soil. *Agronomie.* 29: 321- 329.

- Maâtallah J. (2003).** Biodiversité et position phylogénétique des rhizobia nodulant le pois chiche au Maroc: évidence d'un transfert de gène de nodulation entre *Mesorhizobium* et *Sinorhizobium*. Thèse Doc. Univ. Mohammed V. Fac. Sci. Rabat. N° 2139.
- Mace E. S., Gebhardt C. G. and Lester R. N. (1999).** AFLP analysis of genetic relationships in the tribe *Datureae* (*Solanaceae*). *Theor. Appl. Genet.* 99:634-641.
- Machado I. M. P., Yates M. G., Machado H. B., Souza E. M. and Pedrosa F. O. (1996).** Cloning and sequencing of the nitrogenase structural gene *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 1599- 1602.
- MacLaughlin J. L., Chang C. L. and Smith D. L. (1991).** In: studies natural product chemistry. Attaur-Rahman (Ed.) Elsevier Science Pub. B. V. Amsterdam. 9:383-409.
- MacRoberts N., Finch R. P., Sinclair W., Meikle A., Marshall G., Squire G. and McNicol J. (1999).** Assessing the ecological significance of molecular diversity data in natural plant populations. *J. Exp. Bot.* 50,340:1635-1645.
- Magalhães L. M. S., Neyra C. A. and Döbereiner J. (1978).** Nitrate and Nitrite reductase negative mutants of  $N_2$ -fixing *Azospirillum* spp. *Arch. Microbiol.* 117: 242- 252.
- Magalhaes F. M., Baldani J. I., Souto S. M., Kuykendall J. R. and Döbereiner J. (1983).** A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *J. Ann. Acad. Braz. Sci.* 55: 417- 430.
- Makris D. P. and Kefalas P. (2004).** Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidant. *Food Technol. Biotechnol.* 42: 105- 108.
- MAPA. (1994).** Ministerio de Agriculture, Pesca Y Alimentación. Anuario de Estadística Agraria. Ed. Secretaría General Técnica, Madrid, Spain.
- Marakis S., Kalaitzakis J. and Mitrakos K. (1988).** Criteria for recognizing carob tree varieties. Pp. 558-566 in Proceedings of the II International Carob Symposium (P. Fito and Mulet, eds.) Valencia, Spain.
- Martens D. A. and Frankenberger W. R. T. (1993).** Soil saccharide extraction and detection. *Plant Soil*, 149: 145- 147.
- Martinez E., Palacios R. and Sanchez F. (1987).** Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harbouring *Rhizobium phaseoli* plasmides. *J. Bacteriol.* 169: 2828- 2834.
- Martinez-Romero E., Segovia L., Martins F., Franco A. A., Graham P. and Pardo M. A. (1991).** *Rhizobium tropici*, a new species nodulating *Phaseolis vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 417- 426.
- Martins-Loução M. A. (1985).** Estudos fisiológicos e microbiológicos da associação da alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L.) com bactérias de Rhizobiaceae. PhD Thesis, Univ. of Lisbon, Portugal.
- Martins-Loução M. A. and Rodríguez-Barrueco C. (1982).** Studies in nitrogenase activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) callus cultures associated with *Rhizobium*. Pp. 671-672 in Proceedings V International Congress Plant Tissue Culture, Tokyo.
- Martins-Loução M. A., Correia P. and Pereira F. (1996b).** The role of plant/soil micro-organisms interaction in carob development. In Proceedings of the III International Carob Symposium. Cabanas. Tavira. Portugal (in press).
- Matiru V. N. and Dakora F. D. (2004).** Potential use of rhizobial bacteria as promoter of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African J. Biotech.* 3: 1- 7.
- Matthes M. C., Daly A. and Edwards K. J. (1998).** Amplified length polymorphism (AFLP), In: Karp A., Isaac P. G., Ingram D. S. (eds). *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, London, pp. 183-190.
- McInroy. J. A. and Kleopffer J. W. (1995).** Survey of indigenous bacteria endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil.* 173: 337- 342.
- Meghvasni M. K., Kamal P; and Mahna S. K. (2005).** Identification of pH tolerant *Bradyrhizobium aponicum* strains and their symbiotic effectiveness in soybean [*Glycine max* (L.) Merr] in low nutrient soil. *African Journal of Biotechnology*, 4: 663-666.
- Meksem K., Ruben E., Hyten D., Triwitaykorn K. and Light foot D. A. (2001).** Conversion of AFLP bands into high-through put DNA markers. *Mol. Genet. Genomics*, 265:207-214.
- Merrick M. and Edwards R. (1995).** Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 604- 622.
- Merwin M. L. (1981).** The culture of carob (*Ceratonia siliqua*) for food. Fodder and fuel in semi-arid environments. International Tree Crops Institute USA Inc., California.



- Metakovsky E. V. and Baboev K. (1992).** Polymorphism of gliadin and unusual gliadin alleles in *Triticum boeoticum*. *Genome*, 35:1007-1012.
- Metro et Sauvage. (1955).** Flore des végétaux ligneux de la Maâmora. La nature au Maroc 1, Sco. Sci. Nat. Physi. Rabat (Maroc). 498p.
- Mhameed S., Sharon D., Kaufman D., Lahav E., Hillel J., Degani C. and Lavi U. (1997).** Genetic relationships within avocado (*Persea Americana* Mill) cultivars and between *Persea* species. *Theor. Appl. Genet.* 94:394-401.
- Miller J. C. and Tanksley S. D. (1990).** RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 80:437-448.
- Min B. R. and Hart S. P. (2003).** Tannins for suppression of intestinal parasites. *J. Anim. Sci.* 81:102-109.
- Mingeot D. and Jacquemin J. M. (1999).** Mapping of RFLP probes characterized for their polymorphism on wheat. *Theor. Appl. Genet.* 98,6/7:1132-1137.
- Misaghi I. J. and Donndelinger C. R. (1990).** Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology.* 9: 808- 811.
