

***Pouvoir pathogène et performances
de transformation de trois souches
d'Agrobacterium tumefaciens in vitro et in
planta sur quelques espèces d'eucalyptus***

Présenté par: MEGATELI Mohamed

Directeur de Thèse : Melle KRIMI Z. Professeur (USDB Blida)

Soutenu le :24 Mai 2012

Composition du jury : Président : M BOUZNAD Z. Professeur ENSA El-Harrach Examineurs : M
KHELIFI L. Professeur ENSA El-Harrach Mme LOUANCHI M. Maître de conférences ENSA El-
Harrach

Table des matières

Dédicace . . .	5
REMERCIEMENT . . .	6
RESUME . . .	7
ABSTRACT . . .	8
Liste des abréviations . . .	9
Introduction . . .	10
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique . . .	12
I.Caractéristiques taxonomiques,moléculaires,phytopathologiques et biotechnologiques d'Agrobacterium spp. . . .	12
I.1. Caractéristiques cellulaires . . .	12
I.2. Structure du génome . . .	12
I.3. Taxonomie d'Agrobacterium spp. . . .	12
I.4.Caractéristiquesdu plasmideTi . . .	15
I.5. Processus de pathogénèse . . .	17
I.6. Dégâts provoqués par la maladie du crown gall . . .	21
I.7. Le contrôle de la maladie . . .	22
I.8. Détection des Agro-bacterium spp. pathogènes . . .	23
I.9. La transformation génétique chez les végétaux supérieurs . . .	24
I.10.Utilisation d'Agrobacteriumtumefaciens pour la transformation génétique des plantes . . .	25
II. Généralités sur le genre Eucalyptus spp. . . .	27
II.1. Classification . . .	27
II.2. Origine et aire de répartition . . .	28
II.3. Description botanique . . .	28
II.4. Mode de reproduction . . .	29
II.5. Exigences générales . . .	29
II.6. Intérêts et utilisation . . .	30
II.7. La culture de l'eucalyptus . . .	30
II.7.1. Culture en pépinière . . .	30
II.7.2. Culture in vitro de l'eucalyptus . . .	30
II.8.Principales essences d'eucalyptus cultivées en Algérie . . .	34
II.9. Conclusion à la partie bibliographique et objectifs de recherche . . .	35
Chapitre 2: Matériel et méthodes . . .	36
1.Matériel biologique . . .	36
1.1.Matériel végétal . . .	36
1.2. Souches bactériennes . . .	36
2. Préparation des plantes . . .	37
2.1. Conduite du test invitro . . .	37
2.2. Conduite du test inplanta . . .	38
3. Méthodes d'inoculation . . .	39
4. Paramètres étudiés . . .	39

4.1. Etude du pouvoir pathogène des souches d'Agrobacterium spp. et de la sensibilité des espèces d'eucalyptus . . .	39
4.2. Etude de la performance des souches d'Agrobacterium spp. . .	39
5. Analyse des résultats . . .	40
Chapitre 3 : Résultats et discussions . . .	41
1. Pouvoir pathogène in vitro des trois souches d'Agrobacterium tumefaciens et sensibilité des espèces d'eucalyptus . . .	41
1.1. Sensibilité des espèces d'eucalyptus vis-à-vis des trois souches bactériennes in vitro . . .	43
1.2. Pouvoir pathogène des trois souches d'Agrobacterium in vitro . . .	44
1.3. Taux d'infection des espèces d'eucalyptus inoculées par les trois souches d'Agrobacterium in vitro . . .	45
1.4. Discussion . . .	47
2. Pouvoir pathogène in planta de trois souches d'Agrobacterium tumefaciens et sensibilité de quelques espèces d'eucalyptus . . .	49
2.1. Sensibilité des espèces d'eucalyptus vis-à-vis des trois souches bactériennes in planta . . .	50
2.2. Pouvoir pathogène des trois souches d'Agrobacterium in planta . . .	51
2.3. Taux d'infection des espèces d'eucalyptus inoculées par les trois souches d'Agrobacterium in planta . . .	52
2.4. Discussion . . .	54
3. Virulence et performance des trois souches d'Agrobacterium tumefaciens in planta . . .	55
3.1. Résultats des moyennes de poids des tumeurs causées par les trois souches sur les six espèces d'eucalyptus . . .	56
3.2. Résultats des moyennes de diamètre des tumeurs causées par les trois souches sur les six espèces d'eucalyptus . . .	59
3.3. Discussion . . .	62
Conclusion . . .	65
Références bibliographiques . . .	67
Annexe . . .	83
Annexe 1 : Composition des milieux de culture utilisés . . .	83
Annexe 2 : Tableaux d'analyses de la variance . . .	84
Annexe 3 : Tableaux des tests (LSD). . .	84

Dédicace

Je dédie ce modeste travail : A mes chers parents, mon seul et unique abri d'enfance, que Dieu me les garde et à ma grande mère. A mes chers frères : Fouad et Azzedine. A mes chères sœurs : Djaouida, Samia et Imane. A ma chère femme Ghania et ma petite fille Bouchra. Aux plus beaux gausses du monde ; Oussama et Aymen. A mes chers amis qui n'ont jamais cessé de m'encourager : Nazim, Benaissa, Abdelkader, Mustapha, Mohamed, Youcef et Akli...etc.

REMERCIEMENT

Avant tout je remercie Dieu le tout puissant pour m'avoir donné courage, assistance et patience de mener à bien l'élaboration de ce travail.

L'expression de ma profonde gratitude et mes plus vifs remerciements vont à Melle. Krimi Z., Professeur à l'université Saad Dahleb de Blida pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de phytobactériologie et d'avoir accepté de diriger ce travail, les conseils et les remarques qu'elle m'a régulièrement prodigués tout au long de la phase expérimentale ont largement contribué à la réalisation de ce travail, son intérêt constant et sa patience lors de la rédaction ont été pour moi de précieux encouragements.

Je remercie Mr.BouznadZ., Professeur à l'ENSA (El Harrach), d'avoir bien voulu m'honorer de sa présence en qualité de président de jury de ce mémoire. Qu'il trouve ici l'expression de mes gratitudees.

Que Mr.Khilifi L., Professeur à l'ENSA (El Harrach) et Mme LOUANCHI M. Maître de conférences à l'ENSA(El-harrach) trouvent ici l'expression de mes profonds remerciements pour m'avoir honoré d'examiner ce modeste travail.

Mes sincères remerciements vont également au personnel de L'INRF de Bâinem pour m'avoir fourni la semence des espèces étudiées dans la présente étude, en particulier Mr.Amdoun R.

Je tiens également à remercier MmeZaoui D., ingénieur de laboratoire, pour son soutien et sa collaboration efficace ainsi qu'aux étudiants ayant travaillé au laboratoire " Ressources génétiques et biotechnologies " pour leur aide amicale et leur assistance fraternelle A tous et à toutes, qui au cours de ce travail m'ont fournis beaucoup d'aide et d'encouragements, je dis merci.

RESUME

Le crown gall est la maladie prédominante la plus rencontrée dans les pépinières d'arbres fruitiers, de plantes ornementales, de la vigne et d'arbres forestiers. Dans le cadre de la vérification du pouvoir pathogène et l'estimation des performances de transformation génétique de trois souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* sur quelques espèces d'eucalyptus, huit espèces appartenant à ce genre, ont subi des inoculations in vitro et in planta avec trois souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* : E17, E2x et C 58.

Dans l'essai in vitro, les espèces : *E. gomphocephala*, *E. cladocalyx*, *E. microcorys*, *E. saligna*, *E. punctata* et *E. umbellata* se sont révélées sensibles montrant différents niveaux de sensibilité à la maladie du crown gall, tandis que les espèces : *E. blackey* et *E. camaldulensis* se sont montrées moins sensibles.

Le taux de pathogénicité le plus élevé a été obtenu par les souches E17 et E2x suivi par la souche C58 avec le pourcentage le plus faible.

Dans l'essai in planta, les espèces : *E. gomphocephala*, *E. cladocalyx*, *E. microcorys*, *E. saligna*, *E. punctata* et *E. umbellata*, se sont révélées sensibles montrant différents niveaux de sensibilité à la maladie du crown gall, tandis que les espèces : *E. blackey* et *E. camaldulensis* se sont montrées moins sensibles. Le taux de pathogénicité le plus élevé a été obtenu par les souches E17 et E2x suivi par la souche C58 avec le pourcentage le plus faible.

Les deux souches E17 et E2X d'*Agrobacterium tumefaciens* isolées à partir d'eucalyptus se sont révélées plus virulentes et présentent des performances intéressantes pour la transformation génétique par rapport aux symptômes des tumeurs produits ; dimensions des tumeurs et présence de cals racinaires de type « hairy root ». La souche de référence C58 s'est révélée moins virulente et moins performante en termes de transformation génétique sur les espèces d'eucalyptus étudiées.

Mots clés: *Agrobacterium tumefaciens*, *Eucalyptus* spp. , sensibilité, crown gall, pouvoir pathogène, virulence, performances de transformation.

ABSTRACT

The crown gall disease is predominantly found in most nurseries of fruit trees, ornamental plants, vines and forest trees. As part of the verification of pathogenicity and the estimated performance of genetic transformation of three pathogenic strains of *Agrobacterium tumefaciens* on a few species of eucalyptus, eight species of this genus, suffered inoculations in vitro and in planta to three pathogenic strains of *Agrobacterium tumefaciens*: E17, E2x and C 58.

In in vitro test, the species: *E. gomphocephala*, *E. cladocalyx*, *E. microcorys*, *E. saligna*, *E. punctata* and *E. umbellata*, proved sensitive showing different levels of sensitivity to crown gall disease, while the species: *E. blackey* and *E. camaldulensis* have been less sensitive. The rate of the higher pathogenicity was obtained by strains E17 and E2x followed by the strain C58 with the lowest percentage.

In in planta test, the species: *E. gomphocephala*, *E. cladocalyx*, *E. microcorys*, *E. saligna*, *E. punctata* and *E. umbellata*, proved sensitive showing different levels of sensitivity to crown gall disease, while the species: *E. blackey* and *E. camaldulensis* have been less sensitive. The rate of the higher pathogenicity was obtained by strains E17 and E2x followed by the strain C58 with the lowest percentage.

Both strains E17 and E2x of *Agrobacterium tumefaciens* isolated from eucalyptus were more virulent and exhibit interesting performances of genetic transformation in relation to the symptoms of tumor products, tumor size and presence of callus root-like "hairy root ". The reference strain C58 was less virulent and less efficient in terms of genetic transformation of Eucalyptus species.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, Eucalyptus spp., sensitivity, crown gall, pathogenicity, virulence, performance of transformation.

Liste des abréviations

- ADN:Acide dés oxyribonucléique
- AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
- ANOVA: Analysis of variance
- APG: Angiosperms Phylogeny Group
- *E: Eucalyptus*
- INRF : Institut National de Recherche Forestière
- LSD : Least significant difference
- Mb: Méga base
- mg : Milligramme
- MG : Mannitol Glutamate (milieu de culture)
- MS : Murashige et Skoog (milieu de culture)
- ONTF : Office national des travaux forestiers
- p: Probabilité
- *R. rhizogènes : Rhizobium rhizogènes*
- T-DNA: Transferred DNA Ti: Tumor inducing *Vir* : Virulence

Introduction

Les espèces appartenant au genre *Agrobacterium* spp. appelées communément agrobactéries sont des bactéries naturellement présentes dans les sols. Le genre *Agrobacterium* spp. (Conn, 1942), comprend une douzaine d'espèces réparties en différents biovars (Popoff et al., 1984). Certaines espèces sont pathogènes aux plantes, elles provoquent la galle du collet (Smith et Townsend, 1907). Cette maladie se traduit par l'apparition d'une tumeur au niveau du collet de la plante. Le pouvoir pathogène de la bactérie est dû à la présence d'un plasmide pTi (Tumor inducing). Cette tumeur est provoquée par le transfert à la plante d'une portion d'ADN de ce même plasmide (T-DNA).

Du fait de leur importance économique, ces bactéries ont été étudiées d'un point de vue phytopathologique et surtout elles ont beaucoup intéressé le domaine de la biotechnologie et en l'occurrence la transformation des plantes. En effet, le plasmide Ti, qui porte les gènes de virulence chez *Agrobacterium*, a permis la construction des plantes génétiquement modifiées consistant en l'insertion de gènes d'intérêt dans T-DNA du plasmide pour être transféré au génome de la plante (Bevan, 1984 ; Valentine, 2003). De plus, l'identification et le séquençage complet de certaines souches d'*Agrobacterium* spp., comme celui de la souche C58 qui sert de modèle et d'outil pour le génie génétique ont été acquis et sont disponibles sur des bases de données (Wood et al., 2001 ; Goodner et al., 2001).

L'épidémiologie de la galle du collet a montré une très grande diversité, au niveau des souches, des espèces et des genres des agrobactéries impliqués dans une même épidémie (Ponsonnet et Nesme, 1994 ; Pionnat et al., 1999). Cette diversité des agents pathogènes est une caractéristique très originale des épidémies de la galle du collet qui ne se rencontrent pas, à notre connaissance, dans d'autres modèles pathogènes aux végétaux ou aux animaux.

Les agrobactéries pathogènes ont un très large spectre d'hôtes puisqu'au moins 634 plantes réparties dans 331 genres et 93 familles y sont sensibles (De Cleene et De Ley, 1976). Les espèces sensibles à la maladie du crown gall appartiennent aux arbres fruitiers (abricotier, amandier, cerisier, framboisier, mûrier, myrtille, noyer, pêcher, poirier, pommier, prunier, rônier, vigne), arbres forestiers (érable, peuplier, eucalyptus, cèdre) et plantes ornementales (*Ficus benjamina*, le rosier, le chrysanthème). La seule souche B6 dont la plante hôte d'origine est *lycopersicum esculentum* infecte près de 280 espèces différentes, elle provoque une baisse de la production de la plante qui est moins vigoureuse et dans des cas extrêmes peut provoquer sa mort. Les dégâts les plus importants sont observés en serre ou en pépinière (Pionnat et al., 1999 ; Beneddra et al., 1996). En serre dans des cultures de rosiers, les conditions environnementales sont très favorables aux agrobactéries. En pépinière, le greffage des plantes facilite la maladie. Les plants infectés ne peuvent être commercialisés. Le manque à gagner pour les pépiniéristes peut être considérable. Par ailleurs, c'est une maladie de quarantaine dans de nombreux pays d'Afrique du nord dont l'Algérie et d'Amérique du sud (Kennedy et Alcorn, 1980 ; Lippincott et al., 1983 ; Moore, 1988 ; Nesme et al., 1990; Raio et al., 1998).

Le genre *Eucalyptus* spp., originaire d'Australie et comptant plus de 700 espèces, s'est rapidement imposé comme le genre feuillu le plus planté au monde en termes de surfaces. Etant donné les rotations très courtes de ces arbres dans les zones tropicales (6-10 ans

contre 20 à 50 pour les Pinus), et les nouvelles estimations de surfaces plantées, supérieures à 20 millions d'hectares dans le monde en 2009 (Iglesias-Trabado et al., 2009).

La maladie du crown gall est très commune sur les essences cultivées en pépinière du fait du système de production intensif des plants et de la monoculture. Les essences du genre *Eucalyptus* n'ont pas échappé à la maladie du crown gall. En 1929, Siemaszko a signalé qu'en Tasmanie (la région méridionale du Caucase), les eucalyptus sont atteints de crown gall dû à *Agrobacterium tumefaciens*. Les eucalyptus ont été classés parmi les essences forestières sensibles au crown gall, où ils ont été sévèrement endommagés par cette maladie (Imazeki, 1960), et depuis aucune épidémie n'a été signalée sur cette essence, jusqu'à ce que les symptômes aient été remarqués pour la première fois en Algérie (Krimi, 2001).

Durant l'été 1999, des plants d'*Eucalyptus occidentalis* présentant des galles ont été collectés dans des pépinières forestières de Sidi Mdjahed (Tlemcen). L'isolement de l'agent causal, a permis d'identifier vingt-deux souches d'*Agrobacterium tumefaciens* produisant des excroissances tissulaires sur les plantes tests utilisées.

L'analyse biochimique et moléculaire a révélé la présence de souches affiliées au biovar 1 et la présence de séquences vir préveues de la présence d'un plasmide tumorigène chez les souches isolées (Krimi, 2001, 2003; Krimi et al., 2006).

L'objectif de notre travail consiste à vérifier in vitro et in planta, le pouvoir pathogène de deux souches d'*Agrobacterium* isolées d'eucalyptus (Krimi et al., 2006) et une souche de référence isolée de cerisier, et par là même déduire la sensibilité de différentes espèces d'eucalyptus vis-à-vis des trois souches d'*Agrobacterium* spp.

Le second objectif consiste à étudier la virulence et la performance des trois souches inoculant les différentes espèces d'eucalyptus testées pour la mise en évidence d'une éventuelle utilisation de ces souches en biotechnologie (transformation génétique).

Dans la première partie de ce document, nous avons présenté les données bibliographiques sur le genre *Agrobacterium* spp. et la plante hôte d'eucalyptus, synthétisés respectivement dans le premier et le deuxième chapitre.

Dans la deuxième partie, nous avons présenté une étude expérimentale (test in vitro et in planta). Les résultats obtenus sont détaillés et interprétés dans le chapitre résultats et discussions qui leur est consacré.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I. Caractéristiques taxonomiques, moléculaires, phytopathologiques et biotechnologiques d'*Agrobacterium* spp.

I.1. Caractéristiques cellulaires

Les agrobactéries ont la forme de bâtonnets de 0,6 – 1,0 µm x 1,5 – 3,0 µm. Les cellules sont à Gram négatif et vont seules ou par paires. Elles ne forment pas de spores et sont mobiles grâce à des flagelles péritriches (de 1 à 6). Elles sont chimio organotrophes aérobies. Mais la plupart des souches d'agrobactéries sont capables de se développer sous une pression d'oxygène réduite, ce qui est le cas dans les tissus végétaux par exemple. La température optimale de croissance de ces bactéries se situe entre 25 et 28°C, sur un milieu contenant des sucres, elles produisent des exopolysaccharides, les colonies ont un aspect très muqueux. Elles produisent de la catalase et généralement aussi de l'uréase et de l'oxydase. Certaines souches regroupées dans le biovar 1 produisent des 3- cétyglycosides (Moore et al., 1988).

I.2. Structure du génome

Le nombre et la taille des réplicons des différentes souches d'agrobactéries est variable. Elles possèdent deux chromosomes ou un chromosome et un méga- réplicon pour l'espèce *R. rhizogenes*. Le plus grand est toujours circulaire, de taille allant de 2,8 à 4Mb. Le deuxième est soit linéaire (Biovar1 et *A. rubi*) soit circulaire (*R. rhizogenes* et *A. vitis*), de taille comprise entre 1 et 2,6Mb. Le contenu plasmidique des souches est lui aussi variable (Jumas-Bilak et al., 1998 ; Urbanczyk et al., 2003).

La souche modèle de biovar1, C58, qui a été complètement séquencée (Wood et al., 2001; Goodner et al., 2001), possède quatre réplicons, dont un chromosome circulaire (CcC58, 2,8Mb) un chromosome linéaire (LcC58, 2Mb), un plasmide cryptique At (pAtC58, 0,55Mb) et un plasmide Ti (pTiC58, 0,2Mb). Le chromosome linéaire des souches de biovar1 serait dérivé d'un mégaplasmide (Goodner et al., 2001).

La comparaison, par alignement de séquences, entre le chromosome circulaire du biovar 1 et le chromosome de *R. rhizogenes* a montré qu'ils sont très proches. Par contre, il n'y a que très peu de similarités entre le chromosome linéaire du biovar1 et le méga- réplicon de *R. rhizogenes*. Le phénomène d'acquisition d'un chromosome secondaire ne serait donc pas un fait unique dans l'histoire évolutive des agrobactéries (Urbanczyk et al., 2003).

I.3. Taxonomie d'*Agrobacterium* spp.

1.3. Le genre *Agrobacterium* Conn (conn, 1942) appartient à la famille des Rhizobiaceae (Kerstens et De Ley, 1984) de la section des α- Proteobacteria (Woese et al., 1984).

Ces bactéries telluriques sont considérées comme un hôte normal de certains sols (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Bouzar et Moore, 1987).

C'est à la fin du 19ème siècle que fut découverte la bactérie du sol *Bacterium tumefaciens* et fut officiellement caractérisée et renommé *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend, 1907).

Plusieurs classifications ont été adoptées pour la taxonomie du genre *Agrobacterium* (Knauf et al., 1983). Elles sont basées essentiellement sur les caractères pathogènes, moléculaires et les caractères génotypiques et phénotypiques.

I.3.1. Classification d'*Agrobacterium* spp. selon les caractères pathogènes

En se basant sur le pouvoir pathogène, le type de symptômes induits et la gamme d'hôtes, le genre *Agrobacterium* spp. se répartit en six espèces

- *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend, 1907) Conn 1942, souches induisant la galle du collet ou (crown gall) sur une gamme d'hôtes très variée (De Cleene, 1985) ;
- *Agrobacterium rhizogenes* (Riker et al., 1930) Conn 1942, souches induisant la maladie du chevelu racinaire (hairy root) qui est caractérisée par une prolifération racinaire incontrôlée et abondante
- au point de l'infection (Kerr et Panagopoulos, 1977) ;
- *Agrobacterium rubi* (Hildebrand, 1940), souches induisant le cane gall, tumeurs se développant sur les tiges du genre *Rubus* ;
- *Agrobacterium vitis* (Ophel et Kerr, 1990) Conn 1942, est l'agent du crown gall de la vigne ;
- *Agrobacterium larrymorei* ou *Agrobacterium fici* (Bouzar et Jones, 2001), souches isolées des tumeurs se développant sur les tiges de *Ficus benjamina* L ;
- *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck et Van Denden, 1902), vivant en saprophyte dans le sol et la rhizosphère, c'est une espèce non pathogène.

I.3.2. Classification basée sur le plasmide Ti d'*Agrobacterium* spp.

La pathogénicité d'*Agrobacterium* est un processus unique et spécialisé incluant le transfert de l'information génétique entre la bactérie et la plante. L'élément génétique responsable du pouvoir pathogène chez *Agrobacterium* est un fragment d'ADN circulaire appelé : plasmide Ti qui code pour l'information génétique « Tumor inducing » (Braun, 1947). Ce plasmide inducteur du mécanisme de pathogénèse est désigné par le plasmide Ti ou pTi pour « Tumor inducing » chez *Agrobacterium tumefaciens* et plasmide Ri ou pRi pour « Root inducing » chez *Agrobacterium rhizogenes* (Moore et al., 1979). Ces plasmides sont conjugatifs et peuvent être acquis ou perdus. Ainsi, la perte ou l'acquisition de ce plasmide engendre la reclassification de la souche dans une autre espèce (Kersters et De Ley, 1984). C'est pourquoi, il était nécessaire de proposer une autre taxonomie plus stable.