- Mishra M. M. (1985).** Solubilization of insoluble inorganic phosphate by soil microorganisms- A review. *Agric. Rev.* 6: 23.
- Missbah M. E. I., Aujjar N., Belabed A., Dessaux Y. and Filali-Maltouf A. (1996).** Characterization of rhizobia isolated from carob (*Ceratonia siliqua* L.). *J. App. Bacteriol.* 80:165-173.
- Mitrakos K. (1981).** Temperature germination responses in three Mediterranean evergreen sclerophylls. Pp. 277-279 in Components of Productivity of Mediterranean-climate Regions-Basic and Applied Aspects (N.S. Margaris and H. A. Mooney, eds.). Dr. W. Junk Publishers, The Hague/Boston/London.
- Mittal S. (2004).** Diversity and taxonomy of pseudomonads from wheat rhizosphere, *Ph. D. Thesis, G. B. Pant Univ. of Agriculture and technol., Pantnagar.*
- Mocali S., Bertelli E., Dicello F., Mengoni A., Viliani F., Caciotti A., Tegli S., Surico G. and Fani R. (2003).** Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Res*, 1: 1- 11.
- Mohammed S. H., Smouni A., Neyra M., Kharchef D. and A. Filali-Maltouf. (2000).** Phenotypic characterization of root nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Lybya. *Plant Soil.* 224: 171-183.
- Mongkolporn O., Kadkol G. P., Pang E. C. K. and Taylor W. J. (2003).** Identification of RAPD markers linked to recessive genes conferring siliqua shatter resistance in *Brassica rapa*. *Plant Breeding.* 122:479-484.
- Monneveux P. and Depigny-This D. (1995).** Intégration des approches physiologiques, génétiques et moléculaires pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse chez céréales. Dans: Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris. 149-163.
- Monté J. V., Casanova C. and Soler C. (1999).** Genetic variation Spanish population of the genus *Aegilops* revealed by RAPD, *Agronomie*, 19:419-427.
- Mouhsine B. S. (2000).** Caractérisation phylogénétique et moléculaire de souches de *Rhizobium* sp. nodulant le haricot isolées de sols marocains. Dans: mémoire DESA. Univ. Hassan 1<sup>er</sup> Fac. Sci. Techn. Settat. Maroc. SV/31/98-05/00.
- Moulin L., Munive A., Dreyfus B. and Boivin-Masson C. (2001).** Nodulation of legumes by members of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49: 155- 179.
- Munns D. N. (1986).** Acid soil tolerance in legumes and rhizobia. *Adv. Plant Nutr.* 2: 63- 91.
- Muthukumarasamy R., Revathi G. and Solayappan A. R. (1992).** *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp- viable alternatives for inorganic N fertilization in sugarcane cultivation. *SISTA.* 17: 18.
- Muthukumarasamy R., Revathi G. and Vadivelu M. (2000).** *Acetobacter diazotrophicus*: prospects and potentialities- An overview. In Recent Advances in Biofertilizer Technology (eds Yadav, A K., Motsara M. R. and Ray Chaudhury S.) Society for promotion and utilization resources and technology. *New delhi.* 126-153.
- N'doye I., De Billy F., Vasse J., Dreyfus B. and Truchet G. (1994).** Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *J. Bacteriol.* 176: 1060- 1068.

- Nagarju J., Kathirvel M., Kumar R. R., Siddiq E. A. and Hasnain S. E. (2002).** Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *PNAS*. 99:5836-5841.
- NAS. (1979).** Tropical legumes: resources for the future, pp. 109- 116. National Academy of Sciences, Washington DC. USA.
- Nautiyal C. S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 265- 270.
- Nautiyal C. S., Bhaduria S., Kumar P., Lal H., Mondal R. and Verma D. (2000).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 182: 291- 296.
- Navaro V. (1992).** Estudio y mejora del algarrob. In II Jornadas Sobre Experimentación en Fruticultura. Moncada (Valencia) (unpublished).
- Navarro E., Simonet P., Normand P. and Bardin R. (1992).** Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. Using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Arch. Microbiol.* 157:107-115.
- Neukom H. (1988).** Carob bean gum: properties and application. Pp. 551- 555 in Proceedings of the II International Carob Symposium (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain.
- Neves M. C. P., Day J. M., Carneira A. M. and Döbereiner J. (1976).** Actividade da rizosfera de gramíneas tropicais forrageiras. *Rev. Microbiol.* 7: 59- 65.
- Nick G., de Lajudie P., Eardly B. D., Suomalainen S., Paulin L., Zhang X., Gillis M. and Lindström K. (1999).** *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. Nov., isolated from leguminous tree in Sudan and Kenya, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 13596- 1368.
- Noblet J., Fortune H., Dubois S. and Henry Y. (1989).** Nouvelles méthodes d'estimation de teneur en énergie digestible, métabolisable et nette des aliments pour le porc. INRA ed., Paris. 106p.
- Noel T. C., Scherg C., Yost C. K., Pharis R. P. and Hynes M. F. (1996).** *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce, *Can. J. Microbiol.* 42: 279- 283.
- Normand P., Cournoyer B., Simonet P., and Nazaret S. (1992).** Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene*, 111: 119-124.
- Normand P. (1995).** Utilisation des séquences 16S pour le positionnement phylétique d'un organisme inconnu. *Océanis*. 21:31-56.
- Nour S. M., Fernandez M. P., Normand P. and Cleyet-Marel J. C. (1994b).** *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.), *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 511- 522.
- Nour S. M., Cleyet-Marel J. C., Normand P. and Fernandez M. P. (1995).** Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 640- 648.
- Nuti M. P. (1989).** Advanced in the utilisation of rhizobia in arid environments. *Arid Soil Res. Rehabilitation.* 3:243-258.
- O'Callaghan K. J., Davey M. R. and Cocking E. C. (1997).** Xylem colonization of the legume *Sesbania rostrata* by *Azorhizobium caulinodans*. *Pro. R. Soc. Lond. B. Sci.* 246: 1821- 1826.
- O'Farell P. H. (1975).** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
- Ochman H., Lawrence J. G. and Groisman E. A. (2000).** Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405: 299- 304.
- Oh T. J., Gorman M. and Cullis C. A. (2000).** RFLP and RAPD mapping in flax (*Linum usitalissimum*). *Theor. Appl. Genet.* 101:590-593.
- Okuno K., Ebana K., Noov B. and Yoshida H. (1998).** Genetic diversity of Central Asian and north Caucasian *Aegilops* species as revealed by RAPD markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 45:389-394.
- Orphanos P. I. and Papaconstantinou J. (1969).** The carob varieties of Cyprus. Tech. Bull. 5. Cyprus Agricultural Research Institute. Ministry of Agriculture and Natural Resource, Nicosia.
- Ortiz P. L., Arista M; and Talavera S. (1995).** Germination ecology of *Ceratonia siliqua* L. (*Caesalpinaceae*) a Mediterranean tree. *Flora*, 190:89-95.

- Ortiz P. L., Arista M. and Talavera S. (1996).** Produccion de nectar y frecuencia de polinizadores en *Ceratonia siliqua* L. (Caesalpinaceae). *Anales del Jardin Botanico de Madrid* 54:540-546.
- Ouchkif M. (1988a).** Etude sur le caroubier. Append number 8 of Project Ouest Srou. MARA (Morocco). GTZ (Germany), DPA of Kheneфра (unpublished).
- Ouchkif M. (1988b).** Effet de l'incorporation de proportions élevés de pulpe de caroube sur la digestibilité et l'utilisation de le ration par les Agneaux à l'engraissement. Mémoire de 3<sup>ème</sup> cycle. IAV Hassan II, Rabat (Maroc).
- Ouenzar B., Hartmann C., Rode A. and Benslimane A. (1998).** Date palm DANN mini-preparation without liquid nitrogen. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16:263-269.
- Park C., Chang L. S. and Shenk T. (1991).** A polymerase chain reaction mediated by simple primer. Cloning of genomic sequences adjacent to a serotonin receptor protein coding region. *Nucl. Acids Res.* 19:7155-7160.
- Passaglia L. M. P., Nunes C. P., Zaha A. and Schrank I. S. (1991).** The nifHDK operon in the free-living nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilens* sequentially comprises genes H, D, K, an 353bp ORF and gene Y. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24: 649- 675.
- Passos de Carvalho J. (1988).** Carob pollination aspects. Pp. 281-291 in Proceedings of the II International Carob Symposium (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain.
- Pathak P. S., Gupta S. K. and Roy R. D. (1980).** Studies on seed polymorphism, germination and seedling growth of *Acacia tortillas* Hayne. *Indian J. For.* 3:64-70.
- Patriquin D. J., Döbereiner J. and Jain D. K. (1983).** Site and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29: 900- 915.
- Peakall R., Gilmore S., Keys W., Morgante M. and Rafalski A. (1998).** Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implication for the transferability of SSRs in plants. *Mol. Biol. Evol.* 15:1275-1287.
- Pedrosa F. O., Benelli E. M., Yates M. G., Wasseem R., Monteiro R. A., Klassen G., Steffens M. B. R., Souza E. M., Chubatsu L. S. and Rigo L. U. (2001).** Recent developments in the structural organisation and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *J. Biotechnol.* 91: 189- 195.
- Peix A., Rivas-Boyer A.A., Mateos P.F., Rodríguez-Barrueco C., Martínez-Molina E. and Velázquez E. (2001).** Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions, *Soil Biol. Biochem.*, 2001, 33: 103–110.
- Pelmont J. (1993).** Bactéries et environnement. Presse Universitaire de Grenoble, 899 p.
- Peltier D., Berville A. et Dulieu H. (1994).** Utilisation des RAPD en cartographie génétique et pour l'analyse phénétique. Application à l'étude du genre *Petunia*. In: Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotex. Paris, pp. 373-385.
- Pereira J. A. R. and Baldani J. I. (1995).** Selection of *Azospirillum* and *Herbaspirillum seropedicae* strains to inoculate rice and maize plants. In: International Symposium on sustainable agriculture for the tropics: the role biological nitrogen fixation, Anggra dos Reis: *R. J. Brazil* p. 200- 221.
- Pernès J. (1984).** Gestion des ressources génétiques des plantes. Tom1 et Tom2: Manuel. Agence de Coopération Culturelle et Technique (ed.) Lavoisier, Paris.
- Perret X., Staehelin C. and Broughton W. J. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 180- 201.
- Phillips D. A. (2000).** Biosynthesis and release of rhizobial nodulation gene inducers by legumes. In: Triplett E. P. ed. *Prokaryotic Press*, 349-364.
- Pierson L.S. and Pierson E.A. (2000).** Microbial gossiping: signalling in the rhizosphere. Proceedings of 5th PGPR Workshop.
- Pikovskaya R.I. (1948).** Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*, 17: 362–370.
- Piyush P., Kang S. C. and Maheshwari D. K. (2005).** Isolation of endophytic plant growth-promoting *Burkholderia* sp MSSP. from root nodules of *Mimosa pudica*. *Curr. Sci.* 89(1).
- Ponsonnet C. and Nesme X. (1994).** Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTI and chromosomal regions. *Arch. Microbiol.* 161:300-309.

- Pradeep A. R., Chatterjee S. H. and Nair C. V. (2005).** Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori*, revealed by RAPD and ISSR markers systems. *J. Appl. Genet.* 46:219-298.
- Pradhan A., prakash S., Mukhopadhyay A. and Pental D. (1992).** Phylogeny of Brassica and allied genera based on variation in chloroplast and mitochondrial DNA patterns: molecular and taxonomic classification are incongruous. *Theor. Appl. Genet.* 85:331-340.
- Prevost A. and Wilkinson M. J. (1999).** A new system of comparing of PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:107-112.