I.3.3. Classification selon les caractères génotypiques et phénotypiques

L'analyse des caractères chromosomiques portés par l'ADN chromosomal (Chilton et al., 1980) et la comparaison des modèles électrophorétiques des protéines (Kersters et De Ley, 1975) ont montré que la plupart des membres du genre *Agrobacterium* sont groupés dans au moins, trois groupes (biovars) taxonomiques ne correspondant pas à la pathogénicité (Ruger et Hofle, 1992).

Le genre *Agrobacterium* spp. se compose au minimum de quatre taxa qui sont : *Agrobacterium tumefaciens* correspondant au biovar 1 (Bouzar, 1994) ; *Agrobacterium rhizogenes* correspondant au biovar 2 (Sawada et al., 1993) ; *Agrobacterium vitis* correspondant au biovar 3 (Ophel et Kerr, 1990) et *Agrobacterium rubi*. Les trois biovars 1, 2 et 3 qui étaient utilisés auparavant pour distinguer les subdivisions au sein de chaque espèce d'*Agrobacterium* (Bouzar et Jones, 2001) désigneront respectivement, *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* et *A. vitis* (Burr et al., 1987 ; Moore et al., 1988 ; Moore et al., 2001) (Tableau 1).

La taxonomie du genre *Agrobacterium* spp. est toujours en évolution. En 2001, Young et al., prenant la suite des travaux de Sawada et al., (1993), ont proposé de supprimer le genre *Agrobacterium* et d'inclure ces bactéries dans le genre *Rhizobium* car l'analyse dugène *rrs* montrait que les bactéries nommées alors *Agrobacterium* avaient une même origine phylogénétique. Farrand et al., en 2003, ont répondu que les bactéries du biovar 1 d'*Agrobacterium*, ainsi que les espèces *A. vitis* et *A. rubi*, formaient une entité cohérente dans la famille des Rhizobiacées. Ils proposent par conséquent de conserver le genre *Agrobacterium*.

En 1984, Popoff et al., ont effectué les hybridations ADN-ADN entre de nombreuses souches représentantes du genre *Agrobacterium*. Ces résultats montrent que les souches du biovar 1 se répartissent en 9 espèces génomiques distinctes. Par contre il est très difficile de les séparer selon des critères phénotypiques, sur des galeries Api ou Biolog, par exemple (Mougel et al., 2001). De plus, certaines espèces partagent la même séquence du gène *rrs*, c'est notamment le cas pour les espèces G6 et G8 ou encore G2 et G9 (Mougel et al., 2001).

Le polymorphisme de taille de fragments de restriction ou AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est à l'heure actuelle une des méthodes les plus prometteuses pour la taxonomie. Il s'agit, après une digestion du génome complet par une ou deux enzymes de restriction différentes, d'amplifier de façon sélective une partie des fragments obtenus (Vos et al., 1995 ; Blears et al., 1998). L'avantage de cette technique est qu'elle permet de calculer les divergences génomiques (Mougel et al., 2002). Il est donc possible, à partir de ces résultats, d'affilier ou non un isolat à une espèce connue. Il est possible ainsi de détecter des espèces potentiellement nouvelles.

L'analyse, par Mougel et al., en 2002, de plusieurs espèces appartenant au genre *Agrobacterium* spp. par AFLP, montre qu'il est possible de faire correspondre les valeurs d'hybridation ADN-ADN aux données AFLP. En effet, l'AFLP permet de calculer que les individus d'une même espèce présente une distance génomique évolutive de 10,5%. Ceci correspond à un taux de mésappariement moyen entre génomes de 13%.

La possibilité de calculer les distances génomiques évolutives, permet de substituer cette méthode à l'hybridation ADN-ADN et de joindre le concept d'espèce génomique et d'espèce évolutive.

Mougel et al., (2002), ont montré que le biovar 1 du genre *Agrobacterium* spp. se compose d'au moins neuf espèces génomiques G1- G9 en utilisant la méthode AFLP. However, rapid identification of these organisms in various biotopes is needed to elucidate crown gall epidemiology, as well as *Agrobacterium* ecology. For this purpose, the AFLP methodology provides rapid and unambiguous determination of the genomic species status of agrobacteria, as confirmed by additional DNA-DNA hybridizations. La méthodologie AFLP permet la détermination rapide et sans ambiguïté du statut génomique des espèces d'agrobactéries, comme la confirme l'hybridation supplémentaire ADN-ADN. The AFLP

method has been proven to be reliable and to eliminate the need for DNA-DNA hybridization. La méthode AFLP a prouvé sa fiabilité et a permis d'éliminer la nécessité d'hybridation ADN-ADN. Ces neuf In addition, AFLP fragments common to all members of the three major genomic species of agrobacteria, genomic species G1 (reference strain, strain TT111), G4 (reference strain, strain B6, the type strain of *Agrobacterium tumefaciens*), and G8 (reference strain, strain C58), have been identified, and these fragments facilitate analysis and show the applicability of the method. espèces génomiques n'ont pas encore reçu la validation du nom d'espèce.

Tableau 1 : Comparaison de l'ancienne et de la nouvelle nomenclature des espèces appartenant au genre *Agrobacterium* spp. (Moore et al., 2001)

Nouvelle taxonomie"	Ancienne taxonomie
A. tumefaciens A. rhizogenes A. vitis A. rubi	A. tumefaciens biovar 1 A. radiobacter biovar 1 A. rhizogenes biovar 1 A. tumefaciens biovar 2 A. radiobacter biovar 2 A. rhizogenes biovar 2 A. tumefaciens biovar 3 A. radiobacter biovar 3 A. rubi

Chaque souche dans chaque espèce peut être tumorigène, rhizogène ou nonpathogène.

I.4. Caractéristiques du plasmide Ti

La galle du collet est corrélée à la présence du plasmide Ti chez les bactéries du genre *Agrobacterium* spp. (Van Larebeke et al., 1974). Les racines adventives surnuméraires sont liées à la présence du plasmide Ri. Ces plasmides se disséminent dans la population bactérienne par transferts conjugatifs (Genetello et al., 1977).

Les agrobactéries sont attirées par des composés phénoliques (tel l'acétosyringone) libérés par les cellules végétales lorsqu'elles sont blessées (Stachel et al., 1985; Kado, 1991). Au niveau de cette blessure, la bactérie transfère à la plante une portion du plasmide Ti qui va ensuite s'intégrer dans le génome nucléaire de la plante (Chilton et al., 1977). Les gènes transférés à la plante induisent la biosynthèse par la plante d'hormones de croissance, ce qui provoque la tumeur. Un autre groupe de gènes induisent la synthèse d'opines, qui sont des composés azotés. Le plasmide Ti comporte aussi les gènes de catabolisme des opines. Ceux-ci ne sont pas transférés à la plante. Ils permettent à la bactérie d'utiliser ces composés comme source de nutriments. La tumeur issue de la plante transformée par la bactérie constitue une niche écologique (Zhu et al., 2000).

La carte génétique du plasmide Ti est constituée de cinq types de gènes (Zhu et al., 2000) (Figure 1) :

- La région T (ADN-T) ou T-DNA (Transferred DNA) Il s'agit du segment transféré à la plante. Cette région porte les gènes de production d'hormones végétales (auxine et cytokine) qui provoque la tumeur, et les gènes de production d'opines (OPS), qui seront utilisées comme source de carbone, d'azote et d'énergie par les agrobactéries vivant au voisinage de la tumeur.
- 1. La région de virulence (vir) Constituée d'un groupe de gènes qui permettent l'activation du transfert de l'ADN-T vers la plante. Cette région longue de 20 kb est

Pouvoir pathogène et performances de transformation de trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* in vitro et in planta sur quelques espèces d'eucalyptus

commune aux différents types de plasmides Ti. Elle comporte 20 gènes essentiels à l'induction de la tumeur chez l'hôte.

- Les locus *tra* et *trb*

Ces gènes sont impliqués dans le transfert conjugatif du plasmide. Ils sont activés par les opines.

- La région responsable de réplication (ORI)

Les trois gènes de cette région permettent une réplication stable du plasmide et sont impliqués dans les fonctions d'incompatibilité.

- La région responsable du catabolisme des opines (OPC)

Cette région porte une quarantaine de gènes permettant aux agrobactéries d'utiliser les opines spécifiquement synthétisées par la plante comme source de nutriments.

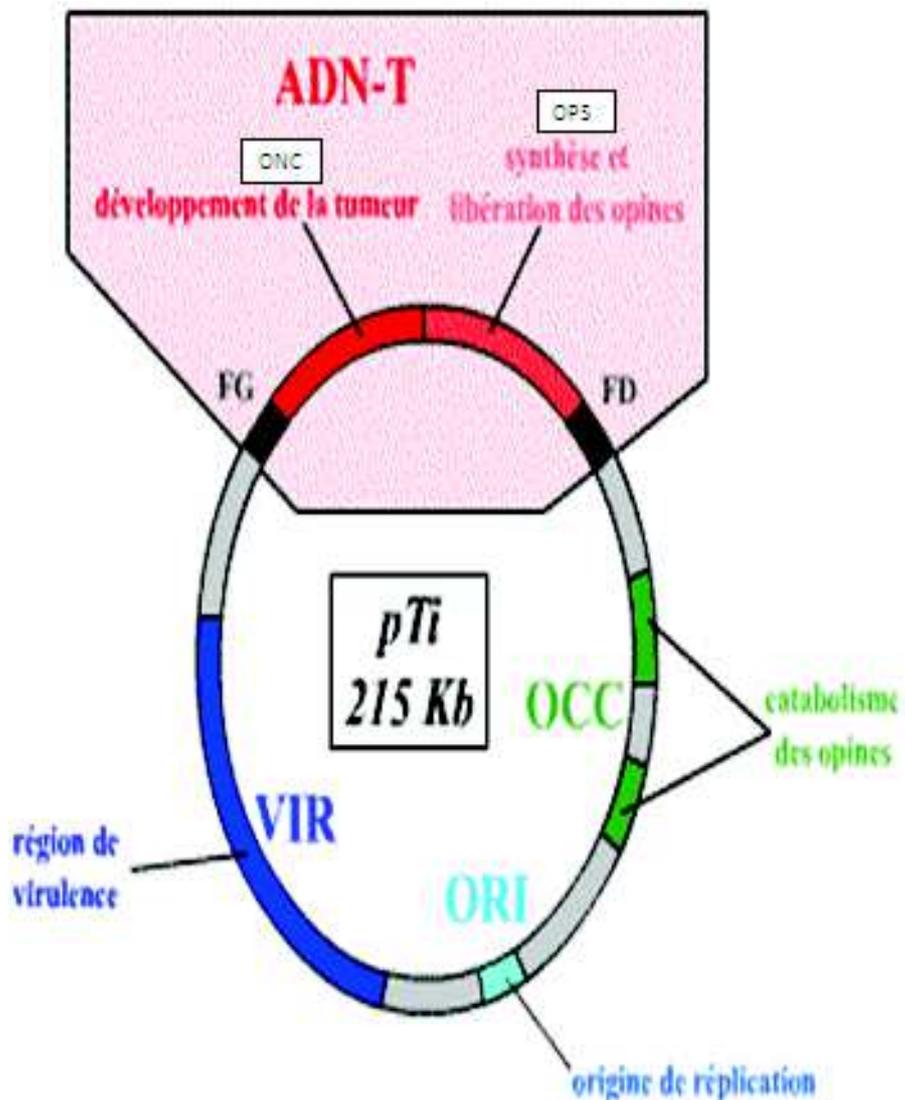


Figure 1 Carte génétique du plasmide Ti et de ses différentes régions géniques (Beijersbergen et Hooykaas, 1993).

I.5. Processus de pathogénèse

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie à Gram-négative vivant dans le sol. C'est un pathogène de différentes plantes dicotylédones qui provoque l'apparition de tumeurs cancéreuses au point de l'infection. Cette tumeur résulte de l'insertion d'un fragment d'ADN sous forme d'une nucléoprotéine importée par la bactérie dans le génome nucléaire des cellules infectées de la plante. Les cellules transformées génétiquement sont capables de biosynthétiser des composés dérivés des hydrocarbonates et des acides aminés appelés opines. Les opines sont métabolisés exclusivement par *Agrobacterium tumefaciens* comme source de carbone et d'azote.

Ainsi, *Agrobacterium tumefaciens* est un parasite qui se sert de la machinerie métabolique de la plante pour synthétiser le substrat qui lui permet de croître. Il n'apporte aucun effet bénéfique à la plante infectée. Plusieurs espèces d'*Agrobacterium tumefaciens* ont été découvertes. Bien qu'elles fassent synthétiser par la plante des types d'opines différents, les mécanismes cellulaires de l'infection restent les mêmes d'une souche à une autre.

Le pouvoir pathogène d'*Agrobacterium tumefaciens* est conféré à la présence d'un plasmide appelé pTi. Ce plasmide possède toutes les fonctions requises pour l'infection d'une cellule végétale. Néanmoins, certains gènes chromosomiaux d'*Agrobacterium tumefaciens* sont également impliqués dans le processus d'infection de la plante.

Le processus d'infection par *Agrobacterium tumefaciens* comporte quatre étapes essentielles (Figure 2).

- Activation du processus d'infection d'*Agrobacterium tumefaciens* ;
- Attachement de la bactérie à la cellule de plante ;
- Transfert et intégration du T-DNA dans le génome nucléaire de la cellule végétale infectée ;
- Expression des gènes portés par le T-DNA.

Les deux premières étapes sont indépendantes et simultanées.

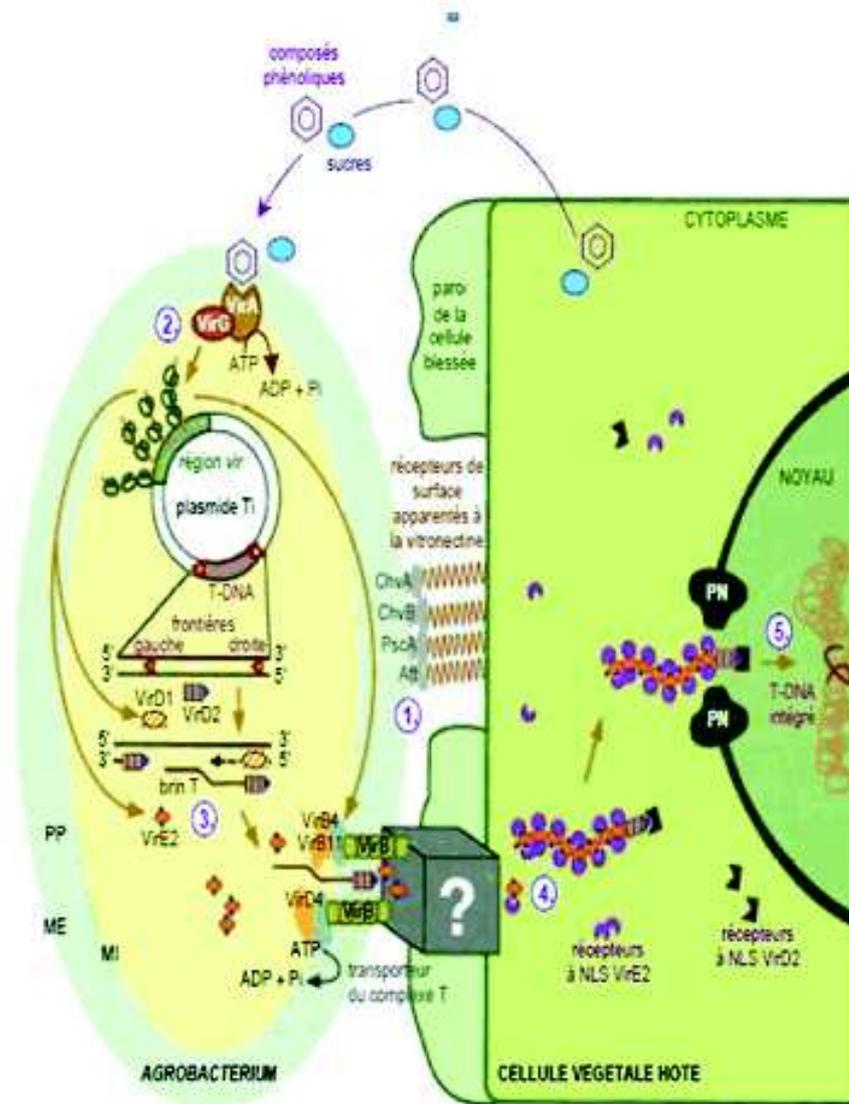


Figure 2 : Représentation schématique du processus d'infection par *Agrobacterium tumefaciens* (Sheng et Citovsky, 1996).

Légende:ME,membraneexterne;MI,membraneinterne;PN,porenucléaire; PP, périplasma.

I.5.1. Activation des gènes vir

L'activation du processus d'infection est régulée par les gènes *virA* et *virG* contenus dans le T-DNA et certains gènes chromosomaux : *chvE* et *acvF*. Les gènes *vir* sont activés par trois types de signaux chimiques que la plante relâche en cas de blessure :

- les composés phénoliques dérivés du syringol (le plus actif étant l'acétosyringone) ;
- les monosaccharides tels que le glucose et l'acide glucuronique ;
- et un pH acide.

I.5.1.1. Complexe VirA/VirG

VirA, qui aurait deux segments transmembranaires, est une protéine exprimée à la surface de la bactérie de manière constitutive (Leroux et *al.*, 1987). C'est une protéine kinase qui s'autophosphoryle lors d'une interaction directe entre un composé phénolique de type syringol présent en haute concentration dans le milieu extracellulaire et son domaine périplasmique (Lee et *al.*, 1995). Une fois phosphorylée, elle active la protéine cytoplasmique VirG par phosphorylation. Cette dernière déclenche l'expression des autres gènes *vir*, à savoir *virA*, *virB*, *virC*, *virD* et *virE*. *virA* active également la transcription de *virG* via un promoteur sensible à *virG* phosphorylée et à une carence en phosphate. La sélectivité sur les composés phénoliques de *virA* est très étroite et dépend du plasmide Ti (Lee et *al.*, 1996).

I.5.1.2. Complexe VirA/ChvE

Le deuxième mécanisme d'activation des gènes *vir* est pris en charge par ChvE qui est une protéine périplasmique chromosomale pouvant lier des monosaccharides. Elle est homologue aux galactose-binding proteins de *E. coli* (Doty et *al.*, 1993). Lorsque *chvE* est activée par son ligand, elle augmente la sensibilité de VirA aux composés phénoliques, permettant une activation de VirA en présence de faibles concentrations de ces composés. De plus, lorsque *chvE* est hautement exprimée dans *Agrobacterium tumefaciens*, la sélectivité de *virA* s'étend à d'autres composés phénoliques n'ayant normalement qu'un faible pouvoir inducteur des gènes *vir* (Peng et *al.*, 1998). ChvE aurait des caractéristiques différentes selon la souche d'*Agrobacterium tumefaciens*, permettant une association optimale avec VirA de la même lignée (Belanger et *al.*, 1997). ChvE interagit avec la partie périplasmique de VirA, au niveau d'un site différent du site de liaison des composés phénoliques sur VirA (Banta et *al.*, 1994). Le tandem ChvE/VirA est donc sensible à deux types de signaux chimiques : hautes concentrations en composés phénoliques spécifiques d'une part, faibles concentrations en composés phénoliques moins spécifiques en présence de sucres d'autre part.

I.5.1.3. Influence du pH extracellulaire

L'acidité du milieu externe est le troisième élément intervenant dans l'activation des gènes *vir*. Elle active l'expression de *virG* via une protéine chromosomale ChvI qui interagirait sur l'un des deux promoteurs de *virG*. L'action de ChvI n'est pas tout à fait confirmée (Mantis et Winans, 1993). Néanmoins, aucune protéine du plasmide Ti ne semble être impliquée dans l'activation de ce promoteur (Mantis et Winans, 1992).

I.5.2. Attachement d'*A. tumefaciens* à la cellule végétale blessée

L'adhésion de la bactérie sur les cellules de la plante est une étape essentielle dans le processus d'infection. En effet, pour pouvoir exporter son T-DNA dans le cytoplasme puis le noyau de la cellule végétale cible, la bactérie doit être capable de rester en contact avec la cellule végétale afin de créer et maintenir un tunnel reliant les deux membranes cellulaires. Les mutants d'*Agrobacterium tumefaciens* incapables de s'attacher aux cellules de plantes sont toujours avirulents. D'autre part, les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* avirulentes mais capables de s'attacher aux cellules de plantes peuvent inhiber la formation des tumeurs lorsqu'elles sont incubées avec une forme virulente d'*Agrobacterium tumefaciens* (Lippincott et Lippincott, 1969 ; Tanimoto et *al.*, 1979).

Agrobacterium tumefaciens possède plusieurs gènes codant des protéines impliquées dans l'adhésion plante-bactérie. Les expériences *in vitro* montrent que huit loci sont localisés

sur l'ADN chromosomal d'*Agrobacterium tumefaciens*. Ainsi, le T-DNA ne contiendrait aucun gène permettant l'adhésion avec les cellules de plantes. Aussi, l'incorporation du T-DNA dans un micro-organisme incapable de s'attacher sur les cellules de plantes résulte en un micro-organisme incapable d'initier des tumeurs engendrées par le T-DNA (Lippincott et Lippincott, 1969 ; Tanimoto et al., 1979).

La synthèse de deux types de composés serait impliquée dans la capacité d'*Agrobacterium tumefaciens* de s'accrocher sur les cellules de plantes. Le premier serait un β -1,2-glucane et serait excrété hors de la bactérie. Le rôle indispensable de ce polysaccharide normalement périplasmique est encore mal compris. Les loci *chvA*, *chvB* (Douglas et al., 1985) et *exoC* (Cangelosi et al., 1987) sont responsables de sa synthèse. Le deuxième composé impliqué est un polysaccharide de type cellulose dont le rôle serait de stabiliser l'adhésion bactérie-plante une fois qu'elle a été initiée (Mathysse, 1983 ; Mathysse et McMahan, 1998). Le locus *cel* serait responsable de la synthèse de ce composé.