- Priolo A., Waghorn G. C., Lanza M., Biondi L. and Pennisi P. (2000).** Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: Effects on lamb growth performance and meat quality. *J. Anim. Sci.* 78: 810- 816.
- Puhan Z. and Wielinga M. W. (1996).** Products derived from carob pods with particular emphasis on carob bean gum (CBG). Report Technical Committee of INEC (unpublished).
- Qian W., Ge S. and Hong D-Y. (2001).** Genetic variation within and among population of a wild rice *Oriza granulata* from China detected RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 102:440-449.
- Quezel P. et Santa S. (1962/63).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méditerranéennes. Tome 1. Edit CNRS. Paris
- Rademaker J. L. W., Hoste B., Louws F. J., Kerster K., Swings J., Vauterin L., Vauterin P. and De Bruij F. J. (2000).** Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:665-677.
- Ramsay Y. L., Macaulay M., Degli Ivanissevich S., Maclean K., Cardle L., Fuller J., Edwards K. J., Tuverson S., Morgante M., Massari A., Maestri E., Marmioli N., Sjakste T., Ganai M., Powell W. and Waugh R. (2000).** A simple sequence repeat-based linkage map of Barley. *Genetics.* 156:1997-2005.
- Rangarajan S., Loganathan P., Saleena L. M. and Nair S. (2001).** Diversity of pseudomonads isolated from three different plants rhizospheres. *J. Appl. Microbiol.* 91: 742- 740.
- Rashid M., Khalil S., Ayub N., Alam S. and Latif F. (2004).** Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pak. J. Biotechnol. Sci.* 7: 187- 196.
- Reamon-Büttner S. M. and Jung C. (2000).** AFLP-derived STS markers tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L. *Theor. Appl. Genet.* 100:432-438.
- Reddy P. M. and Ladha J. K. (1995).** In nitrogen fixation: Fundamentals and applications, *Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands*, pp. 629- 633.
- Reeves G., Francis D., Davies M. S., Rogers H. J. and Hodgkinson T. R. (1998).** Genome size in negatively correlation with altitude in natural population of *Dactylis glomerata*. *An. Bot.* 82(supplement):99-105.
- Reinhold B., Harek T., Fendrik I., Pot B., Gillis M., Kersters K., Thieleman S. and De Ley J. (1987).** *Azospirillum halopraefereus* sp. nov. a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 43- 51.
- Reinhold B., Hurek T., Gillis M., Hoste B., Vancanneyt M., Kersters K. and Deley J. (1993).** *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacter associated with root of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 574- 584.
- Reis V. M., Olivares F. L. and Döbereiner J. (1994).** Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 401- 405.
- Reiter R. S., Williams J. G. K., Feldmann K., Rafalski J. A., Tingey S. V. and Scolnik P. A. (1992).** Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:1477-1481.
- Rejeb M. N. (1995).** Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration. Dans: Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Edit. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris. pp: 79-85.
- Rejeb M. N., Laffray D. and Louguet P. (1991).** Physiologie du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) en Tunisie. Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides, Group d'Etude de l'Arbre, Paris, France. P:417-426.
- Retana J., Ramoneda J. and Garcia del Pino F. (1990).** Importancia de los insectos en la polinización del algarrobo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 16:143-150.

- Retana J., Ramoneda J., Garcia del Pino F. and Bosch J. (1994).** Flowering phenology of carob, *Ceratonia siliqua* L. (Caesalpinaceae). *J. Hort. Sci.* 69(1):97-103.
- Reva O. N., Smirnov V. V., Petterson B. and Priest F. G. (2002).** *Bacillus endophyticus* sp. nov. Isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 101- 107.
- Rhizopoulou S. and Davies W. J. (1991).** Influence of soil drying on root development, water relations and leaf growth of *Ceratonia siliqua* L. *Oecologia*, 88:41-47.
- Richardson A. E., Simpson R. J., Djordjevic M. A. and Rolfe B. C. (1988).** Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* is affected by low pH and by Ca and Al ions. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2541- 2548.
- Rivas R., Velázquez E., Willems A., Vizcaino N., Subba-Rao N. S., Mateos P. F., Gillis M., Dazzo F. B. and Martinez-Molina E. (2002).** A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root nodule symbiosis with the aquatic legume, *Neptunia natans* (L. F.) Druce. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(11): 5217-5222.
- Rivas R., Willems A., Subba-Rao N. S., Mateos P. F., Dazzo F. B., Kroppenstedt R. M., Martinez-Molina E., Gillis M. and Velázquez E. (2003).** Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 47-53.
- Robert O., Abelard C. and Dedryver F. (1999).** Identification of molecular for the detection of the yellow rust resistance gene Yr17 in wheat. *Molecular Breeding*, 5:167-175.
- Rodelas B., Salmerdn V., Martinez-Toledo M.V. and Gonzfilez-López J. (1993).** Production of vitamins by *Azospirillum brasilense* in chemically-defined media. *Plant Soil*, 153, 97-101.
- Röder M. S., Plaschke J. König S. U., Börner A., Sorrells M. E., Tranksley S. D. and Ganai M. W. (1995).** Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246:327-333.
- Rodriguez H. and Fraga R. (1999).** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319- 339.
- Rodríguez J. and Frutos D. (1988).** Primeros estudios sobre las poblaciones de algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.) en Sureste y Sur de España. Pp. 255-267 in Proceedings of the II International Carob Symposium (P. Fito and Mulet, eds.). Valencia, Spain.
- Rome S., Fernandez M. P., Brunel B., Normand P. and Cleyet-Marel J. C. (1996).** *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 972- 980.
- Russo F. (1954).** Aspetti biologici e culturali del carrubo in Sicilia. *Ann. Sperimentazione Agraria*, 8: 947-967.
- Sabry S. R. S., Saleh A. S., Batchelor C. A., Jone J., Jotham J., Webster G., Kothari S. L., Davey M. R. and Cocking E. C. (1997).** Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 264: 341- 346.
- Sahle M., Coleon J. and Haas C. (1992).** Carob pod (*Ceratonia siliqua*) meal in geese diets. *Brit. Poultry Sci.* 33:531-541.
- Samec P. and Nasinec V. (1995).** Detection of DNA polymorphism among pea cultivars using RAPD technique. *Biologia Plantarum.* 37:321-327.
- Santos M. A., Vargas A. T. and Hungria M. (1999).** Characterization of soybean *Bradyrhizobium* strains adapted to the Brazilian savannas. *FEMS Microbiol.* 30: 261- 272.
- Santos P. E. L., Bustillos-Cristall R. and Caballero-Mellado J. (2001).** *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen-fixing with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2790- 2798.
- Sanz-Cortés F., Badens M. L., Paz S., Íñiguez A. and Llácer G. (2001).** Molecular Characterization of Olive cultivars using RAPD markers. *J. Amer. Soc Hort. Sci.* 126:7-12.
- Sarawgi S.K., Tiwari P.K. and Tripathi R.S. (1999).** Uptake and balance sheet of nitrogen and phosphorus in gram (*Cicer arietinum*) as influenced by phosphorus, biofertilizers and micronutrients under rainfed condition, *Indian J. Agron.*, 44, 768-772.
- Saura-Calixto F. J. (1987).** Determinación de la composición química de algarroba (*Ceratonia siliqua*), Azúcares, taninos, pectinas y aminoácidos. *Anales de Bromatología.*, XXXIX: 81- 93.
- Schippers B., Bakker A., and Bakker P. (1987).** Interactions Of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*, 25, 339-358.

- Schneider M. and de Bruijn F. J. (1996).** Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 163- 174.
- Schnell R. J., Ronning C.M. and Knight R. J. (1995).** Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. Using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90:269-274.
- Schweinfurth G. (1894).** Sammlung arabisch-aethiopischer Pflanzen, Ergebnisse von Reisen in dem Jahren 1881, 1888-89, 1891-92. Bull, Herb. *Boissier* 2:1-114.
- Schwinghamer E. A. (1967).** Effectiveness of rhizobium as modified by mutation for resistance to antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 33: 121- 136.
- Schwintzer R. and Tjepkema J. D. (1990).** The biology of *Frankia* and Actinorrhizal plants. *Academic Press Inc., San Diego, USA*, 99.
- Sebastian K. T. and McComb J. A. (1986).** A micropropagation system for carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Scientia Hort.* 28:127-131.
- Sedra M. H., Lashermes P., Trouslot P., Combes M-C and Hamon S. (1998).** Identification and genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties from Morocco using RAPD markers. *Euphytica.* 103:75-82.
- Segher D., Wittebolle L., Top E. M., Verstraete W. and Siciliano D. (2004).** Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. Endophytic community. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1475- 1482.
- Segovia L., Young J. P. W. and Martinez-Romero E. (1993).** Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar Phasoli type I strain as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol* 4: 374- 377.
- Sekri-Pataryas K. H., Mitrakos K. A. and Georgi M. K. (1973).** Yields of fungal protein from carob sugars. *Econ. Bot.* 27:311-319.
- Serairi-Beji R., Mekki-Zouiten L., Tekaya-Manoubi L., Loueslati M. H., Guemira F. and Ben Mansour. (2000).** Can carob powder be used with oral rehydration solution for the treatment of acute diarrhea. *Med. Top.* 60:125.
- Sessitsch A., Reiter B. and Berg G. (2004).** Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth -promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 239-249.
- Sfakiotakis E. M. (1978).** Germination in vitro of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pollen. *Z. Pflanzenphysiol.* 89:443-447.
- Shang Y. M., Jackson R. C. and Nguyen H. T. (1988).** A new banding technique for chromosomes of wheat (*Triticum*) and its relatives. *Cereal Research Communications.* 16 (3-4):169-174.
- Sharma P. K., Sarita S. and Prell J. (2005).** Isolation and characterization of an endophytic bacterium related to *Rhizobium/Agrobacterium* from wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Curr. Sci.* 89: 608- 610.
- Shenoy V. V., Kalagudi G. M. and Gurudatta B. V. (2001).** Towards nitrogen autotrophic rice. *Curr. Sci.* 81: 451- 457.
- Shishido M., Breuil C. and Chanway C. P. (1999).** Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 191- 196.
- Sica M., Graziella G., Montieri S., Gaudio L. and Aceto S. (2005).** ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. *Genetics*, 6:1-7.
- Soares-Ramos R. L., Ramos H. J. O., Cruz L. M., Chubatsu L. S., Pedrosa F. O., Rigo L. U. and Souza E. M. (2003).** Comparative molecular analysis of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. *Gen. Mol. Biol.* 26: 537- 543.
- Song K. M., Osborn T. C. and Williams P. H. (1990).** *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs)3. Genome relationships in *Brassica* and *B. rapa* (syn *Campestris*). *Theor. Appl. Genet.* 79:497-506.
- Southern E. M. (1975).** detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98:503-517.
- Souto S. M. and Döbereiner J. (1984).** Metodologia para medição da fixação biológica de nitrogênio em raízes de gramíneas forrageiras tropicais. *Pesq Agropec Bras.* 19: 553- 565.
- Spigaglia P. and Mastrantonio P. (2003).** Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 4:2454-2457.
- Squartini A., Struffi P., Döring H., Selenka-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Dazzo F. B., Casella S. and Nuti M. P. (2002).** *Rhizobium sullae*

sp. nov., (formerly "*Rhizobium hedysari*"), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1267- 1276.

- Stace C. A. (1989).** Plant taxonomy and biosystematics. Distributed in Chapman and Hall Inc. New York, USA.
- Stephan M. P., Oliveira M., Teixeira K. R. S., Martinez-Drets G. and Döbereiner J. (1991).** Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 67- 72.
- Steven E. I. and Maria T. B. (2003).** Microbiology of the phyllosphers. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1875-1883.