D'autres loci sont impliqués dans l'adhésion de la bactérie sur les cellules végétales. Les loci *attB*, *attD*, *attE* et *attR* auraient des similitudes avec des transporteurs activés par liaison avec des protéines périplasmiques rencontrés dans les bactéries gram-négatives.

Agrobacterium tumefaciens a pour cible les parois cellulaires des cellules végétales contenant de la pectine. Ceci est confirmé par le fait que :

La pectine ajoutée seule n'inhibe pas l'adhésion d'*Agrobacterium tumefaciens* sur des cellules en suspension de carotte (Mathysse et Gurlitz, 1982). L'importance de la paroi cellulaire végétale est confirmée par le fait que la régénération de la paroi cellulaire de protoplastes de tabac est nécessaire pour l'adhésion d'*Agrobacterium tumefaciens* et la transformation des protoplastes (Krenset al., 1985).

1.5.3. Insertion et transport du T-DNA

1.5.3.1. Préparation pour le transfert du T-DNA

Le T-DNA est exporté sous forme d'un simple brin dans le noyau de la cellule végétale cible. Les protéines *VirD1* et *VirD2* sont des endonucléases spécifiques qui reconnaissent les bords du T-DNA (séquences spécifiques de 25 paires de bases) ainsi que le brin qui sera exporté et l'excisent. *VirD2* s'attache de manière covalente sur l'extrémité 5' du simple brin du T-DNA. Le brin de T-DNA est recouvert par plusieurs copies (environ 600) de la protéine *VirE2*, ce qui permettrait la protection du T-DNA contre les nucléases de la cellule végétale cible (Howard et Citovsky, 1990). Les protéines *VirE1* stabilisent les protéines *VirE2* (Citovsky et al., 1992 ; Sundberget al., 1996). L'ensemble *VirD2*, *VirE2* et T-DNA simple brin constitue le "complexe T".

Des résultats récents suggèrent que les protéines *VirE2* sont exportées séparément du T-DNA vers la cellule végétale (Lee et al., 1999). On suppose que les protéines *VirE2* et *VirD2* sont aussi responsables de l'adressage du T-DNA vers le noyau, à travers les pores nucléaires. *VirD2* aurait la structure d'une topoisomérase.

1.5.3.2. Transport du T-DNA

Les protéines *VirB* (11 protéines produites par l'opéron *virB*) ainsi que *VirD4* serviraient de canal entre la bactérie et la cellule végétale cible. *VirB1* serait la seule des protéines *VirB* qui ne soit pas indispensable pour le transfert du T-DNA.

De nombreuses études comparent le système de transfert du T-DNA d'*Agrobacterium tumefaciens* avec le système de conjugaison du plasmide F de *E. coli*, régulé par les gènes tra qui permettent l'établissement d'un tunnel entre la cellule hôte possédant le plasmide et une cellule cible dépourvue du plasmide. Ce "tunnel" est formé par un pilus par lequel transite le plasmide.

Dans le cas d'*Agrobacterium tumefaciens*, la protéine VirB2 serait la composante essentielle du pilus qu'*Agrobacterium tumefaciens* forme pour se connecter sur la cellule végétale cible. La structure prédite de virB2 est la même que TraA, impliquée dans la conjugaison du plasmide F de *E. coli*. virB2, virB3 et virB9 sont impliquées dans la synthèse du pilus de conjugaison (Jones et al., 1996). L'exportation de VirB2 nécessiterait l'action d'autres protéines Vir (Lai et Kado, 1998). VirB1, située sur la membrane interne d'*Agrobacterium tumefaciens* et ayant une structure N-terminale similaire aux transglycosidases bactériennes, serait responsable de la lyse locale de la paroi cellulaire de la bactérie, permettant la formation du pilus (Baron et al., 1997). VirB1 est aussi responsable de la synthèse d'un propilin, impliqué dans le contact initial avec la cellule cible, par l'assemblage de protéines VirB1*, sécrété dans le milieu de culture (Baron et al., 1997 ; Chumakov et Kurbanova, 1998). La protéine chromosomale AcvB joue un rôle essentiel dans le transfert du plasmide, mais ce rôle pourrait être remplacé par VirJ, régulé par l'acétylsyringone (Pan et al., 1995). VirB8 est située sur la membrane interne d'*Agrobacterium tumefaciens* (Thorstenson et Zambryski, 1994).

I.5.4. Intégration dans le génome végétal et expression

Le plasmide est exporté dans la cellule végétale sous forme d'un simple brin. Il n'est pas encore clair si ce simple brin est complété en double brin puis intégré au sein du génome de la plante ou le simple brin est d'abord intégré dans le génome puis le brin complémentaire est synthétisé avec les mécanismes de réparation de l'ADN de la plante. De nombreux résultats suggèrent que les protéines VirD2 participent dans l'intégration du T-DNA dans le génome de la plante (Zhuet al., 2000). VirE2 semble également y jouer un rôle indirect, car les mutations sur virE2 donnent des souches d'*Agrobacterium* dont la virulence est très atténuée (Dombek et Ream, 1997).

Une fois intégré dans le génome de la plante, l'ADN-T est exprimé. Les phytohormones produites déséquilibrent la croissance normale des cellules qui se divisent alors de façon anarchique. Des travaux sur le crown gall ont permis de comprendre que la synthèse de ces produits est régulée par les gènes de la fonction OPS (opine synthèse) portés sur la portion T-DNA intégrée (Dessaux et al., 1993).

L'environnement formé sera riche pour les agrobactéries qui sont les seules à pouvoir métaboliser les opines synthétisées par la cellule transformée. *A. tumefaciens* détient alors un avantage sélectif sur les autres microorganismes du sol et persistera dans les tumeurs (Ogawa et al., 2000).

I.6. Dégâts provoqués par la maladie du crown gall

Le crown gall est la maladie prédominante la plus rencontrée dans les pépinières d'arbres fruitiers, de plantes ornementales, de la vigne et d'arbres forestiers dans plusieurs régions du monde affectant fortement le rendement commercial (Poncet et al., 1996 ; Burr et al., 1999 ; Zoina et al., 2001 ; Krimi et al., 2006).

Les maladies causées par les souches pathogènes d'Agrobacterium spp. réduisent fortement la rentabilité économique de la production des plants fruitiers, forestiers et ornementaux dans toutes les pépinières du monde. Les tumeurs qui se forment sur les différentes parties des plantes affaiblissent leur qualité esthétique si elles n'entraînent pas leur mort. En l'occurrence, le crown gall engendre une importante perte économique au niveau des pépinières du fait que la commercialisation des plants malades n'est pas autorisée et les plants atteints doivent être impérativement incinérés (Zoina et Raio, 1999).

I.7. Le contrôle de la maladie

Une fois la plante transformée, la tumeur se développe même si la bactérie n'est plus présente. Les techniques pour contrôler la maladie sont donc surtout préventives. La prévention de la galle du collet passe par un contrôle de l'état sanitaire des plantes.

I.7.1. Lutte préventive et culturale

La lutte culturale et les mesures préventives assurent une réduction importante de la maladie, il est préconisé d'utiliser des plants exempts de tumeur, une inspection minutieuse des plants est essentielle afin de détecter la moindre tumeur. Dans un tel cas, il faut détruire les plants présentant de tels symptômes.

Le matériel de plantation et de greffage doit être obtenu à partir de plantes indemnes ainsi que l'utilisation des variétés ou d'espèces résistantes ou peu sensibles au crown gall (Lacroix, 2003).

I.7.2. La lutte chimique

La lutte chimique fait appel à l'utilisation de désinfectant tel que l'hypochlorite de sodium, d'antibiotique et la fumigation du sol. L'hypochlorite de sodium à 0,5 % est un traitement de désinfection qui ne tue les bactéries qu'à la surface du matériel végétal. Le sulfate de streptomycine, la streptomycine et l'oxytetracycline sont des antibiotiques recommandés mais qui doivent être utilisés avec précaution en raison de leur éventuelle phytotoxicité. En outre, les agrobactéries sont peu sensibles aux antibiotiques industriels (Anonyme, 1989).

I.7.3. La lutte génétique

Pour parvenir à une meilleure protection contre la galle du collet, une méthode prometteuse a été développée. Les plantes sensibles aux souches pathogènes d'Agrobacterium ont été modifiées pour reconnaître la transformation génétique causée par les bactéries et sont ainsi capables de réagir. La prolifération des gènes bactériens provoquant la tumeur est réprimée de manière active « gène silencing » (Escobar et al., 2001), et les plantes deviennent ainsi résistantes. La technique a déjà été testée expérimentalement avec succès sur les plants de pommier (Viss et al., 2003) et promet des résultats positifs avec d'autres espèces.

I.7.4. La lutte physique

La solarisation est une technique efficace qui consiste à couvrir le sol durant la période chaude de l'année par une bâche en plastique transparent (Katan et al., 1976 ; Katan, 1980 ; Stapleton et De Vay, 1986). Les modifications chimiques, physiques et biologiques se produisent sous le plastique en raison de la température élevée du sol, ont entraîné dans plusieurs essais une importante réduction des microorganismes phytopathogènes (Katan et De Vay, 1991).

I.7.5. La lutte biologique

La souche d'Agrobactérium radiobacter K84 (Moore, 1979) constitue une méthode de lutte exceptionnelle contre la galle du collet. Cette souche protège les blessures des racines contre l'infection par d'Agrobactérium tumefaciens et cela par l'antibiotique (Agrocine 84) qu'elle produit et qui présente une toxicité spécifique contre les souches tumorigènes d'Agrobactérium tumefaciens (Farrand et al., 1987).

En Algérie, l'utilisation de la souche K84 expérimentalement en plein champ dans le cadre d'une lutte biologique s'est révélée très efficace. Un taux d'efficacité de l'ordre de 94% a été atteint après contrôle de plants de pêcher testés sous conditions naturelles (Krimi, 1990).

I.8. Détection des Agro-bacterium spp. pathogènes

Différentes techniques existent pour détecter les microorganismes dans des milieux complexes tels que le sol et la plante. Les plus couramment utilisées sont l'isolement, suivi de l'identification de ces micro-organismes. La sérologie a également été développée ainsi que la détection de séquences nucléotidiques. Le piégeage par plante peut également être utilisé pour les bactéries telluriques présentant des interactions avec les végétaux.

Dans le cas particulier des agrobactéries, la détection des pathogènes revient en fait à détecter le plasmide Ti. En effet, comme nous l'avons vu plus haut, le pouvoir pathogène d'Agrobacterium est codé par le plasmide Ti qui peut, par conjugaison, être transféré à des souches non pathogènes (Ream, 1989). Le pTi est donc bien le principal élément pathogène à identifier.

Détection d' Ag r o-ba c t e r i u m s p p . P a t h o g è n e s p a r i n o c u l a t i o n d e s p l a n t e s - h ô t e s e t v é r i f i c a t i o n d u P o s t u l a t d e K o c h

L'inoculation consiste à mettre en contact une plante-hôte sensible et un agent pathogène, dans des conditions d'environnement (t°, HR) favorables à l'infection.

Robert Koch énonça en 1881 un postulat qui précise les étapes successives auxquelles il doit être satisfait pour pouvoir établir une relation causale entre une maladie et un microorganisme. Bien que ce postulat ait été formulé pour des maladies infectieuses de l'homme, il peut être transposé aux maladies des végétaux causées par des parasites cellulaires cultivables in vitro. L'application stricte du postulat de Koch sera réservée aux cas complexes (Kummert et Lepoivre, 2003).

Les étapes du postulat de Koch appliqué à la phytopathologie s'énoncent comme suit :

L'agent doit être présent chez les plantes malades, et absent chez les plantes saines; L'agent doit pouvoir être isolé de plantes malades et multiplié en culture axénique; Lorsque l'agent en culture pure est inoculé à une plante saine, il doit induire les symptômes caractéristiques de la maladie ; On doit pouvoir réisoler l'agent initial à partir des plantes infectées expérimentalement.

Le postulat de Koch fait appel à un ensemble de techniques d'observation (microscopie), nécessaires pour la détection et l'identification du parasite in situ, d'isolement de l'agent pathogène à partir des tissus de l'hôte, ainsi que de méthodes de production de l'inoculum en culture pure et d'inoculation des plantes-hôtes en laboratoire. Dans la pratique, le diagnostic de beaucoup de maladies classiques n'exige pas la réalisation complète du postulat de Koch ; selon les cas, on s'arrêtera à l'observation des agents ou à leur isolement.

I.9. La transformation génétique chez les végétaux supérieurs

La transformation génétique chez les végétaux a pour objectif l'introduction, l'insertion et l'expression de nouveaux caractères (ou la suppression de caractères) dans le génome des cellules végétales par d'autres moyens que la fusion de gamètes (Birch, 1997). La première transformation génétique des plantes date de 1983 (Herrera-Estrella et al., 1983). Depuis, les différentes technologies se sont développées et peuvent être classées en deux grandes méthodes : les méthodes directes et les méthodes indirectes.

I.9.1. Les méthodes de transferts directs

I.9.1.1. Par biolistique / agrolistique

La biolistique a été initialement mise au point avec l'objectif de transformer génétiquement les plantes monocotylédones. En effet, ces dernières sont plus difficilement transformables par *Agrobacterium* que les dicotylédones.

La biolistique ou bombardement de particules est une technique utilisant des particules micronisées de métal sur lesquelles l'ADN à transférer est adsorbé. Elles vont ensuite être accélérées avec une vitesse suffisante pour pénétrer la cellule sans lui causer de dommage létal (Klein et al., 1987 ; Sanford, 1988 ; Rech et al., 2008). Les avantages de la biolistique sont la possibilité de co- transformation avec des transgènes multiples, l'intégration de grands fragments d'ADN (YAC) (Mullen et al., 1998) et l'intégration de matériel génétique dans les organelles (Maliga, 2002).

L'agrolistique combine les avantages de la transformation par *Agrobacterium* et la haute efficacité de transformation de la biolistique (Hansen et Chilton, 1996). La séquence du gène que l'on veut insérer est flanquée par les bordures droite et gauche de l'ADN-T. Cela aura pour conséquence une meilleure efficacité de recombinaison du fragment d'ADN exogène à l'ADN endogène.

I.9.1.2. Par micro-injection

C'est une technique permettant le transfert d'organites subcellulaires et de l'ADN dans des protoplastes via une injection réalisée par une microseringue. On obtient une efficacité de transformation de l'ordre de 15 à 20% (Crossway et al., 1986 ; Holm et al., 2000).

I.9.1.3. Par électroporation

L'électroporation de protoplastes et de cellules intègres (Fromm et al., 1985 1986 ; Arencibia et al., 1995) est une technique basée sur la capacité d'une macromolécule (fragment d'ADN) présente dans le milieu extracellulaire d'être internalisée par une cellule vivante suite à un bref choc électrique (Neumann et al., 1982).

I.9.1.4. Par lipofection

La lipofection de protoplastes est une technique basée sur la capacité qu'ont deux membranes biologiques à fusionner. Le fragment d'ADN que l'on veut transférer se trouve dans des liposomes artificiels qui vont fusionner à la membrane cellulaire de protoplastes. Ce fragment d'ADN se trouve alors dans le cytosol (Felgner et Lingold, 1989 ; Zhen et al., 1994 ; Patrick et al., 1999).

I.9.2. Les méthodes de transferts indirects

Les méthodes de transfert indirect utilisent des agents pathogènes qui ont la capacité de transférer tout ou partie de leur génome, telles certaines agrobactéries (Tourte, 2001).

Les agrobactéries utilisées pour la transformation génétique de plantes sont majoritairement *Agrobacterium tumefaciens*, responsable de la galle du collet ou crown gall ou *Agrobacterium rhizogenes*, responsable de la prolifération anarchique du chevelu racinaire ou hairyroots. (Tourte, 2001).

Les *Agrobacterium* sont des bactéries vivant à l'état saprophytique dans la rhizosphère de nombreuses plantes. La présence d'un gros plasmide appelé plasmide Ti (pour tumor inducing) différencie les *Agrobacterium* pathogènes des non pathogènes. La plupart des *Agrobacterium* pathogènes isolées sont capables d'induire par inoculation des tumeurs sur une vaste gamme de dicotylédones et quelques monocotylédones. Cependant, la sensibilité des plantes d'une part, et la virulence des souches, d'autre part, sont extrêmement variables. Ainsi, certaines variétés d'une même espèce végétale montrent des degrés différents de sensibilité à la même souche d'*Agrobacterium* (Stomp et al., 1990).

L'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* présente certains avantages sur les méthodes directes. En effet, le nombre de copies du transgène transféré à la plante est réduit, ce qui diminue le risque potentiel de co-suppression et d'instabilité du transgène (Hansen et al., 1997). De plus, c'est un système où une cellule unique est transformée, ce qui évite ainsi l'obtention de plantes chimères comme c'est très souvent le cas en transformation directe (Enriquez-Obregon et al., 1997 ; Enriquez-Obregon et al., 1998). Et enfin, le transgène est souvent inséré dans des régions de l'ADN transcriptionnellement actives.

I.10. Utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* pour la transformation génétique des plantes

Agrobacterium tumefaciens est devenu un outil permettant la transformation génétique de végétaux avant même que les mécanismes moléculaires permettant ce transfert d'information génétique soient totalement connus. L'ADN-T ne contient pas de gènes indispensables au mécanisme de transformation génétique, mais seulement les oncogènes et les gènes de synthèse d'opines. Le fait de remplacer ces gènes par des gènes d'intérêt sous contrôle de promoteurs (constitutifs ou non) permet de maintenir le processus de transformation génétique, tout en enlevant les effets tumorigènes indésirables. Un plasmide Ti dans lequel on a remplacé les oncogènes par des gènes d'intérêt, est appelé plasmide Ti désarmé (Tourte, 2001).

Afin d'utiliser *Agrobacterium tumefaciens* comme vecteur pour la transformation génétique des végétaux, différents systèmes ont été mis en place.

La taille des séquences d'ADN transférables sans modification peut atteindre 150 Kb grâce au vecteur BIBAC (Hamilton et al., 1996). La construction de plasmides Ti synthétiques beaucoup plus petits (environ 10 Kb) que le plasmide Ti naturel (180Kb) a conféré un grand avantage à cette technique de transformation génétique. Deux systèmes ont été développés : le système de co-intégration et le système binaire (Tourte, 2001) (Figure 3).

I.10.1. Le système de co-intégration

Le système de co-intégration est basé sur la recombinaison de deux plasmides, et le but est d'obtenir un plasmide comportant à la fois la région vir et l'ADN-T. Par conjugaison

bactérienne, le plasmide portant le gène d'intérêt est transféré au sein de l'ADN-T contenu dans *E. coli*, vers *A. tumefaciens* qui renferme le plasmide contenant les gènes vir. Les deux plasmides se recombinent grâce à une région homologe pour former le plasmide final (Tourte, 2001).

I.10.2. Le système binaire

Dans le système binaire, il va y avoir séparation physique des gènes vir de l'ADN-T. A l'état naturel ces deux régions sont situées sur le même plasmide, mais elles peuvent toutefois agir en trans. Comme pour le système de co-intégration, l'ADN-T est contenu dans une bactérie *E. coli*, le plasmide portant les gènes de virulence est contenu dans une bactérie *A. tumefaciens*, mais il n'y a pas de recombinaison entre eux. Généralement, on utilise un troisième plasmide dit "helper" contenu dans une autre bactérie *E. coli*, qui ne peut pas se répliquer chez *A. tumefaciens* et qui augmente le taux de transfert par conjugaison. Le plasmide "helper" améliore l'efficacité de conjugaison sous l'action de ses protéines Tra et Mob (pour transfer et mobilization), codées respectivement par les gènes tra et mob (Tourte, 2001).

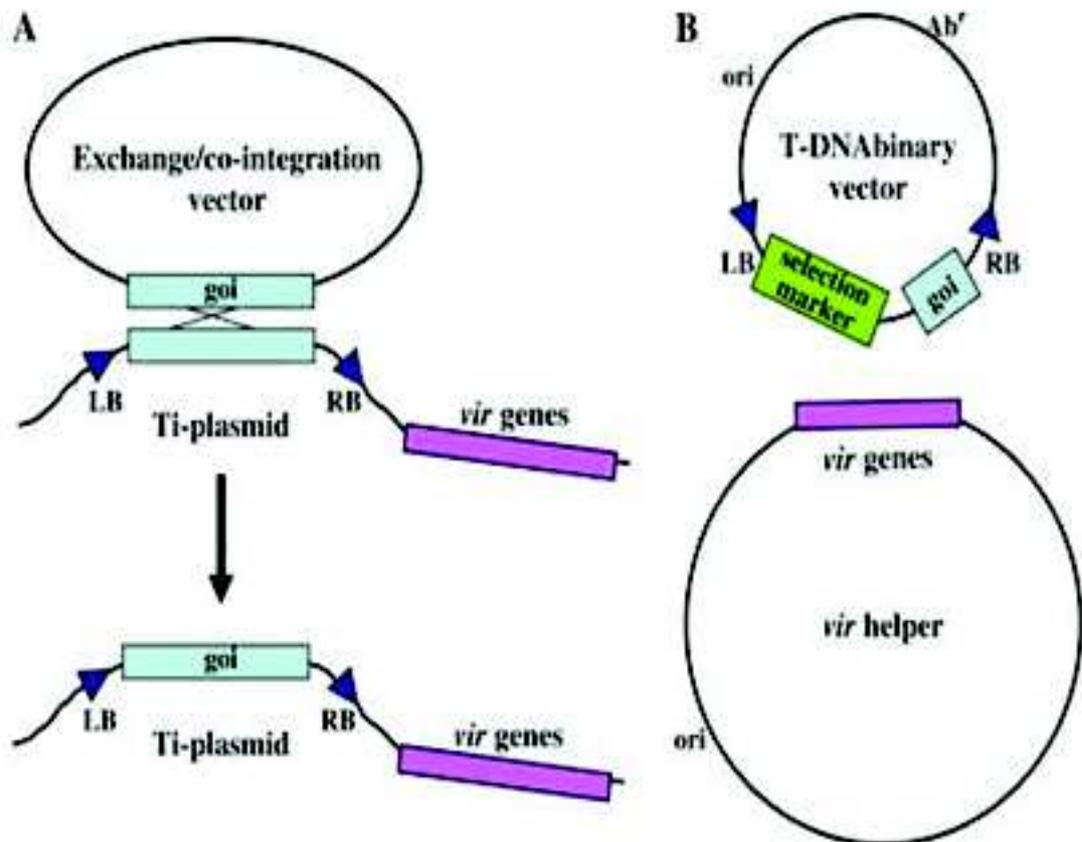


Figure 3: Schéma représentatif des deux systèmes de transformation génétique via *Agrobacterium tumefaciens*: A-système de co-intégration, B-système binaire (Tourte, 2001).