- Stone P. J., O'Callaghan K. J., Devey M. R. and Cocking E. C. (2001).** *Azorhizobium caulinodans* ORS571, colonize the xylem of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Pl. Micobe Interac.* 14: 93- 97.
- Strobel G.A. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infections*, 5, 535-544.
- Stuessy T. E. (1990).** The systematic evolution of comparative data. Columbia Univ. Press, New York, USA.
- Sturz A. V. and Nowak J. (2000).** Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *App. Soil. Ecol.* 15: 183- 190.
- Sturz A. V., Christie B. R. and Nowak J. (2000).** Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crops production. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 19: 1- 30.
- Sturz A.V., Christie B.R., Matheson B.G., Arsenault W.J. and Buchanan N.A. (1999).** Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathology*, 48, 360-369.
- Sullivan J. T. and Ranson C. W. (1998).** Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 5145- 5149.
- Sundara Rao W. V. B. and Sinha M. K. (1963).** Phosphate dissolving organisms in soil and rhizosphere. *Indian J. Agric. Sci.* 33: 272- 278.
- Sy A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., de Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C. and Dreyfus B. (2001).** Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183: 214- 220.
- Takezaki N. and Nei M. (1996).** Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellites DNA. *Genetics.* 144:389-399.
- Talhinhas P., Naves-Martins J. and Leitão J. (2003).** AFLP, ISSR and RAPD marker reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus* spp. *Plant Breeding.* 122:507-510.
- Tarrand J. J., Kriez N. R. and Döbereiner J. (1978).** A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with the descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. nd two species *Azospirillum lipoferum* ( *Beijerinck*) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967- 980.
- Tautz D. (1989).** Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nuc. Acids Res.* 17:6463-6471.
- Tautz D. and Rentz M. (1984).** Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eucariotic genome. *Nature*, 322:652-656.
- Teixeira K. R. S., Stephan M. P; and Döbereiner J. (1987).** Physiological studies of *Saccharobacter nitrocapta*, a new acid tolerant N<sub>2</sub>-fixing bacterium. In: International symposium on nitrogen fixation with non-legumes, 4, *Rio de Janeiro, RJ, Brazil*, 149p.
- Teoh S. B., Htchinson J. and Miller T. E. (1983).** A comparison of chromosomal distribution of cloned repetitive DNA sequences in different *Aegilops* species. *Heredity.* 51:635-641.
- Terauchi R. and Kahl G. (1998).** Mapping of the *Dioscorea tokoro* genome: AFLP markers linked to sex. *Genome*, 42:752-762.
- Thomas W. D. and Graham R. W. (1952).** Bacteria in apparently healthy pinto beans. *Phytopathology.* 42: 214.
- Thormann C. E., Ferreira M. E., Camargo L. E. A., Tivang J. G. and Osborn T. C. (1994).** Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor. Appl. Genet.* 88:973-980.
- Tilak K. V. B. R., Ranganayaki N., Pal K. K., de R., Saxena A. K., Nautiyal C. S., Mittal S., Tripathi A. K. and Johri B. N. (2005).** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 89: 136-150.

- Tjepkema J. D., Schwintzer R. C. and Benson D. R. (1986).** Physiology of actinorrhizal nodules. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 209- 232.
- Tombolini R., Unge A., Davey M. E., de Bruijn F. J. and Jansson J. K. (1997).** Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22: 17- 28.
- Tous J. (1995).** Situación del algarrob en Australia. Boletín Agropecuario 'La Caixa' 35:43-49.
- Tous J. (1995b).** Carobs: A world-wide perspective on the industry and management. Pp. 46-52 in Proceedings of a symposium on Olives and Carob for land care and for profit. Univ. Of Adelaide, South Australia.
- Tous J. and Baltte I. (1990).** El algarrobo. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Tous J., Battle I. and Romero A. (1995).** Prospección de variedades de algarrob en Andalucía. Información Técnica Económica Agraria. 91V (3):164-174.
- Tous J., Olarte C., Truco M. J. and Arús. (1992).** Isozyme polymorphism in carob cultivars. *Hort Science.* 27: 257- 258.
- Tous J., Romero A., Plana J. and Battle I. (1996).** Current situation of carob plant material. In Proceedings of the III International Carob Symposium. Cabanas-Tavira. Portugal (in press)
- Tripathi A. K. (2002).** Rhizobia of the  $\beta$ - subclass of *proteobacteria*: A tale of losing the race. *Curr. Sci.* 82: 8- 9.
- Trujillo S. K., Willems A., Abril A., Planchuelo A. M., Rivas R., Ludena D., Mateo P. F., Martínez-Molina E. and Velazquez E. (2005).** Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupine* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (3): 1318- 27.
- Tucker S. C. (1992a).** The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae: Ceasalpinoideae: Cassieae). *Am. J. Bot.* 79(3): 367-327.
- Tucker S. C. (1992b.)** The role of floral development in studies of legume evolution. *Can. J. Bot.* 70:692-700.
- Tutin T. G., Burges N. A., Chater A. O., Edmondson, Heywood V. H., Moore D. M., Valetine D. H., Waters S. M. and Webb D.A. (1990/93).** *Flora Europaea*. Cambridge University Press. UK.
- Ueda T., Suga Y., Yahiro N. and Matsuguchi T. (1995).** Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based on sequencing of a nodC segment. *J. Bacteriol.* 177: 468- 472.
- Ureta A., Alvarez B., Ramon A., Vera M. A. and Martínez-Drets G. (1995).** identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. *Plant Soil.* 172: 271- 277.
- Urquiaga S., Cruz K. H. S. and Boddey R. M. (1992).** Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Sci. Am. J.* 56: 105- 114.
- van Berkum P., Beyene D. and Eardley B. D. (1996).** Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:240-244.
- van Berkum P., Beyene D., Bao G., Campbell T. A. and Eardly B. D. (1998).** *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobia genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [ (L.) Le debour]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 13- 22.
- van Berkum P. and Eardly B. D. (2002).** The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrifians* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1132- 1136.