I.10.3. Diversité des souches d'*Agrobacterium* spp. Utilisées dans la transformation génétique des plantes

Un certain nombre de souches d'*Agrobacterium* spp. ont été utilisés comme outils pour la transformation des plantes et par la même, différents protocoles d'optimisation de la transgénése chez diverses espèces végétales ont été décrits. Les souches les plus communes sont :

La souche LBA 4404

La souche LBA4404 (Hoekema et al., 1983) qui héberge le plasmide Ti à octopine (pTiAch5) est utilisée pour la transformation des disques foliaires de tabac et d'*Arabidopsis thaliana*. Elle contient le gène de résistance à la Rifampicine.

La souche EHA 105

La souche EHA 105 (Hood et al., 1993) est une souche ultra virulente dérivée de la souche EHA 101 qui possède un plasmide Ti à nopaline et leucinopine. Elle est utilisée pour la transformation des cellules de vigne, récalcitrante à la transformation.

La souche C58C1RifR (pGV2260)

La souche C58C1RifR (pGV2260)(Deblaere et al., 1985) désarmée est utilisée comme vecteur de transformation génétique. Le gène de résistance à la rifampicine est porté par le chromosome bactérien. Le plasmide pGV2260 est un vecteur désarmé qui porte les gènes de virulence nécessaires à l'infection des plantes, ainsi que le gène de résistance à la carbénicilline.

La souche C58C1 (pMP90)

La souche C58C1 (pMP90) (Koncz et al., 1984) a été utilisée pour la transformation des plantes. Cette souche dérive de la souche sauvage C58. Elle possède un gène de résistance à la rifampicine.

II. Généralités sur le genre *Eucalyptus* spp.

II.1. Classification

Les eucalyptus sont des angiospermes dicotylédones de la famille des Myrtacées. La principale classification est celle de Pryor et Johnson (Pryor et Johnson, 1971) qui définit sept sous-genres : *Corymbia*, *Blakella*, *Eudesmia*, *Gaubaea*, *Idiogenes*, *Monocalyptus* et *Symphyomyrtus*. Un huitième sous-genre (*Telocalyptus*) a été suggéré par (Johnson, 1976). Plus récemment, les sous-genres *Corymbia* et *Blakella* ont été formellement séparés du reste des eucalyptus et placés dans un nouveau genre *Corymbia* (Hill et Johnson, 1995). Actuellement, les eucalyptus sont répartis dans les genres *Eucalyptus*, *Corymbia* et *Angophora*. Le genre *Eucalyptus* spp. comprend principalement les sous-genres des *Symphyomyrtus* et des *Monocalyptus* qui contiennent la plupart des espèces cultivées.

D'après la classification APG (Angiosperms Phylogeny Group) (Guignard, 2001), le genre *Eucalyptus* spp. appartient à :

Embranchement : Phanérogames

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Sous classe : Rosids- Eurosids II

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : *Eucalyptus* spp.

II.2. Origine et aire de répartition

L'eucalyptus de la famille des myrtacées est originaire d'Australie, il constitue la majeure partie de la flore forestière (Perron, 1981). Ce genre compte plus de 700 espèces et plusieurs centaines de variétés, quelques-unes ont été introduites dans la deuxième moitié du XIX siècle en région méditerranéenne, en Californie, en Amérique du sud et dans de nombreuses régions tropicales, pour assécher les terrains marécageux en raison de leur vitesse de développement très rapide (Bouvet, 1999).

En Algérie, l'eucalyptus a été introduit pendant la période coloniale dans le but d'assécher la Mitidja et d'évacuer les marécages constituant des causes essentielles des maladies d'origine hydrique (Poupon, 1972 ; Méziane, 1996).

II.3. Description botanique

Le mot « eucalyptus » vient du grec eu, « bon » et kalyptos, « couvrir », car les pétales et sépales sont soudés. L'autre nom est « gommier » qui fait allusion à la gomme résineuse rouge que les arbres exsudent quand ils sont blessés. Son habitat consiste en général en des sols acides et humides (Jacobs, 1982).

Un dimorphisme foliaire existe chez les eucalyptus. En effet, les jeunes feuilles de plantes issues de semis ou des rejets et les branches basses sont différentes des feuilles adultes. Les feuilles juvéniles sont plutôt arrondies alors que les feuilles adultes sont plutôt longues et effilées selon les espèces. La principale caractéristique physiologique est la persistance des feuilles. L'écorce des arbres de nombreuses espèces est lisse et s'exfolie ou se détache par plaques (Penfold et Willis, 1961).

L'inflorescence des eucalyptus est en général sous forme d'ombelles. Les fleurs n'ont pas de pétales, mais un opercule qui protège les nombreuses étamines et s'éjecte quand la fleur est prête à recevoir les insectes. Le fruit est une capsule lignifiée qui est mûre au bout d'un an. Elle contient des graines en général petites qui sont dispersées par le vent (Boland et Sedgley, 1986 ; Sedgley et al., 1989).

Le port des eucalyptus est très varié. Pour une même espèce, les formes peuvent aller du buisson si les conditions édaphiques et climatiques sont défavorables, au peuplement forestier avec des arbres de hauteur de 30 à 50 mètres en conditions favorables. Certains individus d'*Eucalyptus regnans* peuvent atteindre 100 mètres de haut et ils constituent également les angiospermes les plus grands du monde. Certaines espèces existent également sous forme de « mallee », terme australien qui désigne un arbre présentant plusieurs tiges partant d'un même lignotuber ou organe souterrain lignifié (Hignard, 1998).

Présent chez la plupart des espèces, le lignotuber est riche en réserves et comprend de nombreux bourgeons végétatifs. Il permet à la plante de régénérer des tiges si la partie aérienne de l'arbre est détruite par le feu, le gel ou la récolte. Cette particularité constitue une première adaptation des eucalyptus aux principaux stress abiotiques et aux incendies dans leur aire de répartition d'origine (James, 1984).

La croissance des eucalyptus est continue car ils n'ont pas d'endodormance contrairement à la plupart des espèces ligneuses. Ils sont opportunistes, c'est-à-dire que leur croissance dépend essentiellement de la température moyenne. Elle est maximale en conditions favorables mais ralentie voire nulle en conditions de stress abiotiques tels que le froid ou la sécheresse (Moreshet, 1981).

Par contre les eucalyptus sont très réactifs après les stress. D'une part, les bourgeons végétatifs épéricormiques activés très rapidement après blessure donnent de nouvelles tiges. Dans le cas des incendies, la très forte température de l'incendie favorise la germination des graines enfouies dans le sol, permettant une reprise de végétation beaucoup plus rapide que la plupart des autres plantes. Cette réactivité explique la compétitivité des eucalyptus pour l'occupation de l'espace, en particulier après les incendies, qui ont toujours été très fréquents en Australie (Pryor, 1976).

II.4. Mode de reproduction

La majorité des espèces d'eucalyptus présentent un nombre de chromosomes de $2n = 22$. Les fleurs sont hermaphrodites, les organes mâles et femelles se trouvent dans la même fleur. L'âge de maturité oscille selon les espèces de 3 à 10 ans, mais un décalage de floraison existe entre les différentes unités génétiques (individus, provenances, espèces). La pollinisation est principalement entomophile ou réalisée par les oiseaux pour les espèces à grandes fleurs (Hopper et Moran, 1981), ce qui favorise dans ce dernier cas l'hybridation inter-spécifique. La distance de dispersion du pollen est généralement inférieure à 100 mètres (Eldridge et al., 1993).

L'allogamie préférentielle est favorisée par différents mécanismes dont la Protandrie (maturation décalée du stigmate et du pollen), mais aussi l'incompatibilité du tube pollinique et du stigmate, la stérilité mâle et par un mécanisme génétique de contrôle d'incompatibilité (Pryor, 1976). Cependant, il existe une part non négligeable d'autogamie lors de la fécondation. Dans les conditions naturelles, le taux d'allofécondation moyen est estimé à 75 % avec des variations comprises entre 60 et 90 % (Moran et al., 1989). L'autofécondation produit des graines peu viables avec des taux de germination réduits et une croissance plus lente. Les arbres très consanguins sont éliminés simplement par concurrence avec les autres arbres. Des formes anormales plus ou moins létales, appelées « dwarfs » ou naines sont parfois observées, mais sans être obligatoirement reliées à la consanguinité (Arbez et Lacaze, 1999).

II.5. Exigences générales

II.5.1. Climats

On rencontre en général l'eucalyptus dans des pays à climats chauds, et même tropicaux, d'autres exigent des conditions météorologiques très variables : soit en haute montagne (Alpes Australiennes), soit dans d'autres régions très froides avec des hivers rigoureux où il n'est pas rare que les températures descendent, pendant de longues périodes en dessous du zéro degré (Louerguoui, 1988).

En général, l'eucalyptus ne supporte pas les basses températures. Il est conseillé d'éviter les plantations d'eucalyptus dans des régions où les températures peuvent descendre en dessous de 4° C.

II.5.2. Substrat et nutrition

L'eucalyptus n'est pas exigeant, il préfère les sols argileux, granitiques, argilo-calcaires et même parfois calcaires. Il se contente de terrains pauvres mais profonds (Louerguioui, 1988).

II.6. Intérêts et utilisation

Les eucalyptus revêtent une importance considérable à l'échelle de l'économie forestière mondiale (Lanier, 1986). Ils ont bien démontré une capacité de production assez supérieure à celle enregistrée en Australie (Metro, 1963). Les eucalyptus présentent incontestablement les plus importantes plantations du bois dur dans le monde (Turubull, 1991). Doté d'une grande adaptabilité et d'une croissance rapide, l'eucalyptus présente un large éventail d'utilisation. En réalité, ce sont les besoins créés par la deuxième guerre mondiale qui ont montré les recherches sur l'utilisation d'eucalyptus pour la production de cellulose industrielle et la fabrication de papier de qualité supérieure et de toute catégorie.

Aujourd'hui, les possibilités d'utilisation du bois d'eucalyptus pour la fabrication du papier, soulèvent un intérêt considérable. Les pâtes d'eucalyptus sont infiniment plus utiles dans la fabrication du papier que les pâtes ordinaires de bois dur puisqu'elles servent à améliorer la résistance du papier à la perforation et à la traction (Campinhos, 1999).

Les eucalyptus, grâce à sa croissance rapide et sa taille imposante, forment rapidement une haie protectrice, préservant le verger des vents froids ou chauds qui risquent de causer d'importants dommages aux récoltes (Yossi et al., 2006).

Grâce aux puissantes émanations de ses feuilles et à sa capacité de pomper d'impressionnantes quantités d'eau, l'eucalyptus est utilisé également pour assainir les marais, ce qui a permis de réduire la reproduction des insectes (Poupon, 1968).

Les eucalyptus sont aussi extrêmement intéressants pour leurs tanins, résines et même huiles essentielles que renferment les feuilles, les tiges et même l'écorce et qui ont des applications très importantes en médecine (Kajangwe et Mukarusine, 2001).

II.7. La culture de l'eucalyptus

II.7.1. Culture en pépinière

Les eucalyptus ont une importance considérable à l'échelle forestière mondiale (Lanier, 1986). Plusieurs pépinières s'intéressent à la production de plants de reboisement. L'eucalyptus demande certaines connaissances dans ce domaine :

La sélection des graines et des espèces se fait en fonction des qualités propres à chaque espèce, telles qu'une croissance rapide, une qualité du bois, un port décoratif (espaces verts, environnement), une richesse en essence et autres produits, un développement des racines important et une résistance au feu (Louerguioui, 1988).

II.7.2. Culture in vitro de l'eucalyptus

La technique de culture de tissus ou d'organes (in vitro), qui a été appliquée à l'étude du problème de la physiologie des plantes est un moyen pour prolonger la survie des organes isolés, et pour leur développement.

Ces techniques invitro sont d application relativement récente dans le domaine forestier. Il existe peu d applications commerciales à plus ou moins grande échelle.

Plusieurs raisons, souvent d'ordre technique sont à l'origine de ce phénomène. La première en est le prix de revient, le coût de l'opération reste plus élevé que celui du semis (de Assis, 2001).

Le second frein à l'application des méthodes invitro, est lié au fait que la multiplication ne concerne en général, qu'un matériel très juvénile (graines, jeunes germinations).

Les travaux pionniers de Duran-cresswell et Nitsch (1975), De Fossard et Bourne (1976), De Fossard (1978), Hartney (1980), ont amélioré et étudié la méthode à nombreuses espèces, ainsi des cultures de fragments de feuilles, de pétioles, d'entre-nœuds, de nœuds et de racines ont été réalisées in vitro.

II.7.2.1.Lamicropropagation

La micropropagation consiste à produire, en conditions stériles, de nombreux bourgeons axillaires à partir d'un bourgeon ou plus précisément d'un méristème. Les bourgeons sont multipliés, allongés en tigelles de quelques centimètres et enracinés en présence d'une auxine, puis utilisés soit en plantation directe, soit en pieds-mères. La micropropagation permet l'amplification du matériel sélectionné sur une petite surface indépendamment des saisons. Les vitro-boutures sont de qualité : elles sont exemptes de bactérie et de virus et présentent une vigueur juvénile souvent recherchée pour l'établissement de pieds- mères destinés au bouturage horticole (Pilate et al., 2002).

Des protocoles ayant un bon rapport rendement-prix ont été mis au point pour de nombreuses lignées pures et hybrides d'Eucalyptus spp. (Watt et al.,1991, 1995). Dans le cas d'Eucalyptus spp., les explants sont sélectionnés à partir de semences (essais de provenance), de massifs taillés pour la multiplication et de plantes adultes en pot, et sont ensuite induits à se multiplier et à générer de 10 à 40 bourgeons par explant initial, en fonction du génotype parental et du protocole utilisé (Watt et al.,1995).

La production racinaire peut être induite in vitro ou ex vitro et l'acclimatation successive se réalise avec un bon taux de succès en serre. A Mondi Forests, de 30 à 50 clones de génotypes hautement sélectionnés et supérieurs de clones d'eucalyptus font partie annuellement du programme in vitro. A partir de ceux-ci, environ 4 200 plants d'eucalyptus sont produits tous les mois et servent à établir des massifs de multiplication par clone.

D'après les résultats d'essais de terrain sur des clones d'Eucalyptus (Watt et al.,1995), les taux de croissance, l'uniformité et la qualité des plants micropropagés sont comparables, voire supérieurs, à ceux obtenus avec des individus du même génotype produits suivant la technique conventionnelle de macropropagation (boutures racinées).

Outre l'utilisation de la micropropagation comme moyen direct de produire des propagules pour l'établissement de plantations, on peut utiliser les techniques in vitro de manière plus sélective en association avec un programme de production par macropropagation. Par exemple, la culture tissulaire peut servir à la production de matériel pour la constitution de massifs dont sont tirées les boutures à utiliser dans l'établissement des plantations (Watt et al., 1995).

A cet égard, comme il a été signalé pour d'autres essences forestières, nous n'avons observé que les boutures provenant de la micropropagation d'*Eucalyptus* spp. et de ses hybrides manifestent des pourcentages d'enracinement plus élevés et dans certains cas, produisent davantage de bourgeons que les sources adultes conventionnelles (Watt et al., 1995). Dans le cas d'*E. grandis*, un seul plant d'un massif donateur produit de 12 à 17 boutures environ avec de 50 à 60% pour cent d'enracinement réussi toutes les trois à quatre semaines. En fonction du clone, ces valeurs peuvent augmenter pour atteindre 35 boutures et 85% d'enracinement réussi si les boutures proviennent de plants micropropagés. On a également obtenu des succès avec quelques clones hybrides comme *E. grandis* x *E. nitens* (Watt et al., 1995).

II.7.2.2. L'embryogénèse somatique

Technique consiste à l'obtention d'embryons à partir de cellules somatiques, apparaît comme la technique de prédilection pour l'amplification des conifères. Cette technique se décompose en plusieurs étapes :

- une phase d'initiation qui consiste à rendre un tissu somatique capable de se différencier en embryons. Ces embryons sont appelés somatiques par opposition aux embryons zygotiques obtenus à partir des cellules germinales; une phase de multiplication en masse de ces embryons qui reste à un stade très peu différencié, précoce, immature, sous forme de masses embryogènes
- une phase de maturation de ces masses embryogènes que l'on peut comparer à ce qui se passe chez l'embryon zygotique lors de la dessiccation de la graine;
- une phase de conversion de l'embryon somatique mature en plantule

Découverte initialement sur l'épicéa par I. Hakmann dans les années 1985, l'embryogénèse somatique permet maintenant d'obtenir un nombre illimité de copies d'embryons immatures pour de nombreuses espèces. Les clones d'embryons ainsi obtenus sont génétiquement et morphologiquement conformes aux cellules de départ et, après un stade de maturation, se développent en plantules équivalentes à des semis (Pilate et al., 2002).

En effet, l'embryogénèse somatique, offre en ce qui concerne les espèces forestières un grand nombre d'améliorations par rapport à la micropropagation par prolifération de bourgeons axillaires. Le principal avantage de l'embryogénèse somatique est qu'elle donne des unités contenant un méristème à la fois de racine et de bourgeon. Autrement dit, tandis que le système racinaire produit par voie organogénique est adventif, les plantules provenant d'embryons somatiques ont des systèmes racinaires pivotants (Watt et al., 1995).

Les premières plantules d'eucalyptus produites par embryogénèse somatique ont été plantées en 1988 et il est intéressant de noter qu'elles ont commencé à fleurir une saison plus tôt que les plantules provenant de semences.

Pinto et al., (2008), ont obtenus des valeurs plus élevées du taux d'induction et du nombre total d'embryons somatiques produits d'*Eucalyptus globulus*.

II.7.2.3. Cultures de cellules en suspension

Une culture de cellules en suspension consiste en des cellules se divisant rapidement, homogènes et métaboliquement actives, dispersées et se développant dans un milieu de culture liquide aéré. Ces cultures représentent un excellent outil pour les applications aussi bien théoriques que pratiques. Parmi les applications de cultures de cellules en suspension

à la foresterie commerciale, on peut citer leur utilisation comme réceptacle pour l'insertion et l'intégration de gènes étrangers, leur rôle dans le cryostockage du germoplasme et leur emploi comme système d'isolement in vitro de lignées de mutants et de sélection de phénotypes résistants/tolérants au stress (van der Bulk, 1991). En outre, la production automatisée à grande échelle d'embryons somatiques à partir de cultures cellulaires en milieu liquide est un chemin possible vers la multiplication végétale à faible coût (Becwaret al., 1988) ainsi qu'un mode de surmonter le problème du développement asynchrone de l'embryon observé lorsqu'on utilise un milieu solide (Watt et al., 1991).

Blakewell et al., (1993), ont pu établir et maintenir des cultures en suspension à partir d'une variété d'eucalyptus pur et de lignées hybrides.

II.7.2.4. Cryoconservation

Comme pour les cultures agricoles, l'amélioration génétique des arbres doit choisir entre maximiser les avantages génétiques ou minimiser l'érosion génétique (Burely, 1989). En outre, la variation génétique doit être à large base pour permettre aussi bien des gains dans les générations à venir que l'adaptation à des objectifs, milieux, systèmes de gestion ou maladies en évolution. Ce fait, associé au long cycle de croissance des arbres, a fait que des superficies relativement étendues de terre sont actuellement affectées par l'industrie forestière au stockage de génotypes "potentiellement utiles". En outre, certains de ces génotypes sont parfois détruits par des facteurs environnementaux. Dans la foresterie commerciale, on peut aussi perdre du matériel génétique ou de production dans d'autres types d'opérations. C'est ainsi que, dans le cas d'industries qui utilisent des techniques de micropropagation dans leur programmes de production, les cultures et/ou plantules in vitro atteignent parfois le stade voulu pour la transplantation ou l'expédition avant que soient disponibles la main-d'oeuvre nécessaire aux manipulations et l'espace dans les serres, ou avant que le marché ou les consommateurs soient prêts à les recevoir. On peut surmonter ces problèmes en stockant le germoplasme désiré in vitro en conditions de croissance minimale (température inférieure à 10°C, approvisionnement réduit en oxygène, diminution des nutriments, etc.) et/ou de cryoconservation (stockage du germoplasme dans de l'azote liquide) (Kartha, 1985).

Le stockage en conditions de croissance minimale n'offre qu'une solution à moyen terme car les cultures perdent leur capacité de régénération au bout de quelques mois. Dans le cas de l'eucalyptus, nous avons pu stocker des cultures en conditions de croissance minimale (milieu à très basse teneur en nutriments, 4°C) pendant six mois sans perte de survie (Berjak et al., sous presse). Cependant, en conditions de cryoconservation (à -196°C) les processus métaboliques et la dégradation biologique sont arrêtés et (théoriquement) le matériel biologique peut être emmagasiné indéfiniment (Kartha, 1985 ; Grout, 1995). Du fait que seuls de petits fragments de matériel biologique peuvent résister au stress du gel, les éléments végétaux utilisés pour la cryoconservation sont des bourgeons axillaires, des fragments de cal, des parties aliquotes de cultures de cellules en suspension et du pollen. Avant leur immersion et stockage dans l'azote liquide, il faut préparer les explants. La préparation consiste en général en culture préalable dans un milieu approprié (à potentiel osmotique élevé), séchage jusqu'à une basse teneur en humidité sans perte de viabilité, et traitement à base de cryoprotecteurs (glycérol, sulfoxyde de diméthyle, sucrose) (Kartha, 1985 ; Grout, 1995).

Poissonnier et al., (1991), ont pu réaliser la cryoconservation dans l'azote liquide d'apex d'*Eucalyptus gunii* cultivé in vitro après enrobage et déshydratation.

II.8.Principales essences d'eucalyptus cultivées en Algérie

En Algérie, *E. camaldulensis* semble être l'espèce pionnière de ce genre, ayant été introduite en 1860 par les Français (Poupon, 1972 ; Méziane, 1996). La plantation a excessivement bien prospéré, ainsi, d'autres espèces ont été introduites et expérimentées d'abord dans différents arboréta depuis 1948 dans le but d'assécher la Mitidja et d'évacuer les marécages constituant des causes essentielles des maladies d'origine hydrique (Letreuch-Belarouci, 1991). Dans des conditions très favorables de la région d'Alger (Méziane, 1996), la diversité des eucalyptus a donné naissance à des hybrides naturels tels que *E. algeriensis* (*E. camaldulensis* x *E. ruais* x *E. tereticornis*) qui a une place bien déterminée dans l'eucalypticulture (Morandini, 1964).

D'après l'office national des travaux forestiers (ONTF), plusieurs entreprises dans notre pays s'occupent actuellement à la production en pépinière des plants forestiers, fruitiers et d'ornements pour la réalisation de divers projets de reboisement, de création des espaces verts et des programmes agricoles.

Pour répondre à ces besoins en bois, l'Algérie a fait appel aux eucalyptus qui sont incontestablement une source ligneuse précieuse. En effet, plus de 130 espèces ont été plantées sur le territoire national (Méziane, 1996), faisant l'objet de la majorité des programmes de reboisement des terrains nus, à la sylviculture urbaine et aux espaces verts.

Diverses espèces sont cultivées en Algérie, elles font partie intégrante de plusieurs plans d'aménagements forestiers. Les principales sont citées ci-dessous :

E. camaldulensis. De tous les eucalyptus, l'espèce *E. camaldulensis* présente la distribution la plus large en Australie, elle est appelée communément le gommier rouge, cette essence est la plus utilisée de tous les eucalyptus dans le reboisement à travers le monde. Elle résiste à la sécheresse, au froid mais non aux gelées (Lamprecht, 1990).

E. cladocalyx

Cette espèce est classée de petite à moyenne taille, bien qu'il puisse atteindre jusqu'à 40 m de hauteur (Boudy, 1952). C'est une excellente plante mellifère et dont le feuillage est réputé comestible par les animaux (Ledant, 1975).

E. gomphocephala

Arbre très intéressant, il pousse parfaitement sur le calcaire et en zone aride. Il fructifie très abondamment et donne un bois d'œuvre très résistant (Boudy, 1952).

E. umbellata

Synonyme *Eucalyptus tereticornis* (Smith, 1793). C'est une espèce plantée dans de nombreuses régions du monde, elle est appelée communément l'eucalyptus rouge, elle pousse entre 20 m à 50 m de hauteur, son bois produit d'excellents charbons. Cette espèce préfère les sols humides et marécageux et sensibles aux gelées.

E. saligna

Appelé communément eucalyptus bleu Sydney, arbre précieux dans les plantations forestières. Il pousse dans les zones tempérées chaudes vers les pays subtropicaux, il peut atteindre 65 mètres de hauteur. Son bois est utilisé pour la construction de bâtiments, la construction navale, et est très précieux pour les meubles en raison de sa couleur miel riche et sombre. Espèce connue sensible à la sécheresse et tolérante aux gelées (Bootle, 1983).

E. punctata

Un aliment privilégié du Koala, appelé communément gomme grise, arbre peut atteindre jusqu'à 10 à 35 mètres de hauteur, avec un diamètre de tronc de 100 cm, il pousse sur les collines basses, tout au long de la zone côtière et les pentes des plateaux en Australie. Cette espèce tolère les sols pauvres et secs. Son bois est utilisé dans les constructions lourdes et le chauffage (Boland et al., 1984).

E. microcorys

Appelée communément Tallowwood, pousse dans les forêts humides près de la côte, elle peut atteindre plus de 40 mètres de hauteur. Son bois de couleur brun jaunâtre à vert olive est utilisé pour les terrasses et les meubles de jardin. Espèce connue tolérante à la sécheresse et aux gelées (Boland et al., 1984).

II.9. Conclusion à la partie bibliographique et objectifs de recherche

La présence de la maladie du crown gall dans les vergers et dans les pépinières de production de plants entraîne une réduction de la vigueur et de la durée de vie des arbres. Des pertes économiques très sérieuses au niveau de la production peuvent être enregistrées puisque les plants porteurs de symptômes sont invendables (Krimi, 2001).

L'importance de la maladie du crown gall sur l'eucalyptus, nous a incité à vérifier le pouvoir pathogène des souches d'Agrobacterium spp. isolées de cette espèce et par conséquent de vérifier un principe phytopathologique important qui est le postulat de Koch.

En premier lieu, nous avons inoculé in vitro huit espèces d'eucalyptus cultivées à travers les pépinières forestières algériennes avec trois souches d'Agrobacterium spp. : une souche de référence et deux souches isolées de cette même plante hôte.

En deuxième lieu, nous avons inoculé les mêmes espèces d'Eucalyptus par les mêmes souches d'Agrobacterium in planta pour faire une comparaison entre les réponses des plants d'eucalyptus vis-à-vis des souches d'Agrobacterium in vitro et in planta.

Enfin, afin d'estimer la performance des souches inoculées sur les différentes espèces d'eucalyptus testées et pour la mise en évidence d'une éventuelle utilisation de ces souches en biotechnologie, nous les avons comparé par rapport aux symptômes produits tels que ; dimensions des tumeurs et présence de cals racinaires de type « hairy root ».

Chapitre 2: Matériel et méthodes

Notre expérimentation est déroulée en deux essais : un essai in vitro au niveau du laboratoire de Ressources Génétiques et Biotechnologie de l'ENSA d'El-Harrach et un essai in planta au niveau du laboratoire et de la serre de phytobactériologie à l'université Saad Dahleb de Blida.

1. Matériel biologique

1.1. Matériel végétal

Nous avons testé huit espèces d'eucalyptus cultivées en Algérie, en pépinières, comme plantes d'ornements ou utilisées dans les plans de reboisement forestiers.

Pour les deux essais in vitro et in planta, les huit espèces étudiées sont : *E. camaldulensis*, *E. cladocalyx*, *E. gomphocephala*, *E. umbellata*, *E. saligna*, *E. blackey*, *E. punctata* et *E. microcorys*.

Les semences des différentes espèces d'eucalyptus utilisées dans ce travail nous ont été fournies par les services de l'Institut National de Recherche Forestière (INRF) de Baïnem.

1.2. Souches bactériennes

1.2.1. Inoculum et souches d'*Agrobacterium* spp. utilisées

Les trois souches bactériennes pathogènes utilisées dans la présente étude appartiennent à la collection du laboratoire de phytobactériologie (département d'Agronomie de l'Université Saad Dahleb, Blida). Parmi ces souches, deux souches locales E2X et E17 ont été isolées à partir des tumeurs de "crown gall" issues des espèces d'eucalyptus (Krimi et al., 2006) et une souche de référence *Agrobacterium tumefaciens* C58 isolée de *Prunus* (Dickey, 1961). Ces souches ont été conservées dans l'eau distillée stérile à une température de 4°C. Le pouvoir pathogène des 3 souches a été confirmé sur une plante test *Kalankhoë* (*Kalankhoë daïgremantiana*) et sur la tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Marmande) (Figure 4).

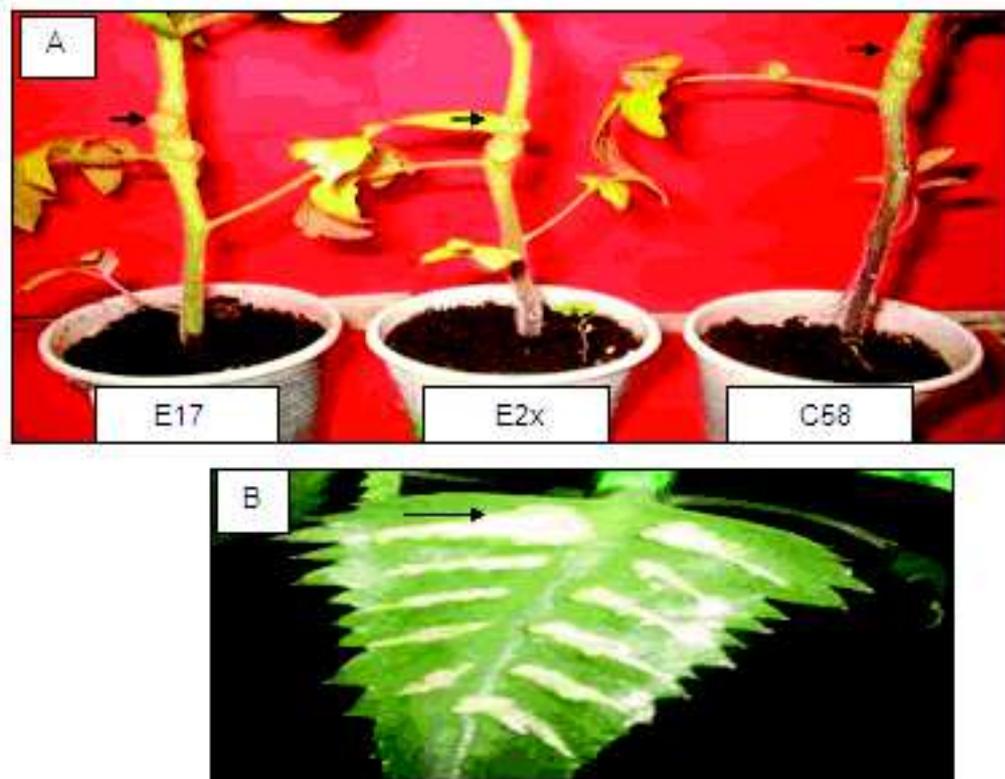


Figure 4: Test de pathogénicité des trois souches bactériennes E2x, E17 et C58 utilisées pour l'inoculation *in vitro* et *in planta*.

A. Pouvoir pathogène des trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* E17, E2X et C58 sur des plantules de tomate;

B. Pouvoir pathogène de la souche (E17) sur le limbe de kalanchoë.

1.2.2. Préparation des suspensions bactériennes à inoculer

Afin de s'assurer de la pureté des souches, nous avons procédé à des purifications successives. La méthode consiste à faire des étalements successifs en boîtes de pétri, de la culture bactérienne de chaque souche selon 3 secteurs sur le milieu MG (Mannitol Glutamate) (Keane et al., 1970) (Annexe 1) puis incubation à 25° C.

L'inoculum utilisé pour nos deux essais *in vitro* et *in planta* est une culture bactérienne de 48 heures. Pour l'inoculation, nous avons préparé des suspensions denses à une densité optique DO= 1, ce qui correspond à une densité cellulaire de 10^8 bactéries / ml (Bouzar et al., 1991).

2. Préparation des plantes

2.1. Conduite du test *in vitro*

2.1.1. Désinfection des semences

Chaque lot de graines est désinfecté individuellement selon le protocole suivant : un rinçage à l'alcool 70°, un trempage en agitation dans une solution d'hypochlorite de sodium 12° (eau de javel) pendant 10 minutes, puis trois rinçages successifs à l'eau distillée stérile. La dernière étape consiste à récupérer les graines désinfectées sur du papier filtre Whatman stérile.

Toutes ces opérations sont réalisées en conditions aseptiques sous une hotte à flux laminaire.

2.1.2. Milieu de culture

Pour notre essai, nous avons utilisé le milieu de culture de base MS (Murashige et Skoog, 1962)(Annexe1) qui comporte : des solutions macrominérales ; des solutions microminérales et des solutions vitaminiques.

La préparation de 01 litre de milieu de culture à partir des solutions de base de MS, se réalise selon les étapes suivantes :

Dans un ballon de 1 litre d'eau distillée et sur un agitateur: 50 ml de macro- éléments (concentré 20 fois); 10 ml de micro-éléments (concentré 100 fois); 10 ml de fer (concentré 100 fois); 1 ml de vitamines (concentré 1000 fois); 0,1 g de myo- inositol et 20 g de saccharose sont ajoutés puis ajustés.

Le pH est ajusté entre 5,6 et 5,8. Le milieu est ensuite solidifié en ajoutant 7g d'agar.

Avant la mise en culture, le milieu est versé dans des tubes à essai standard (160 x 24 x 1,2 mm) et stérilisé par un autoclavage à une température de 120°C pendant 20 minutes. Le milieu de culture utilisé pour le repiquage des plants après l'inoculation contient la même composition que le milieu utilisé pour le semis plus un antibiotique la céfotaxime (4µg / ml) stérilisé par ultrafiltration en utilisant des filtres millipores pour réduire le développement de la bactérie en question après transformation, puis repiquage.

2.1.3. Mise en culture

Le semis se fait par l'introduction des graines sous une hotte à flux laminaire dans des tubes à essai contenant le milieu de culture. Les tubes à essais ainsi ensemencés sont placés dans une chambre de culture dont la température est fixée à 26° ± 2° C, sous une photopériode de 16 heures de jour et 8 heures de nuit.

Pour chaque espèce d'eucalyptus, un semis de plus de 120 graines a été pratiqué dans 120 tubes. Sur les 120 tubes, 60 plants par espèce ont été sélectionnés par rapport à leur taille et leur bonne croissance.

Après 20 à 30 jours, les plants ont atteint un stade de trois feuilles et sont prêts à l'inoculation.

2.2. Conduite du test in planta

2.2.1. Désinfection

Les graines ont été désinfectées selon le protocole suivant : un trempage dans une solution d'hypochlorite de calcium à 4 % ; puis rinçage 3 fois par l'eau distillée stérile.

Chaque lot de graines désinfecté, est récupéré sur du papier filtre stérile.

2.2.2. Semis

Le substrat utilisé pour le semis en serre est un mélange de : 1/3 de sable, 1/3 de tourbe et 1/3 de terre végétale. La stérilisation du substrat a été réalisée selon la méthode de Rappilly (1968), qui consiste à stériliser le sol à deux reprises dans un four pasteur pendant 1 heure à 250° C, en un intervalle de 24 heures.

Le semis a été mené sous une mini-serre réglée à une température de 25° C. Cette opération a été suivie par une irrigation à l'eau de robinet stérile. Le moyen adopté pour l'irrigation est l'aspersion manuelle. LI Après 15 jours, les plants sont repiqués dans des sachets de poly-éthylène transparent contenant la même composition de substrat stérile que le semis, chaque plant est repiqué dans un sachet. Les plants ont été placés par la suitesous-serre et suivis par une irrigation à l'eau de robinet stérile. Après 30 à 40 jours les plants ont atteints le stade trois feuilles.

3. Méthodes d'inoculation

Pour l'essai in vitro, la méthode d'inoculation consiste à réaliser des microblessures à l'aide d'une aiguille stérile au niveau des racines et sous une hotte à flux laminaire. Nous avons inoculé 20 plants par souche et par espèce d'eucalyptus. Pour le test témoin, nous avons utilisé des plants blessés inoculés avec de l'eau distillée stérile. Les plants inoculés sont repiqués dans des tubes à essai contenant le milieu de culture MS avec la céfotaxime, un antibiotique qui réduit le développement de la bactérie. La mise en culture se fait dans une chambre de culture avec une température de 26° ± 2° C, sous une photopériode de 16 heures de jours et 8 heures de nuit. L'inoculation a été réalisée au stade 3 feuilles.

Pour l'essai in planta, la méthode d'inoculation consiste à réaliser des microblessures (= 1 cm) à l'aide d'une aiguille stérile entre la deuxième et la troisième feuille. Un volume constant de 200 ul de la suspension bactérienne est déposé au niveau des sites des blessures à l'aide d'une micropipette. Le site de l'inoculation est recouvert avec du papier aluminium pour empêcher le dessèchement de l'inoculum. Nous avons inoculé trente (30) plants par souche et par espèce d'eucalyptus. Des plants blessés et inoculés avec l'eau distillée stérile sont considérés comme des plants témoins. L'inoculation a été réalisée au stade trois feuilles.

4. Paramètres étudiés

4.1. Etude du pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium* spp. et de la sensibilité des espèces d'eucalyptus

Pour les deux essais in vitro et in planta, la sensibilité est évaluée, par le pourcentage d'apparition des symptômes tumoraux en calculant le pourcentage des plants ayant répondu positivement à l'inoculation (développement de la tumeur au site d'inoculation).

4.2. Etude de la performance des souches d'*Agrobacterium* spp.

Ce paramètre n'est étudié que pour l'essai in planta. Nous nous sommes intéressés à mettre en évidence une éventuelle utilisation de ces souches en biotechnologie (transformation génétique). L'estimation de la performance des souches étudiées, se fait selon deux facteurs : la présence de cals racinaires de type « hairy root » et la morphométrie de la tumeur (dimensions des tumeurs). Cette dernière est appréciée en mesurant le diamètre de la tumeur (mm) à l'aide d'un pied à coulisse et le poids (g) à l'aide d'une balance de précision (précision = 0,1 mg) (Cervera et al., 1998).

5. Analyse des résultats

Afin de vérifier une éventuelle différence dans les réponses des espèces d'eucalyptus vis-à-vis des souches testées, nous nous sommes servis de l'analyse de la variance à 2 facteurs de classification (ANOVA 2) (Dagnelie, 1975).

L'analyse de la variance permet de montrer les divergences entre les populations en définissant les sources de variabilité. En décomposant la variabilité globale observée dans une ou plusieurs populations en composantes interne et externe, on obtient deux valeurs de variabilité que l'on peut attribuer aux facteurs étudiés, ainsi qu'une valeur qui englobe les autres sources de variabilité (variabilité résiduelle).

Les résultats obtenus sont exprimés en fonction de la probabilité qui permet de déterminer le niveau de signification des effets des facteurs étudiés (traitements).

Si $p \geq 0.05$: l'effet des traitements est non significatif ; Si $0.05 > p > 0.01$: l'effet des traitements est significatif ; Si $0.01 > p > 0.001$: l'effet des traitements est hautement significatif ; Si $p < 0.001$: l'effet des traitements est très hautement significatif.

Le seuil d'erreur retenu est 5%. Dans le cas d'effet de traitements significatif ($P < 0.05$), l'analyse de la variance est complétée par une comparaison des moyennes, deux à deux, en utilisant le test des étendues multiples (LSD) de Fisher (Least Significant Difference) au seuil de 5%. Ce dernier test nous permet de montrer les différences entre les traitements et de dégager les groupes homogènes.

L'application de ces analyses a été réalisée par le logiciel: STATGRAPHICS Centurion XV Version 12.2.05 copyright © 1982-2007 Stat Point, Inc.

La performance de transformation des souches a été étudiée en évaluant les résultats du poids moyen et du diamètre moyen des tumeurs selon le test de student (Dagnelie, 1975).

Pour le calcul du taux d'infection (incidence de la maladie) sur les espèces d'eucalyptus étudiées, nous avons utilisé la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre des plants atteints (présence de tumeur au site d'inoculation)}}{100 \times \text{Nombre des plants / total}}$$

Chapitre 3 : Résultats et discussions

1. Pouvoir pathogène in vitro des trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et sensibilité des espèces d'eucalyptus

Selon les huit espèces d'eucalyptus, trois à quatre semaines après l'inoculation, les plants infectés par les souches E2x, E17 et C58 ont commencé à développer des tumeurs sur les racines et les tiges (Figure 5). Sept semaines après l'inoculation, les plants ont été examinés visuellement pour l'estimation de l'incidence de l'infection. Les résultats obtenus ont montré que les huit espèces d'eucalyptus ont répondu positivement à l'inoculation artificielle par les trois souches d'*Agrobacterium* et avec des pourcentages d'infection hétérogènes et aucune tumeur n'a été enregistrée dans les lots témoins (Tableau 2).

Les résultats relatifs à la sensibilité des espèces d'eucalyptus vis-à-vis des trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* in vitro sont enregistrés dans le tableau 2 et les figures 6, 7 et 8.



Figure 5 : Formation des tumeurs chez quelques espèces d'eucalyptus

inoculation avec les trois souches d'Agrobacterium tumefaciens (E2x, E17 et C58) in vitro. A-E. microcorys (E2x), B- E. camaldulensis (E17), C- E. gomphocephala (C58), D- formation de chevelu racinaire sur la tumeur (hairy root) chez E. microcorys (E17)

Tableau 2 : Résultats relatifs de l'infection artificielle des huit espèces d'eucalyptus par les trois souches d'Agrobacterium tumefaciens (E2x, E17 et C58) in vitro.

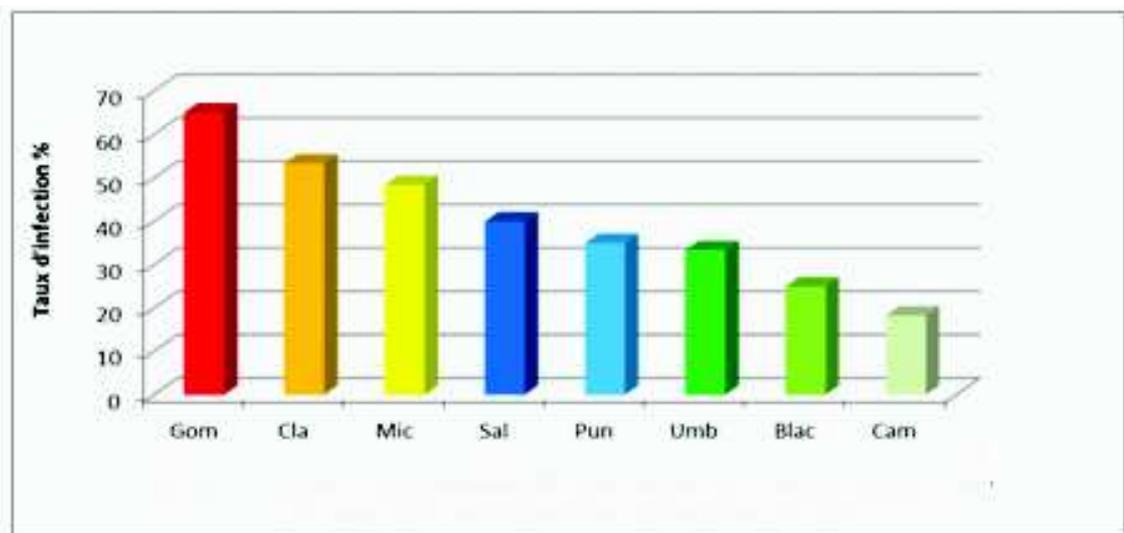


Figure 6 : Niveau de sensibilité des espèces d'eucalyptus vis-à-vis des trois souches bactériennes in vitro

L'analyse de la variance révèle une différence très hautement significative du facteur espèce d'eucalyptus (F1) sur le degré de la sensibilité vis-à-vis des trois souches d'Agrobacterium spp (Annexe 2).

Le test des étendues multiples (LSD) de Fisher au seuil 5% révèle cinq groupes homogènes (A, B, C, D et E) (Annexe 3).