- van Berkum P., Terefework Z., Paulin L., Suomalainen S., Lindroström K. and Eardly B. D. (2003).** Discordance phylogenetic with the *nn* loci of rhizobia. *J. Bacteriol.* 185: 2988- 2998.
- Vandamme P. B., Grillis P. D. V., Kersters K. and Swing J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic. *Microbiol. Rev.* 60, 407- 438.
- Vandamme P., Goris J., Chen W. M., De Vos P. and Willems A. (2002).** *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 68: 1132- 1136.
- Vande Brock A., Michiels J., Van Gool A. and Vanderleyden J. (1993).** Spacial temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression on the bacterial *nifH* gene during association. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 6: 592- 600.
- Vardar Y., Seçurenand Ö. And Ahmed M. (1972).** Preliminary results on the chemical composition of the Turkish carob beans. *Qual. Plant Mater Veg.* XXI (4): 318- 327.



- Vavilov N.I., (1951).** The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants [translated from the Russian by K.S. Chester]. The Ronald Press Co., New York.
- Velazquez E., Ignal J. M., Willems A., Fernandez M. P., Munoz E., Mateo P. F., Abril A., Toro N., Normand P., Crevantes E., Gillis M. and Martinez-Molina E. (1998).** *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 51: 1011-1021.
- Venuesa P., Leonbarrios M., Silava C., Werner D., Jarbo-Lorenzo A., Rérez-Galdona R., Willems A. and Martinez-Romero. (2005).** *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (*Papilionoidae: Genisteae*) from the Canary Island, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv *genistcarum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 55: 569-575.
- Verma S. C., Ladha J. K. and Tripathi A. K. (2001).** Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91: 127- 141.
- Versadovic J., Koeuth T. and Lupski J. R. (1991).** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Ac. Res.* 19: 6823- 6831.
- Versalovic J., Kapur V., Koeuth T., Mazurek G., Whittan T. S., Musser J. M. and Lupski J. R. (1995).** Automated DNA fingerprinting of pathogenic bacteria by fluorophor-enhanced repetitive sequence based PCR. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* 119:23-29.
- Verslovic J. T., Schneider M., de Bruijn F. J. and Lupski J. R. (1994).** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5: 25- 40.
- Vidal D. (1985).** El troceado como etapa previa al aprovechamiento industrial de la garrofa *In* Jornadan sobre la garrofa. Liria (Valencia) (unpublished).
- Vinterhalter D., Grubisic D., Bojovic-Cvetic D. and Budimir S. (1992).** Lentical hypertrophy in shoot culture of *Ceratoina siliqua* L. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 31:111-114.
- Vinuesa P., Rademaker J. L. W., de Bruijn F. J. and Werner D. (1998).** Gynotypic characterization of bradyrhizobium strain nodulating endemic woody legumes of the Canary Island by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA and 16S- 23S rDNA intergenic spacer, repetitive extragenic palendromic PCR genomic fingerprinting and partial rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 21: 61- 68.
- Virk P. S., Newbury H. J., Jackson M. T. and Ford-Lloyd B. V. (1995).** The identification of duplication accession within a rice germplasm collection using RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 90:1049-1055.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J, Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M. (1995).** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuc. Acids Res.* 23:4407-4414.
- Wang E. T., van Berkum P., Beyene D., Sui X. H., Dorado O., Chen W. X. and Martinez-Romero E. (1998).** *Rhizobium huaulense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 687- 699.
- Wang E. T., van Berkum P., Sui X. H., Beyene D., Chen W. X. and Martinez-Romero E. (1999).** Diversity of rhizobia associated with *Amorphae fructicosa* isolated from Chinese soils and description of *Mezorhizobium amorphae* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 51- 65.
- Wang Y. H., Thomas C. E. and Dean R. A. (1997).** A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theor. Appl. Genet.* 96:791-798.
- Watanabe I., Ito O. and Barraquio W. (1981).** In associative Nitrogen fixation (eds Vose, P. B. and Rusche, A. P.), *CRC Press, Florida*, 2: 177- 182.
- Watt M., McCully M. E. and Jeffree C. E. (1993).** Plant and bacteria mucilage of the maize rhizosphere: comparison of their soil binding properties and histchemistry in model system. *Plant Soil*, 151: 151- 165.
- Waycott W. and Wricke C. (1994).** Diverntiation of nearly idntifical germplasm accessions by a combination of molecular and morphological analysis. *Genome*, 37:575-583.
- Weber W. E. and Wricke G. (1994).** Genetic markers in plants breeding. *Advances in plant breeding*, Paul Pare Y Scientific Publishers, Berlin. 105p.
- Weber WO. B., Baldani V. L. D., Teixeira K. R. S. Kirchhof G., Baldani J. L. and D`abereiner J. (1999).** Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in banana and pineapple plants. *Plant Soil*, 210: 103- 113.

- Webster G., Gough C., Vasse J., Batchelor C. A., O'Callaghan K. J., Kothari S. L., Davey M. R., Dénarié J. and Cocking E. C. (1998).** Interaction of rhizobia with rice and wheat. *Plant Soil*. 194: 115-122.
- Wei J. Z. and Wang R. R. C. (1995).** Genome and species-specific markers and genome relationships of diploid perennial species in *Triticeae* based on RAPD analysis. *Genomes*, 38:1230-1236.
- Wei G. H., Wang E. T., Tan Z. Y., Zhu M. E. and Chen W. X. (2002).** *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. And *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2231-2239.
- Wei G. H., Tan Z. Y., Zhu M. E., Wang E. T., Han S. Z. and Chen W. X. (2003).** Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Löss Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov., *Int. J. Evol. Microbiol.* 53: 1575- 1583.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier O. A. and Lane D. J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- Weller D. M. (1988).** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 379- 407.
- Welsh J. and McClelland M. (1990).** Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18:7213-7218.
- Welsh J., Honeycutt R. J., McClelland M. and Sobral B. W. S. (1991).** Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor. Appl. Genet.*82:473-476.