D'après le tableau 2 et la figure 6, il ressort que l'infection a atteint le plus haut niveau chez *E. gomphocephala* avec un pourcentage de 65 % appartenant individuellement au groupe A. Les espèces *E. cladocalyx* et *E. microcorys* montrent une sensibilité avec des pourcentages de 53,33 % et 48,33% respectivement. Ils sont regroupés dans le même groupe B. Pour les espèces, *E. saligna*, *E. punctata* et *E. umbellata* les résultats montrent des sensibilités avec des pourcentages de 40 %, 35 % et 33,33 % respectivement et sont regroupés dans le même groupe C, suivi par *E. blackey* avec un pourcentage de 25 % qui appartient individuellement au groupe D.

Le taux d'infection le plus faible a été enregistré pour *E. camaldulensis* avec un pourcentage de 18,33 %, il appartient au groupe individuel E.

1.2. Pouvoir pathogène des trois souches d'Agrobacterium in vitro

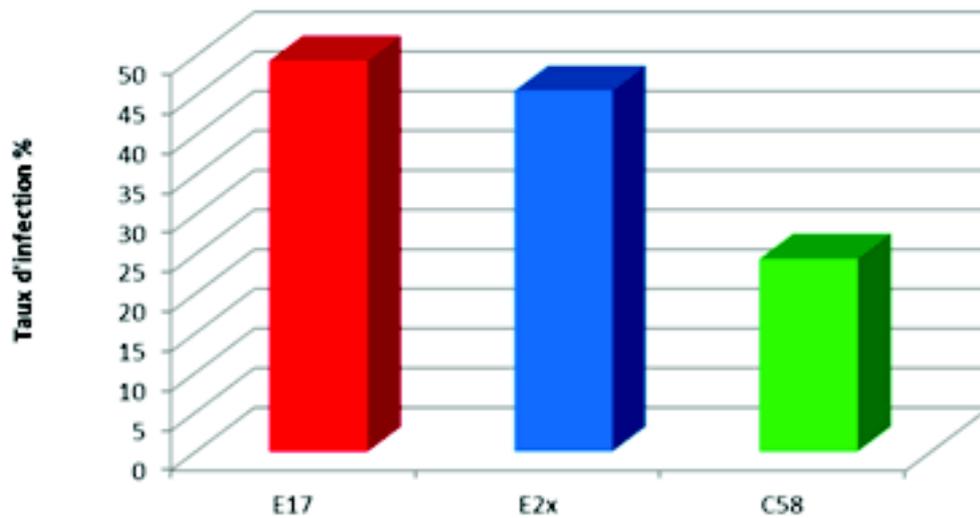


Figure 7 : Niveau de virulence des trois souches d'*Agrobacterium in vitro*

Concernant l'effet du facteur souche (F2), l'analyse de la variance révèle une différence très hautement significative sur le degré de la sensibilité des espèces d'eucalyptus vis-à-vis des souches d'*Agrobacterium spp* (Annexe 2).

Le test des étendues multiples (LSD) de Fisher au seuil 5 % révèle deux groupes homogènes (A et B) (Annexe 3).

D'après le tableau 2 et la figure 7, il ressort que le taux de pathogénicité le plus élevé a été obtenu par les souches E17 et E2x avec des pourcentages de 49,37% et 45,62 % respectivement, ils sont regroupés dans le même groupe A, suivi par la souche C58 avec le pourcentage le plus faible 24,37 % qui est représenté par le groupe B.

Les résultats suggèrent en effet que les souches E17 et E2x sont les plus virulentes et présentent des capacités de transformation plus importantes par rapport à la souche C58 qui s'est montrée la moins virulente pour les huit espèces d'eucalyptus.

1.3. Taux d'infection des espèces d'eucalyptus inoculées par les trois souches d'*Agrobacterium in vitro*

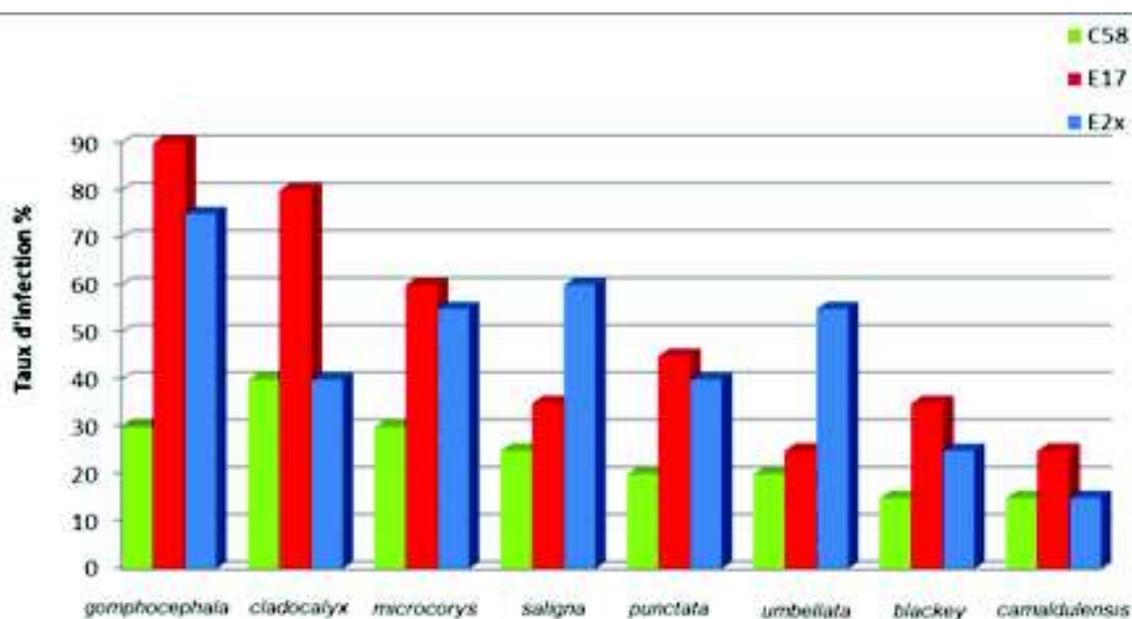


Figure 8 : Taux d'infection des espèces d'eucalyptus inoculées par les trois souches d'*Agrobacterium* in vitro

Concernant l'effet de l'interaction des deux facteurs étudiés espèces-souches (F1x F2), l'analyse de la variance révèle une différence significative sur le degré de la sensibilité des espèces d'eucalyptus vis-à-vis des souches d'*Agrobacterium* spp (Annexe 2).

Le test des étendues multiples (LSD) de Fisher au seuil 5 % révèle huit groupes homogènes (A, AB, B, C, CD, D, DE et E).

D'après le tableau 2 et la figure 8, il ressort que le taux d'infection le plus élevé a été enregistré par la souche E17 sur *E. gomphocephala* avec un pourcentage de 90 % qui est représenté individuellement par le groupe A, suivi par *E. cladocalyx* inoculé par la souche E17 avec un pourcentage de 80 % représenté par le groupe AB.

Pour l'espèce, *E. gomphocephala* inoculée par la souche E2x, le taux d'infection a atteint un pourcentage de 75 % qui est représenté individuellement par le groupe B.

Les espèces *E. microcorys* inoculée par la souche E17 et *E. saligna* inoculée par E2x ont enregistré le même pourcentage de 60 %, suivi par les espèces *E. microcorys* inoculée par E2x et *E. umbellata* inoculée par la même souche avec le même pourcentage de 55 %. Ils sont regroupés dans le groupe C.

Pour l'espèce *E. punctata* inoculée par E17, le taux d'infection a atteint 45 %, suivi par la même espèce inoculée par E2x, *E. cladocalyx* inoculée par E2x et *E. cladocalyx* inoculée par C58 qui ont enregistré le même pourcentage de 40 %. Ils sont regroupés dans le groupe CD.

Les espèces *E. blackey* inoculée par E17 et *E. saligna* inoculée par la même souche ont enregistré le même pourcentage de 35 %. Ils sont regroupés dans le groupe D.

Les espèces *E. gomphocephala*, *E. microcorys* et *E. saligna* inoculées par la souche C58 ont enregistré le même pourcentage de 30 %, suivi par *E. umbellata* inoculée par E17, *E. camaldulensis* inoculée par la même souche et *E. blackey* inoculée par E2x qui ont enregistré le même pourcentage de 25 %. Ils sont regroupés dans le groupe DE.

Pour *E. punctata* inoculée par C58, le taux d'infection a atteint 20 %, suivi par *E. camaldulensis* inoculée par les souches E2x, C58 et *E. blackey* inoculée par la souche C58 qui ont enregistré le taux d'infection le plus faible de 15 %. Ils sont regroupés dans le groupe E.

1.4. Discussion

D'après l'étude de la sensibilité de huit espèces d'eucalyptus vis-à-vis des trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, les résultats montrent une variabilité des réponses entre les différentes souches sur les diverses espèces.

Les résultats obtenus montrent que les huit espèces d'eucalyptus sont sensibles aux trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et développent des tumeurs. Nous avons pu reproduire les symptômes du crown gall avec les deux souches isolées à partir l'eucalyptus et donc nous avons pu réaliser une étape essentielle des postulats du Koch qui est la reproduction des symptômes à partir desquels ces souches ont été isolées.

Par ailleurs, toutes les espèces d'eucalyptus inoculées par les trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* ont répondu positivement à l'inoculation et développent des tumeurs, ce qui suggère leur statut transgénique, c'est-à-dire que l'ADN-T a été transféré et s'est intégré dans les génomes des différentes espèces d'eucalyptus et ont pu induire la surproduction de l'auxine et la cytokinine à l'origine du phénotype tumoral.

Les résultats révèlent que l'espèce *E. gomphocephala* se présente comme étant la plus sensible par rapport à la souche E17 ; alors que l'espèce *E. camaldulensis* semble être la moins sensible des sept autres espèces inoculées.

Concernant la souche la plus virulente et la plus performante en terme de transformation, les résultats montrent que la souche E17 s'est montrée la plus virulente par rapport à la souche E2x et la souche C58 qui s'est montrée moins virulente sur la base du pourcentage d'infection. Ainsi, les deux souches E17 et E2x provoquent les tumeurs les plus volumineuses et produisent des cals racinaires de type « hairy root » chez quelques espèces d'eucalyptus. Il est à rappeler que, les souches E17 et E2x sont originellement isolées à partir de l'eucalyptus alors que la souche C58 est isolée à partir de *Prunus* (Cervera et al., 1998).

A ce jour, il y a eu peu de travaux en rapport avec la susceptibilité des espèces d'eucalyptus à *Agrobacterium tumefaciens*, Reis et Hedges (1975), mentionnent l'incidence de la maladie de la galle du collet en plantations d'eucalyptus en Argentine et en Colombie. Jindal et Bhardwaj (1986), ont également observé l'apparition de cette maladie dans une pépinière d'*E. tereticornis* en Inde.

Adam (1986), a décrit la sensibilité d'*Eucalyptus gunnii* à quatre souches sauvages d'*Agrobacterium rhizogenes* in vitro. En 1989, il a décrit la sensibilité d'*Eucalyptus gunnii* à *Agrobacterium tumefaciens* (souche C58) in vitro. Mac Rae et Van Staden (1993), ont testé la virulence de trois souches d'*Agrobacterium rhizogenes* (LBA9402, R1601 et TR83) sur différentes espèces d'eucalyptus (*E. grandis*, *E. nitens* et *E. dunni*). La souche LBA9402 infecte toutes les espèces alors que la souche R1601 était avirulente. Ces auteurs suggèrent l'utilisation potentielle de la souche LBA9402 pour améliorer l'enracinement des explants d'eucalyptus in vitro.

Au cours de notre essai, nous avons observé la présence de cals racinaires de type « hairy root » sur quelques espèces d'eucalyptus provoqués par les deux souches d'*Agrobacterium tumefaciens* E2x et E17.

Machado et al., (1997), ont évalué la sensibilité d'eucalyptus hybride *E. grandis* x *E. urophylla* à cinq souches d'*Agrobacterium rhizogenes* et douze souches sauvages d'*Agrobacterium tumefaciens* in vitro. Les résultats ont montré différents degrés de virulence, en fonction de la souche testée, ce qui indique la transformation de cet hybride d'eucalyptus par des vecteurs dérivés d'*Agrobacterium* est possible. Tous les plants inoculés par les douze souches sauvages d'*Agrobacterium tumefaciens* ont répondu positivement à l'inoculation avec un taux d'infection atteint 87 % pour la souche A208. Toutes les tumeurs développées ont montré une autonomie de croissance lors de son transfert dans un milieu sans hormone, ce qui suggère leur statut transgénique, c'est-à-dire l'ADN-T a été intégré d'une manière stable dans le génome d'eucalyptus et a pu induire la surproduction de l'auxine et la cytokinine. Un mois après le transfert, une formation de pousses à la surface de certaines tumeurs a été observée, ces pousses ont été obtenues avec cinq souches d'*Agrobacterium tumefaciens*. La souche 82139 produit le plus grand nombre de pousses. En outre, il a été l'une des souches les plus virulentes, par conséquent, cette souche pourrait être considérée prometteuse pour l'utilisation dans la transformation génétique d'*E. grandis* x *E. urophylla*. Les résultats obtenus par cette étude, nous incitent à compléter notre étude sur la transformation pour déterminer le nombre de pousses produits par ces souches.

Les travaux cités précédemment avaient pour objectifs l'évaluation de la transformation de diverses espèces d'*Agrobacterium* spp. sur l'eucalyptus ou alors, décrire la maladie du crown gall sur l'eucalyptus sur la base des symptômes. Cependant, les travaux de Krimi et al., (2006), ont permis à la fois d'isoler, d'identifier les souches d'*Agrobacterium* spp. sur la base de tests biochimiques, biologiques et moléculaires. Par la suite, les travaux de Krimi et Belaskri (Belaskri, 2006) ont permis d'évaluer l'incidence de la maladie du crown gall dans six pépinières forestières de l'Ouest d'Algérie, révélant ainsi des taux allant de 5 à 95%.

Sur d'autres espèces, plusieurs travaux ont été fait dans l'objectif d'étudier le pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium tumefaciens*. Thomas et al., (1991), a démontré la sensibilité d'un génotype de lentilles (*Lens culinaris*. Medik. cv. Laird) in vivo et in vitro à quatre souches d'*Agrobacterium tumefaciens* (C58, Ach5, GV3111 et A281). Les résultats ont montré différents degrés de virulences en fonction de la souche testée. Par ailleurs, Mahmood Khawar et Özcan (2002), ont démontré la sensibilité de quelques génotypes de lentilles (*Lens culinaris*. Medik) in vitro à une souche virulente d'*Agrobacterium tumefaciens* A281. Les résultats montrent que trois génotypes parmi les 21 génotypes étudiés n'ont pas développé des tumeurs. Sur une autre léguminosae, Karakaya et Özcan (2000), ont démontré la sensibilité de quelques génotypes d'haricot (*Phaseolus vulgaris*. L) in vitro à la souche A281 d'*Agrobacterium tumefaciens*. Les résultats montrent que cinq génotypes parmi les 16 étudiés n'ont pas développé des tumeurs.

De ce qui a été élucidé plus haut, nous pouvons déduire que le pouvoir pathogène dépend de la virulence des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et la sensibilité des espèces végétales.

Stomp et al., (1990), étudiant la résistance de onze espèces de pin ont conclu qu'il existe une spécificité dans l'interaction hôte-pathogène, ils ont d'opinion que la fréquence de la formation des tumeurs dépend largement de l'espèce, de l'âge de la plante et de la souche bactérienne.

Pour élaborer un protocole efficace pour la transformation génétique des plantes via *Agrobacterium*, il est essentiel de déterminer la souche la plus performante. La mise en place d'une stratégie efficace pour le transfert des gènes dépend de la réussite de l'interaction de cette souche avec le génotype de plante.

En effet, les conditions contrôlées de la culture in vitro (milieu de culture, température, pH, photopériode) sont des conditions qui favorisent la sensibilité à Agrobacterium.

Moore (1976), a montré que l'infection chez quelques espèces de Prunus est considérablement importante lorsque l'inoculation est effectuée en Juin, Juillet et Août. En effet, la température élevée favorise la sensibilité à Agrobacterium. Mantis et Winans (1992), montrent que l'acidité du milieu externe est un élément intervenant dans l'activation des gènes vir. Il est important de rappeler que notre expérimentation s'est faite dans conditions où la température de la chambre de culture était de $26 \pm 2 \text{ C}^\circ$ et le pH du milieu est ajusté entre 5,6 et 5,8.

D'après Sparrow et al., (2004), les facteurs génétiques sont à l'origine de cette variabilité indiquant leur responsabilité à 95%, cependant, la variabilité de la sensibilité des plantes à Agrobacterium spp. est affectée à un taux de 5% par les facteurs environnementaux.

Nous avons dégagé de notre étude que les huit espèces d'eucalyptus étudiées ont réagi positivement à l'inoculation artificielle avec les trois souches d'Agrobacterium tumefaciens et se présentent comme étant sensibles à la maladie du crown gall avec une forte variabilité par rapport au pourcentage d'infection et aux caractères morphologiques des tumeurs. Ainsi, les deux souches E17 et E2x induisent les tumeurs les plus volumineuses et produisent des cals racinaires de type « hairy root » chez quelques espèces d'eucalyptus, ce qui les qualifie d'être virulentes et performantes en termes de transformation.

2. Pouvoir pathogène in planta de trois souches d'Agrobacterium tumefaciens et sensibilité de quelques espèces d'eucalyptus

Selon les huit espèces d'eucalyptus, quatre à cinq semaines après l'inoculation, les plants infectés par les souches E2x, E17 et C58 ont commencé à développer des tumeurs sur les racines et les tiges (Figure 9). Huit semaines après l'inoculation, les plants ont été examinés visuellement pour l'estimation de l'incidence de l'infection. Les résultats obtenus ont montré que les huit espèces d'eucalyptus ont répondu positivement à l'inoculation artificielle par les trois souches d'Agrobacterium spp. et avec des pourcentages d'infection hétérogènes et aucune tumeur n'a été enregistrée dans les lots témoins (Tableau 3).

Les résultats relatifs à la sensibilité des espèces d'eucalyptus vis-à-vis des trois souches d'Agrobacterium tumefaciens in planta sont enregistrés dans le tableau et les figures 10, 11 et 12.

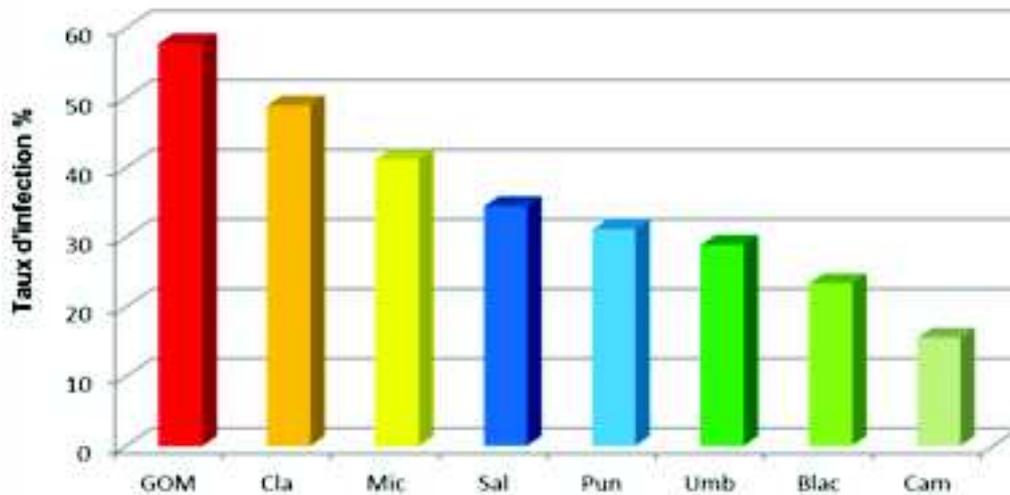


Figure 10 : Niveau de sensibilité des espèces d'eucalyptus vis-à-vis des trois souches bactériennes in planta

L'analyse de la variance révèle une différence très hautement significative du facteur espèce d'eucalyptus (F1) sur le degré de sensibilité vis-à-vis des trois souches d'*Agrobacterium* spp (Annexe 2).

Le test des étendues multiples (LSD) de Fisher au seuil 5 % révèle six groupes homogènes (A, B, C, D, E et F) (Annexe 3).

D'après le tableau 3 et la figure 10, il ressort que l'infection a atteint le plus haut niveau chez *E. gomphocephala* avec un pourcentage de 57,77 % qui appartient individuellement au groupe A. L'espèce *E. cladocalyx* montre une sensibilité avec un pourcentage de 48,88 %, elle appartient individuellement au groupe B suivi par *E. microcorys* avec un pourcentage de 41,11% qui appartient individuellement au groupe C. Pour les espèces *E. saligna*, *E. punctata* et *E. umbellata*, les résultats montrent des sensibilités avec des pourcentages de 34,44 %, 31,11 % et 28,88 % respectivement et sont regroupés dans le même groupe D, suivi par *E. blackey* avec un pourcentage de 23,33 % qui appartient individuellement au groupe E, suivi par *E. camaldulensis* avec le plus faible pourcentage de 15,55% qui appartient individuellement au groupe F.

2.2. Pouvoir pathogène des trois souches d'*Agrobacterium* in planta

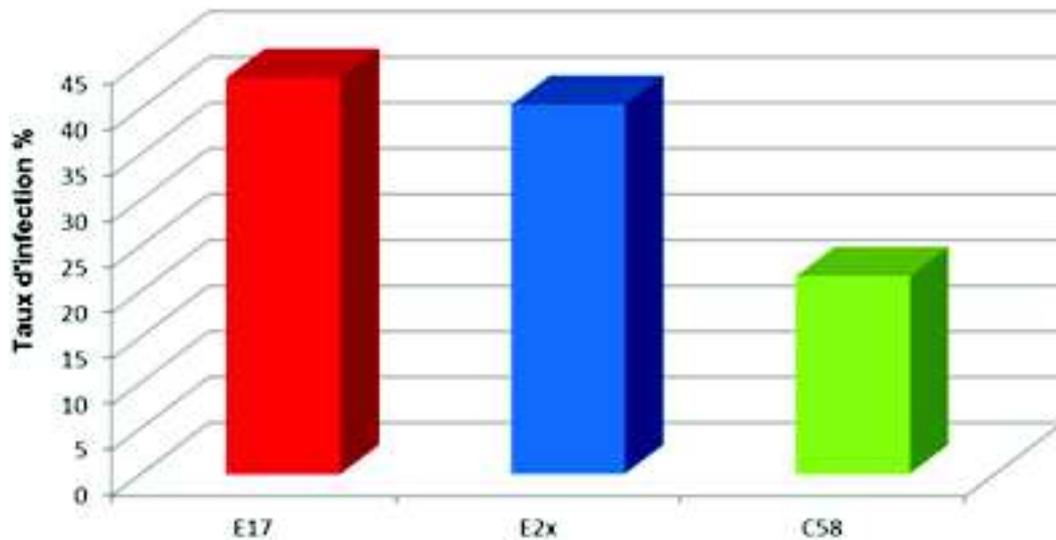


Figure 11 : Niveau de virulence des trois souches d'Agrobacterium in planta

Concernant l'effet du facteur souche (F2), l'analyse de la variance révèle une différence très hautement significative sur le degré de la sensibilité des espèces d'eucalyptus vis-à-vis des souches d'Agrobacterium spp (Annexe 2).

Le test des étendues multiples (LSD) de Fisher au seuil 5 % révèle deux groupes homogènes (A et B) (Annexe 3).

D'après le tableau 3 et la figure 11, il ressort que le taux de pathogénicité le plus élevé a été obtenu par les souches E17 et E2x avec des pourcentages de 43,33% et 40,41% respectivement qui sont regroupés dans le même groupe A suivi par la souche C58 avec le pourcentage le plus faible 21,66 % représentée par le groupe B.

Les résultats suggèrent en effet que les souches E17 et E2x étant les plus virulentes et présentent des capacités de transformation plus importantes par rapport à la souche C58 qui s'est montrée la moins virulente pour les huit espèces d'eucalyptus.

2.3. Taux d'infection des espèces d'eucalyptus inoculées par les trois souches d'Agrobacterium in planta

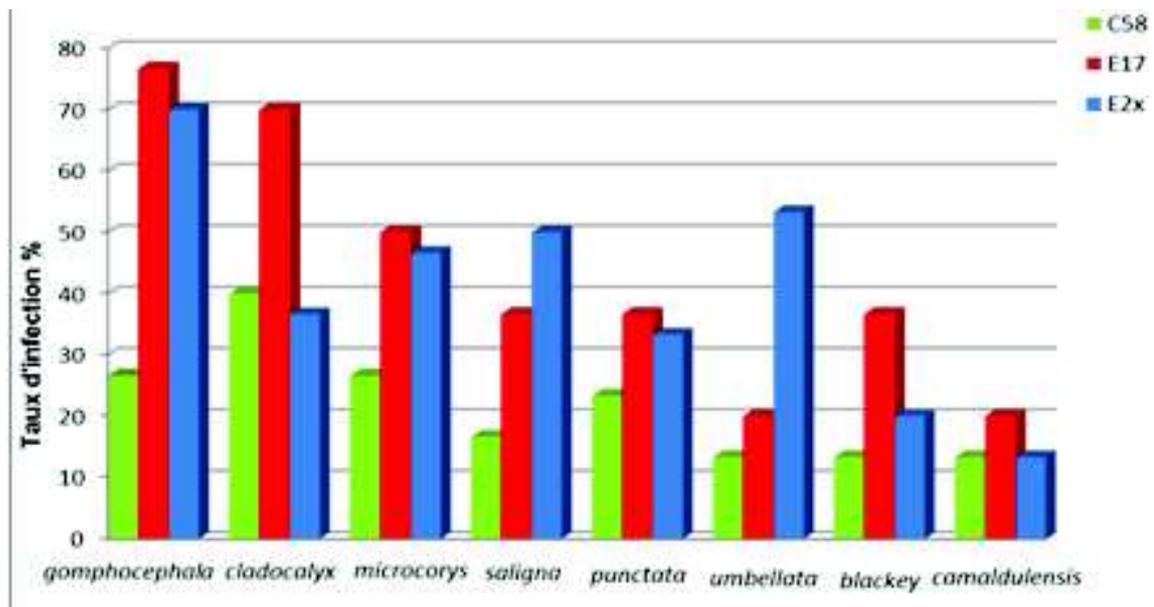


Figure 12 : Taux d'infection des espèces d'eucalyptus inoculées par les trois souches d'Agrobacterium in planta

Concernant l'effet de l'interaction des deux facteurs étudiés espèces-souches (F1xF2), l'analyse de la variance révèle une différence hautement significative sur le degré de la sensibilité des espèces d'eucalyptus vis-à-vis des souches d'Agrobacterium spp (Annexe 2).

Le test des étendues multiples (LSD) de Fisher au seuil 5 % révèle huit groupes homogènes (A, B, BC, C, CD, D, DE et E).

D'après le tableau 3 et la figure 12, il ressort que le taux d'infection le plus élevé a été enregistré par la souche E17 pour *E. gomphocephala* avec un pourcentage de 76,66 % suivi par la même espèce *E. gomphocephala* inoculée par la souche E2x et *E. cladocalyx* inoculé par E17 qui ont enregistré le même pourcentage de 70 %. Ils sont regroupés dans le même groupe A.

Pour l'espèce, *E. umbellata* inoculée par E2x, le pourcentage d'infection atteint 53,33 %, suivies par les espèces *E. microcorys* inoculée par E17 et E.

saligna inoculée par E2x qui ont enregistré le même pourcentage de 50 % et *E. microcorys* inoculé par E2x avec un pourcentage de 46,66 % et sont regroupés dans le même groupe B.

Pour l'espèce *E. cladocalyx*, inoculée par C58, le pourcentage d'infection atteint 40 %, elle forme le groupe individuel BC.

Les espèces *E. cladocalyx* inoculée par E2x, *E. punctata* inoculée par E17, *E. saligna* inoculée par E17 et *E. blackey* inoculée par E17 ont enregistré le même pourcentage de 36,66 % suivies par *E. punctata* inoculé par E2x avec un pourcentage de 33,33 %, ils sont regroupés dans le même groupe C.

Les espèces *E. gomphocephala* inoculée par C58 et *E. microcorys* inoculée par C58 ont enregistré le même pourcentage de 26,66% et forment le même groupe CD.

Pour *E. punctata* inoculé par C58, le pourcentage d'infection a atteint 23,33 % suivi par les espèces *E. umbellata* inoculée par E17, *E. blackey* inoculée par E2x et *E. camaldulensis*

inoculée par E17 ont enregistré le même pourcentage de 20% et sont regroupés dans le même groupe D.

Pour l'espèce *E. saligna* inoculée par C58, le pourcentage d'infection a atteint 16,66 %, elle forme le groupe individuel DE.

Les espèces *E. blackey* inoculée par C58, *E. camaldulensis* inoculée par E2x, *E. umbellata* inoculée par C58 et *E. camaldulensis* inoculée par C58 ont enregistré le même et le plus faible pourcentage 13,33 % et sont regroupés dans le même groupe E.

2.4. Discussion

D'après l'étude de la sensibilité des huit espèces d'eucalyptus vis-à-vis des trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, les résultats montrent une variabilité de réponses entre les différentes souches sur diverses espèces.

Les résultats obtenus montrent que les huit espèces d'eucalyptus sont sensibles aux trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et développent des tumeurs. Nous avons pu reproduire les symptômes du crown gall avec les deux souches isolées à partir l'eucalyptus et donc nous avons pu réaliser une étape essentielle des postulats du koch (la reproduction des symptômes).

Toutes les espèces d'eucalyptus inocuées par les trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* ont répondu positivement à l'inoculation et développent des tumeurs, ce qui indique leur statut transgénique, c'est-à-dire que l'ADN-T a été transféré et intégré dans les génomes des différentes espèces d'eucalyptus. L'induction de tumeur est suivie par une surproduction de l'auxine et de la cytokinine, caractérisant un phénotype tumoral, ceci confirme la virulence de ces souches qui présentent des performances pour la transformation génétique.

Les résultats montrent que l'espèce *E. gomphocephala* se présente comme étant la plus sensible par rapport à la souche E17 ; alors que l'espèce *E. camaldulensis* semble être moins sensible que les sept autres espèces inocuées. Nos résultats concordent avec ceux de Baouch (2007), qui a obtenu des résultats montrant que l'espèce *E. cladocalyx* est plus sensible par rapport à *E. camaldulensis* qui s'est montrée moins sensible.

Concernant la souche la plus virulente et la plus performante en termes de transformation, les résultats montrent que la souche E17 s'est montrée la plus virulente par rapport à la souche E2x et la souche C58 s'est montrée moins virulente par rapport au pourcentage d'infection. Ainsi, les deux souches E17 et E2x provoquent les tumeurs les plus volumineuses chez quelques espèces d'eucalyptus.

En effet, les souches E17 et E2x sont originellement isolées à partir l'eucalyptus alors que la souche C58 est isolée à partir de *Prunus*.

Plusieurs recherches ayant pour objectif la transformation génétique des eucalyptus par *Agrobacterium* spp. ont été menées (Mullins et al., 1997 ; Mac Rae et Van Staden, 1999 ; Chen et al., 2001). Pour ces mêmes buts, Machado et al., (1997), ont signalé la variabilité de la sensibilité des hybrides d'*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* vis-à-vis des souches d'*Agrobacterium*. Sur d'autres plantes hôtes, des niveaux variables de la sensibilité ont été décrits (Süle et al., 1994 ; Beneddra et al., 1996 ; Karakaya et Ozcan, 2000, 2001 ; Mc Kenna et Epstein, 2003 ; Sparrow et al., 2004).

Moore (1976), a montré que l'infection chez quelques espèces de *Prunus* est considérablement importante lorsque l'inoculation est effectuée en Juin, Juillet et Août. En

effet, la température élevée favorise la sensibilité à *Agrobacterium*, il est important donc de rappeler que notre expérimentation s'est faite dans les mêmes conditions de températures et nos inoculations ont été réalisées au cours de la même période.

D'après Burr et al., (1998), certaines variétés de vigne sont résistantes vis-à-vis de certaines souches d'*Agrobacterium* mais sensibles à d'autres. La variabilité de la sensibilité est déterminée par les facteurs génétiques liés à la bactérie et au végétal. Sparrow et al., (2004), estiment que les facteurs génétiques sont à l'origine de cette variabilité indiquant leur responsabilité à 95%, cependant, la variabilité de la sensibilité des plantes à *Agrobacterium* spp. est affectée à un taux de 5% par les facteurs environnementaux. D'un autre côté, la sensibilité vis-à-vis d'*Agrobacterium* spp. présente en fait, une variabilité marquante en fonction de l'origine géographique (Pionnat et al., 1999). Il s'avère d'après cette dernière étude que certaines espèces végétales peuvent se montrer très résistantes dans un pays et fortement sensibles dans d'autres. Tel est le cas de l'abricotier assez résistant au Maroc et remarquablement sensible dans d'autres pays tel que la Tunisie (Trigui, 1984) et la Turquie (Aysan et al., 2003). Cette variabilité au niveau de la résistance de certaines espèces ou cultivars peut être expliquée par la nature du sol et plus particulièrement par les caractéristiques physico-chimiques (Krimi et al., 2002). En effet, certains sols sont présumés conductibles au crown gall, alors que d'autres se montrent comme étant suppressifs (Krimi et al., 2002).

Nous avons dégagé de notre étude que les huit espèces d'eucalyptus étudiées ont réagi positivement à l'inoculation artificielle avec les trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* plantaet se présentent comme étant sensibles à la maladie du crown gall avec une forte variabilité par rapport au pourcentage d'infection et aux caractères morphologiques des tumeurs (diamètre et poids).

3. Virulence et performance des trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* in planta

Afin de déterminer la virulence des trois souches d'*Agrobacterium* spp. les plants ayant répondu positivement à l'inoculation artificielle ont subi des mesures de poids et de diamètre des tumeurs (Figure13).

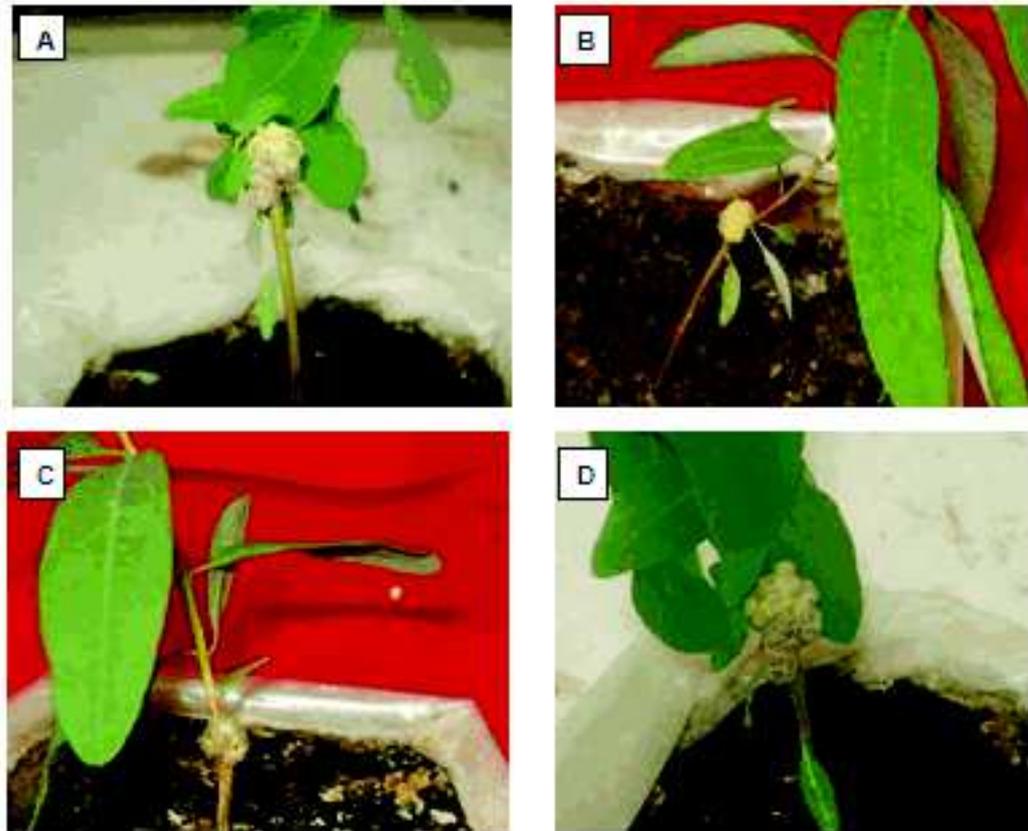


Figure 13: Morphologie des tumeurs induites par E2x, E17 et C58 sur quelques espèces d'eucalyptus. A- *E.gomphocephala* (E2x), B- *E. punctata* (58), C- *E. microcorys*(E17), D- *E. saligna* (E2x).

3.1. Résultats des moyennes de poids des tumeurs causées par les trois souches sur les six espèces d'eucalyptus

Les résultats des moyennes de poids sur les six espèces d'eucalyptus et par les trois souches d'*Agrobacterium* ont été hétérogènes, le poids varie entre 0,009 g et 0,111 g. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 4.

Tableau 4: Résultats relatifs des moyennes de poids des tumeurs

Facteur	Effectif	Moyenne (g)	Ecart type	Groupes homogènes	Probabilité
Espèces (F1) Cladocalyx Gomphocephala Microcorys Punctata Saligna Umbellata	44 52 37 28 31	0,0567 0,0629	0,0132 0,0155	A, B, C	0,0009 0,0123
Souches (F2)) C58 E17 E2x	44 87 87	0,0262 0,0374	0,0552 0,0063	C, B, A	0,0129
Espèces x Souches (F1 x F2)) Clad, C58 Clad, E17 Clad, E2x Gom, C58 Gom, E17 Gom, E2x Mic, C58 Mic, E17 Mic, E2x Pun, C58 Pun, E17 Pun, E2x Sal, C58 Sal, E17 Sal, E2x Umb, C58 Umb, E17 Umb, E2x	12 21 11 08 23	0,0389 0,0470 0,0959	0,0135 0,0155 0,0189	D A D E E E D E E E E C D D E D E D E	0,0208 0,0135 0,0232 0,0202

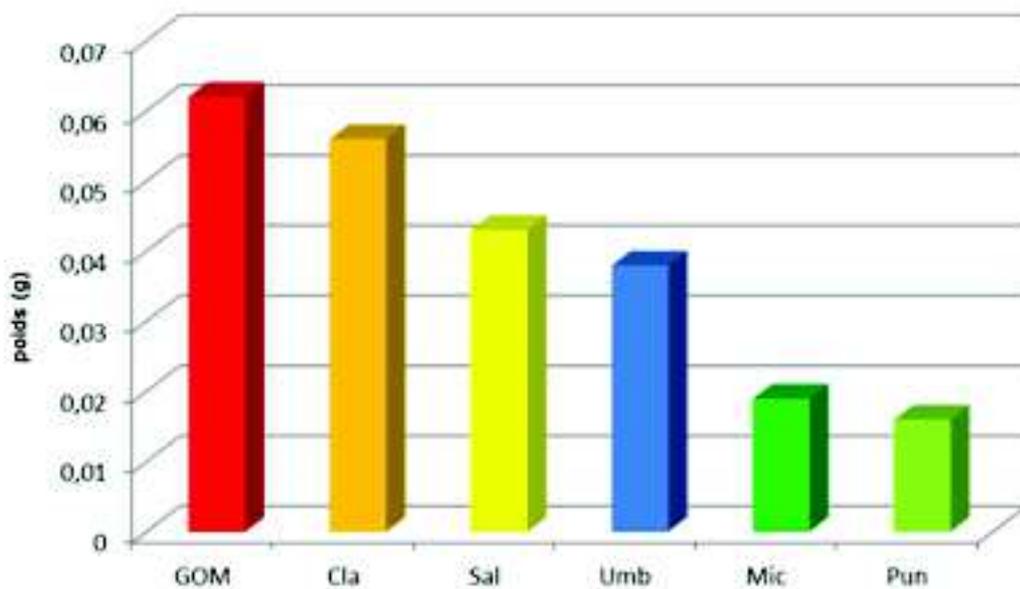


Figure 14 : Moyennes des poids des tumeurs causées sur les six espèces d'eucalyptus

Concernant le paramètre du poids, l'analyse de la variance révèle une Différence très hautement significative du facteur espèce (F1) sur la moyenne du poids (Annexe 2).

Le test des étendues multiples (LSD) de Fisher au seuil 5 % révèle trois groupes homogènes (A, B et C) (Annexe 3).

D'après le tableau 4 et la figure 14, il ressort que le poids le plus élevé a été enregistré par E. gomphocephala avec une moyenne de 0,0629 g, suivi par E. cladocalyx avec une moyenne de 0,0567 g et sont regroupés dans le groupe A.

Pour E. saligna, la moyenne de poids a atteint 0,0434 g suivi par E. umbellata avec une moyenne de 0,0387 g et sont regroupés dans le groupe B.

Les moyennes les plus faibles sont enregistrées pour les espèces *E. microcorys* et *E. punctata* avec des moyennes de 0,0192 g et 0,0165 g respectivement et sont regroupés dans le groupe C.

Concernant le facteur souche (F2), l'analyse de la variance révèle une différence significative sur la moyenne du poids (Annexe 2).

Le test des étendues multiples (LSD) de Fisher au seuil 5 % révèle trois groupes homogènes (A, B et C)(Annexe 3).

D'après le tableau 4 et la figure 15, il ressort que le poids le plus élevé a été enregistré par la souche E2x avec une moyenne de 0,0552 g qui appartient individuellement au groupe A

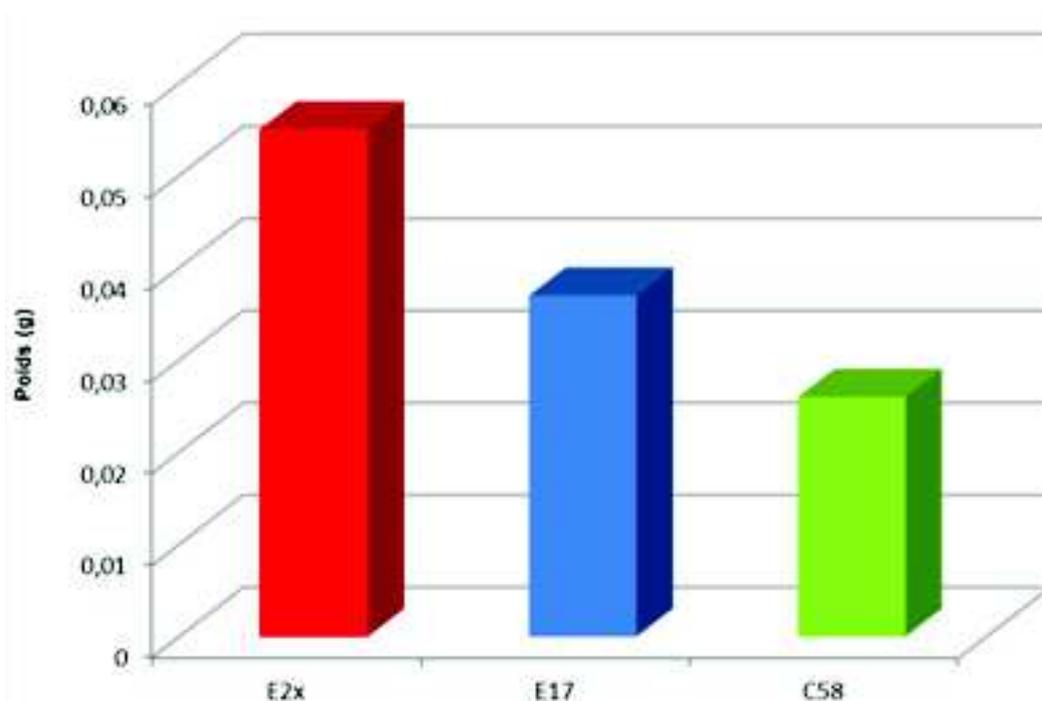


Figure 15 : Moyennes des poids des tumeurs causées par les trois souches bactériennes

suivi par la souche E17 avec une moyenne de 0,0374 g qui appartient individuellement au groupe B. Les moyennes de poids les plus faibles sont enregistrées par la souche C58 avec une moyenne de 0,0262 g inclus dans le groupe C.

Concernant l'effet de l'interaction des deux facteurs espèces-souches (F1xF2) sur le paramètre de poids, l'analyse de la variance révèle une différence significative (Annexe 2).

Le test des étendues multiples (LSD) de Fisher au seuil 5 % révèle six groupes homogènes (A, B, C, D, DE et E).

D'après le tableau 4 et la figure 16, il ressort que le poids le plus élevé a été enregistré par la souche E2x sur *E. gomphocephala* avec 0,111 g représenté individuellement par le groupe A, suivi par la même souche E2x sur *E. cladocalyx* avec 0,091 g représenté individuellement par le groupe B, suivi par la souche E17 sur *E. saligna* avec 0,0657 g représenté individuellement par le groupe C.