- Webster G., Gough C., Vasse J., Batchelor C. A., O'Callaghan K. J., Kothari S. L., Davey M. R., Dénarié J., and Cocking E. C. (1997).** Interaction of rhizobia with rice and wheat. *Plant Soil*. 194: 115-122.
- Westmann A. L., Kresovich S. (1997).** Use of molecular marker techniques for description of plant genetic resources. Biotechnology in agriculture series n°19. Cab international, Wallingford. New York, 9-48.
- Wheeler C. T. and Miller J. M. (1990).** Current and potential use of actinorrhizal plants in Europe. In the biology of *Frankia* and Actinorrhizal Plant (eds Schwintzer). *Acad. Press Inc. San Diego, USA.* 128- 156.
- Whiteside L. (1981).** The carob cookbook. Ed. Thorsons Publishers Limited, Wellingborough. Northamptonshire.
- Wiesner I and Wiesnerová D. (2003).** Effect of resolving medium and staining procedure on inter-simple-sequence-repeat (ISSR) patterns in cultivated flax germplasm. *Genet. Res. Crop Evol.* 50:849-853.
- Wilde J., Waugh R. and Powell W. (1992).** Genetic fingerprinting of Theobroma clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 83:871-877.
- Wilkie S. E., Isaac P. G. and Slatter R. J. (1993).** Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86:497-504.
- Willems A. (2003).** The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil*. 1-11.
- Willems A. and Collins M. D. (1993).** Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 305- 313.
- Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski J. A. and Tingey S. V. (1993).** Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.* 51:704-740.
- William J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A. and Tingey S. V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Ac. Res.* 18: 6531- 6535.
- Williams C. L., Bollella M., Spack A. and Puder D. (1995).** Soluble fibre enhances the hypocholesterolemic effect and the step I diet in childhood. *J. Am. College Nutr.* 14: 251- 257.
- Winer N. (1980).** The potential of the carob tree (*Ceratonia siliqua*). *Int. Tree Crops J.* 1:15-26.
- Woese C. R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221- 271.
- Wood M. and Cooper J. E. (1985).** Screening elover of lotus rhizobia of acidity and aluminium. *Soil Biol. Biochem.* 17:493-497.
- Xu D. H. and Gai J. Y. (2003).** Gentic diversity of wild and cultivated soybeans growing in China revealed by RAPD analysis. *Plant Breeding*, 122:503-506.
- Xu L. M., Ge C., Cui Z. Li J. and Fan H. (1995).** *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov., isolated from the root nodules of soybean, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 706- 711.

- Xu M. L., Melchinger A. E., Xia X. C. and Lübberstedt T. (1999).** High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR and AFLP markers. *Molecular and General Genetics*. 261:574-581.
- Yabuuchi E., Kosako Y., Yana I., Hotta H. and Nishiuchi Y. (1995).** Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (*Ralstonia solanacearum* (Smith 1896)) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 39: 897- 904.
- Yamada Y., Hoshino K. and Ishikawa T. (1997).** The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S rRNA: The evaluation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 1244- 1251.
- Yamada Y., Hoshino K. and Ishikawa T. (1998).** Taxonomic studies of acetic acid bacteria and allied organisms. XII, The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 3270- 3280.
- Yanagi M. and Yamasato K. (1993).** Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS. Microbiol. Lett.* 107: 115- 120.
- Yang W., De Olivera A. C., Godwin I., Schertz K. and Bennetzen J. L. (1996).** Comparison of DANN marker technologies in characterization plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Sci.* 36:1669-1676.
- Yang X. and Quiros C. F. (1993).** Identification and classification of *Cereale* cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 86:205-212.
- Yanni Y. G., Rizk R. Y., Corich V., Squitin A. Ninke K. et al. (1997).** Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil.* 194:99-114.
- Yao Z. Y., Kan F. L., Wei G. H. and Chen W. X. (2002).** Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Yee E., Kidwell K. K., Sills G. R. and Lumpkin T. A. (1999).** Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) Accession on the basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Sci.* 39:268-275.
- Young J. M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A. and Sawada H. (2001).** A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al., 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 51: 89- 103.
- Young J. M. (2003).** The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al., 1988 and *Sinorhizobium morelense* Wang et al., 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination "*Sinorhizobium adhaerens*" (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 2107- 2110.
- Young J. P. W., Downer H. L. and Eardly B. D. (1991).** Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAil by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* 173: 1251-2277.
- Young J. P. W. (1992).** Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In biological nitrogen fixation (eds Stacey, G., Burris, R. H. and Evans, H. J.), Chapman and Hall, *New York*. 43- 86.
- Young J. P. W. and Hauka K. E. (1996).** Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* 133: 87- 94.
- Zaharieva M., David J., This D. and Monneveux P. (1999).** Analyse de la diversité génétique d'*Aegilops geniculata* Roth en Bulgarie. *Cahier Agri.* 8:181-188.
- Zahran H. H., Räsänen L. A., Karsisto K. and Lindström K. (1994).** Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *World J. Microbiol.* 10: 100- 105.
- Zhu Z. H., Liu C. Q. and Jiang B. F. (1984).** In organic matter and rice, *IRRI, Manila, Philippines*, pp. 259-272.
- Zietkiewicz E., Rafalski A. and Labuda D. (1994).** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics.* 20:176-183.
- Zohary M. (1973).** Geobotanical Foundations of the Middle East, 2 vols. Stuttgart.
- Zohary M. (1996).** Domestications of the carob tree. In Proceedings of the III International Carob Symposium. Cabanas-Tavira, Portugal. (in press).
- Zohary M., and Orshan P. (1959).** The maquis of *Ceratonia siliqua* in Israel, Palest. *J. Bot. Jerusalem*, 8: 385-397.

**Zrhari K., Aurag J., Khbayal B., Kharchaf D. and Filali-Maltouf A. (2000).** Phenotypic characterization of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan region of Morocco. *Letter in Appl. Microbiol.* 30:351-357.