Pour *E. gomphocephala* infecté par E17, le poids a atteint 0,0528 g, suivi par *E. saligna* infecté par E2x avec 0,0491g, suivi par *E. cladocalyx* infecté par E17 avec 0,0474 g et sont regroupés dans le même groupe D.

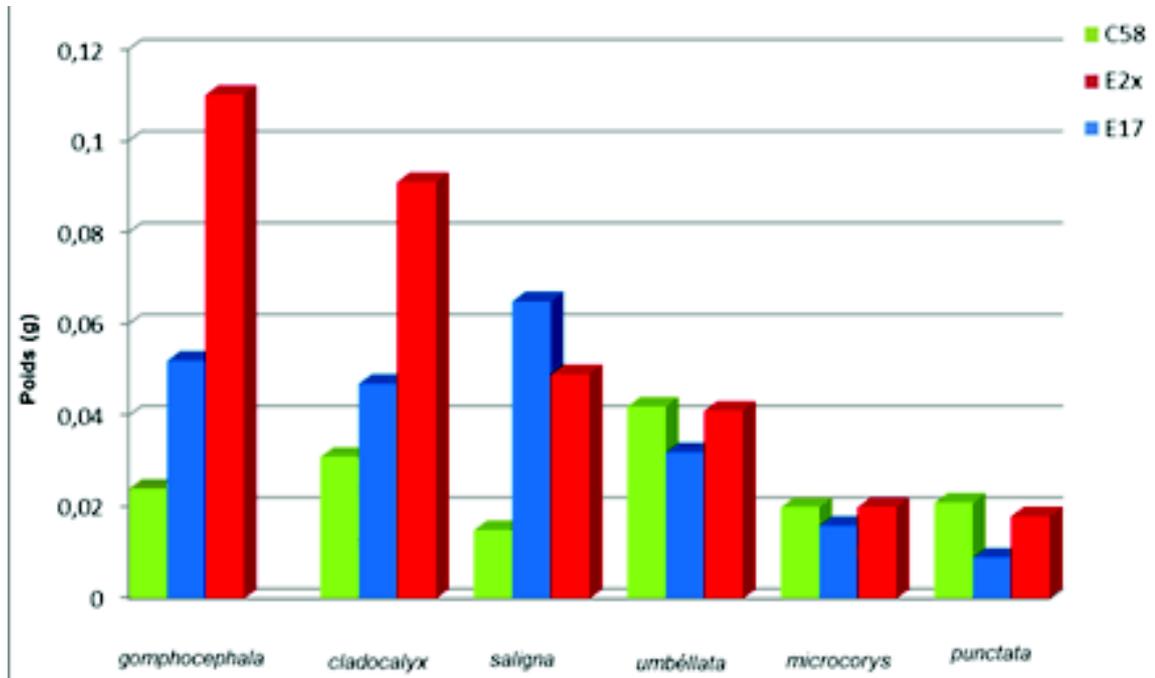


Figure 16 : Moyennes des poids des tumeurs causées par les trois souches bactériennes sur les six espèces d'eucalyptus

Pour *E. umbellata* infecté par C58, le poids a atteint 0,0427 g, suivi par *E. umbellata* infecté par E2x avec 0,0414 g, *E. umbellata* infecté par E17 avec 0,0321 g. Pour *E. cladocalyx* infecté par C58, le poids a atteint 0,0319 g, suivi par *E. gomphocephala* infecté par C58 avec 0,0243 g et sont regroupés dans le groupe DE.

Pour *E. punctata* infecté par C58, le poids a atteint 0,0217 g, suivi par *E. microcorys* infecté par C58 avec 0,0208 g, *E. microcorys* infecté par E2x avec 0,0202 g. Pour *E. punctata* infecté par E2x, le poids a atteint 0,0182 g, suivi par *E. microcorys* infecté par E17 avec 0,0165 g, *E. saligna* infecté par C58 avec 0,0156 g et *E. punctata* avec 0,0098 g qui sont regroupés dans le groupe E.

3.2. Résultats des moyennes de diamètre des tumeurs causées par les trois souches sur les six espèces d'eucalyptus

Les résultats des moyennes de poids sur les six espèces d'eucalyptus et par les trois souches d'Agrobacterium ont été hétérogènes, le diamètre entre 2,09 mm et 5,64 mm. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 5: Résultats relatifs des moyennes de diamètre des tumeurs

Pouvoir pathogène et performances de transformation de trois souches d'Agrobacterium tumefaciens in vitro et in planta sur quelques espèces d'eucalyptus

Facteur	Effectif	Moyenne (mm)	Ecart type	Groupes homogènes	Probabilité
Espèces (F1) Cladocalyx Gomphocephala Microcorys Punctata Saligna umbellata	44 52 37 28 31	2,928 4,360 2,507 2,412 3,803	0,224 0,123 0,175 0,153 0,262	A B C	0,0000
Souches(F2) C58 E17 E2x	74 87 87	2,805 3,419 3,062	0,155 0,145 0,145	A B A	0,0000
Espèces par souche (F1xF2) Clad, C58 Clad, E17 Clad, E2x Gom, C58 Gom, E17 Gom, E2x Mic, C58 Mic, E17 Mic, E2x Pun, C58 Pun, E17 Pun, E2x Sal, C58 Sal, E17 Sal, E2x Umb, C58 Umb, E17 Umb, E2x	12 21 11 08 23	2,838 3,552 5,021 2,900 2,556	0,190 0,156 0,190 0,142 0,140	EF EF EF EF F EF E C D E E D	0,0000 0,0000 0,0000 0,0000 0,0000

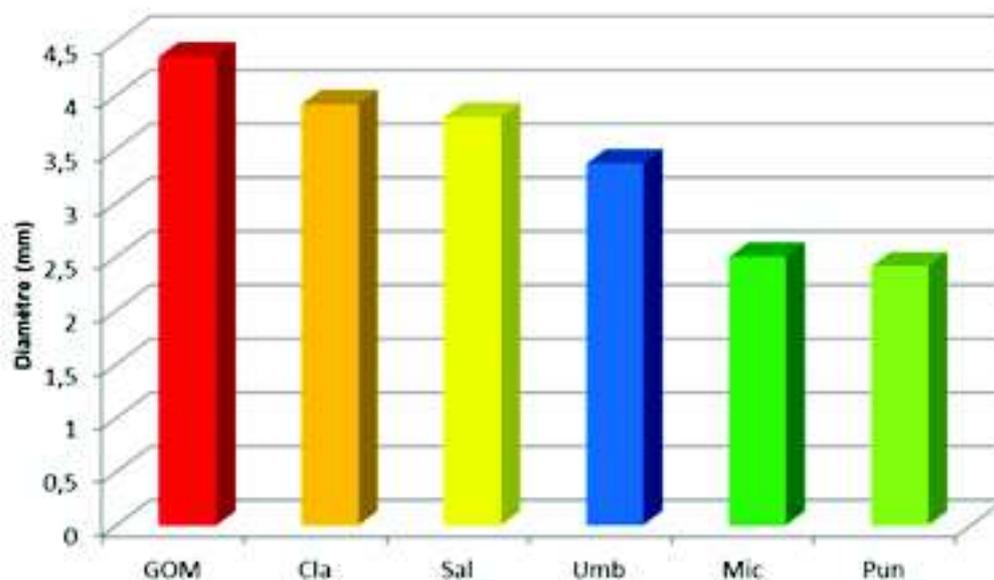


Figure 17 : Moyennes des diamètres des tumeurs causées sur les six espèces d'eucalyptus

Concernant le paramètre diamètre, l'analyse de la variance révèle une différence très hautement significative du facteur espèce (F1) sur la moyenne du diamètre (Annexe 2).

Le test des étendues multiples (LSD) de Fisher au seuil 5 % révèle quatre groupes homogènes (A, B, C et D) (Annexe 3).

D'après le tableau 5 et la figure 17, il ressort que le diamètre le plus élevé a été enregistré par *E. gomphocephala* avec une moyenne de 4,36 mm appartient individuellement au groupe A.

Pour *E. cladocalyx*, la moyenne du diamètre a atteint 3,928 mm, suivi par *E. saligna* avec une moyenne de 3,803 mm et sont inclus dans le groupe B.

Pour *E. umbellata*, le diamètre a atteint 3,375 mm, il appartient individuellement au groupe C.

Les moyennes de diamètre les plus faibles sont enregistrées pour les espèces *E. microcorys* et *E. punctata* avec des moyennes de 2,507 mm et 2,413 mm respectivement et sont regroupés dans le groupe D.

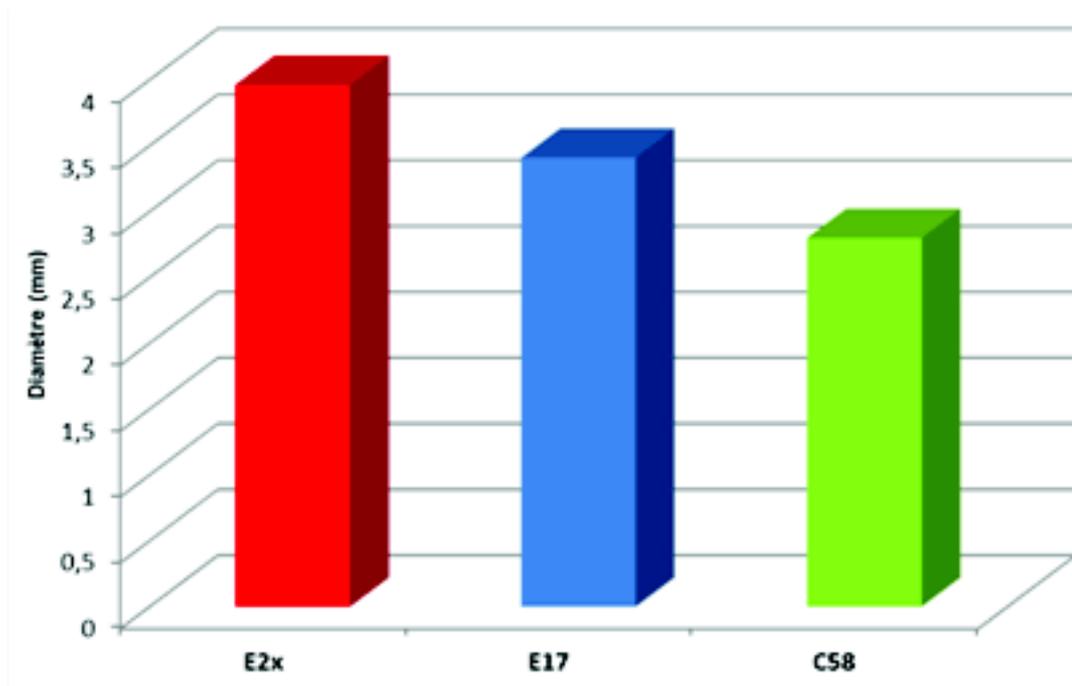


Figure 18 : Moyennes des diamètres des tumeurs causées par les trois souches bactériennes

Concernant le facteur souche (F2), l'analyse de la variance révèle une différence très hautement significative sur la moyenne du diamètre (Annexe 2).

Le test des étendues multiples (LSD) de Fisher au seuil 5 % révèle trois groupes homogènes (A, B et C) (Annexe 3).

D'après le tableau 5 et la figure 18, il ressort que le diamètre le plus élevé a été enregistré par la souche E2x avec une moyenne de 3,968 mm, elle appartient individuellement au groupe A. suivi par la souche E17 avec une moyenne de 3,419 mm qui appartient individuellement au groupe B.

Les moyennes de diamètre les plus faibles sont enregistrées par la souche C58 avec une moyenne de 2,805 mm inclus dans le groupe C.

Concernant l'effet de l'interaction des deux facteurs espèces-souches (F1xF2) sur le paramètre du diamètre, l'analyse de la variance révèle une différence significative (Annexe 2).

Le test des étendues multiples (LSD) de Fisher au seuil 5 % révèle sept groupes homogènes (A, B, C, D, E, EF et F).

D'après le tableau 5 et la figure 19, il ressort que le diamètre le plus élevé a été enregistré par la souche E2x sur *E. gomphocephala* avec 5,64 mm représenté individuellement par le groupe A, suivi par la même souche E2x sur *E. cladocalyx* avec 5 mm représenté, individuellement par le groupe B.

Pour *E. gomphocephala* infecté par la souche E17 le diamètre a atteint 4,5 mm suivi par *E. saligna* infecté par E17 avec 4,4 mm et sont regroupés dans le groupe C.

Pour *E. saligna* infecté par E17 le diamètre a atteint 4 mm, suivi par *E. cladocalyx* infecté par E17 avec 3,95 mm et *E. umbellata* infecté par E2x avec 3,87 mm qui sont regroupés dans le même groupe D

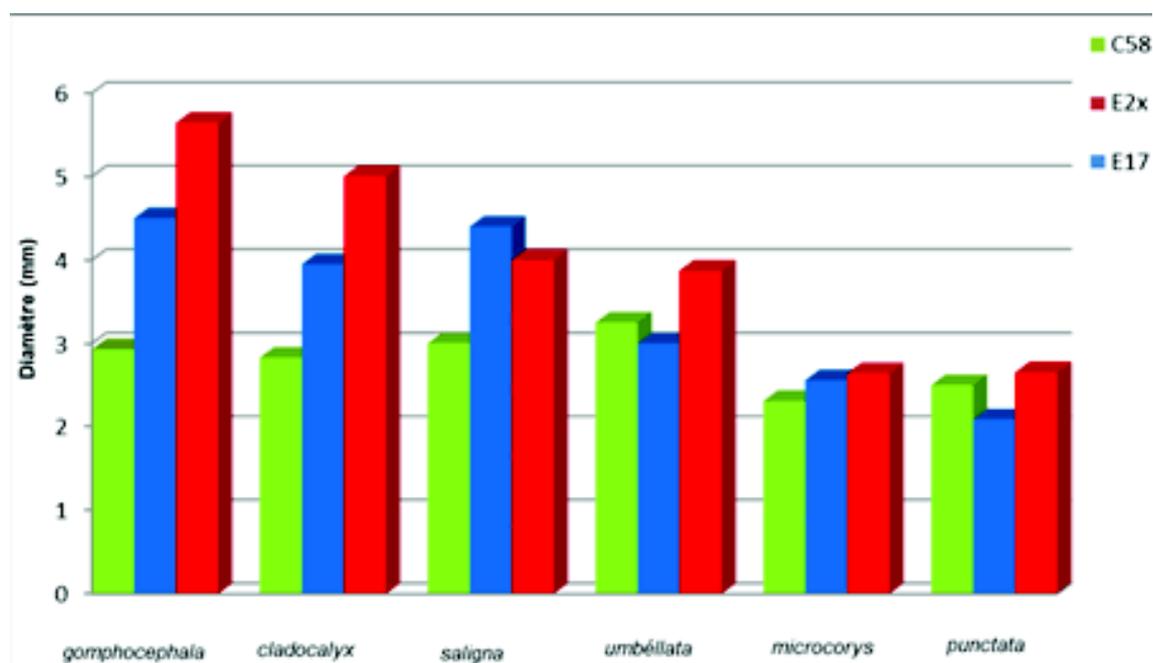


Figure 19 : Moyennes des diamètres des tumeurs causées par les trois souches bactériennes sur les six espèces d'eucalyptus

Pour *E. umbellata* infecté par C58 et E17 le diamètre a atteint 3,25 mm et 3mm respectivement, suivi par *E. saligna* infecté par C58 avec 3 mm, *E. gomphocephala* infecté par C58 avec 2,937 mm et *E. cladocalyx* infecté par C58 avec 2,83 mm et sont regroupés dans le groupe E.

Pour *E. punctata* infecté par E2x le diamètre a atteint 2,65 mm, suivi par *E. microcorys* infecté par E2x et E17 avec 2,64 mm et 2,56 mm respectivement, *E. punctata* infecté par C58 avec 2,5 mm et *E. microcorys* avec 2,31 mm et sont regroupés dans le groupe EF.

Le diamètre le plus faible a été enregistré par *E. punctata* infecté par E17 avec 2,09 mm représenté individuellement par le groupe F.

3.3. Discussion

D'après l'étude de la virulence des trois souches d'Agrobacterium sur les six espèces d'eucalyptus, les résultats montrent une variabilité importante des réponses, les tumeurs

induites sur *E. gomphcephala* et *E. cladocalyx* par les deux souches E2x et E17 sont plus volumineuses par rapport à celles formées sur *E. microcorys* et *E. punctata*. Mis à part *E. punctata*, chez les autres cinq espèces, les souches E2x et E17 isolées d'eucalyptus se sont montrées significativement plus virulentes et produisent les tumeurs les plus importantes évaluées sur la base du poids et du diamètre par rapport à la souche C58 isolée initialement de *Prunus* spp. qui s'est montrée moins virulente.

Les souches d'*Agrobacterium* spp. se sont souvent révélées préférentielles à l'égard des espèces d'où elles ont été isolées. En effet, la souche C58, originellement isolée de *Prunus* est fréquemment plus virulente chez les variétés de ce genre que chez d'autres plantes (pommier, pêcher, vigne, rosacées) (Cervera et al., 1998). Ce phénomène a été caractérisé en phytopathologie par le concept de la spécificité d'hôte.

Stomp et al., (1990), étudiant la résistance de onze espèces de pin ont conclu qu'il existe une spécificité dans l'interaction hôte-pathogène, ils ont d'opinion que la fréquence de la formation des tumeurs dépend largement de l'espèce, de l'âge de la plante et de la souche bactérienne.

Les souches E2x, E17 et C58 ont été capables d'infecter les espèces d'eucalyptus, cependant les souches locales dont l'hôte d'origine est l'eucalyptus (E2x et E17) sont plus virulentes que la souche de référence C58. Nous pouvons par conséquent considérer les deux premières souches comme étant hypervirulentes et hyperperformantes pour la transformation par rapport à la souche de référence, du fait que les souches locales répondent à l'inoculation plus rapidement et donnent des tumeurs morphologiquement plus importantes. Les travaux de Cervera et al., (1998) ont considéré que les souches d'*Agrobacterium* spp. sont hypervirulentes en fonction de la rapidité de la formation des tumeurs, leur morphologie (taille et poids) et les nécroses progressives observées. Dans notre étude, nous avons remarqué à la fin de l'expérimentation que les tumeurs les plus volumineuses présentaient des signes de nécroses.

Des travaux d'amélioration des eucalyptus par le génie génétique ont pour objectif l'incorporation de nouvelles caractéristiques comme la résistance aux herbicides ou aux insectes, la stérilité mâle, la modification de la quantité de lignine pour faciliter l'extraction de la pâte à papier et l'amélioration de l'enracinement pour accroître le potentiel de productivité de cette importante essence (Jouanin et al., 1993; Teulières et al., 1994).

Le faible nombre de résultats positifs de transformation obtenus chez les eucalyptus, malgré le grand nombre de travaux entrepris chez de nombreuses espèces du genre, s'explique surtout par leur faible aptitude à régénérer (Mac Rae et Van Staden, 1999). Cependant, plusieurs travaux entrepris par de grands groupes privés (Shell, ATC, Forbio, Ence, Aracruz cellulose, Nippon Paper Industries...), mais dont les résultats détaillés ne sont pas accessibles car déposés dans le cadre de brevets, ont abouti à l'obtention de plantes transformées chez différentes espèces d'eucalyptus (Pilate et al., 2002).

Machado et al., (1997), ont évalué la sensibilité d'eucalyptus hybride *E. grandis* x *E. urophylla* à douze souches sauvages d'*Agrobacterium tumefaciens* in vitro. Les résultats ont montré différents degrés de virulence, en fonction de la souche testée par rapport au pourcentage d'infection et la morphologie des tumeurs. Tous les plants inoculés par les douze souches sauvages d'*Agrobacterium tumefaciens* ont répondu positivement à l'inoculation avec un taux d'infection atteint de 87 % pour la souche A208 avec un diamètre de tumeur de 2 mm.

Mullins et al., (1997), ont élaboré un protocole fiable pour la régénération d'*Eucalyptus camaldulensis* à partir d'explants de feuilles cultivées in vitro.

Ils ont réussi à introduire via *Agrobacterium tumefaciens* un gène de résistance à la kanamycine et le gène rapporteur b-glucuronidase (GUS).

Prakash et Gurumurthi (2009), ont élaboré un protocole de transformation efficace pour *Eucalyptus tereticornis* Sm. via *Agrobacterium tumefaciens* en utilisant des explants de cotylédons et l'hypocotyle. Les cotylédons précultivés et explants hypocotyles ont été co-cultivées avec *Agrobacterium tumefaciens* souche LBA 4404 hébergeant le vecteur binaire contenant les pBI121 uidA et la néomycine phosphotransférase. Ils ont obtenu des pousses résistantes à la kanamycine, ainsi qu'une forte activité β -glucuronidase détectée chez les plantes transformées par les tests histochimiques.

En effet, les souches locales d'*Agrobacterium tumefaciens* isolées à partir l'eucalyptus répondent à l'inoculation plus rapidement et donnent des tumeurs morphologiquement plus importantes. Par ailleurs, la formation de cals racinaires de type « Hairy root » in vitro, nous permet de les suggérer comme présentant des performances intéressantes pour la transformation.

Ces données suggèrent fortement qu'une spécificité de l'interaction hôte-pathogène existe dans ce cas. Nos résultats concordent avec ceux d'Ohta (1984), qui a montré que les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* isolées de chrysanthème et de marguerite sont plus virulentes à l'égard de ces espèces par rapport au rosier. Par ailleurs, les souches isolées de rosier sont plus virulentes sur cette plante comparée aux deux autres espèces. Ainsi, les deux souches E17 et E2X d'*Agrobacterium tumefaciens* isolées à partir l'eucalyptus présentent des performances intéressantes de transformation génétique par rapport aux symptômes des tumeurs produits ; dimensions des tumeurs et présence de cals racinaires de type « hairy root ».

Conclusion

La demande mondiale de produits forestiers augmente à un rythme accéléré. Bien que les programmes traditionnels d'amélioration des plantations portent leurs fruits dans le monde industrialisé, les efforts ont été insuffisants dans les pays en développement qui risquent d'être victimes des pénuries les plus graves. Du fait de l'amenuisement des terres appropriées et de l'exigence croissante de pratiques respectueuses de l'environnement, il est impératif que la recherche porte davantage sur l'accroissement de la productivité (courtes révolutions et indice élevé de production) et de la qualité (bois de qualité supérieure, forme optimale des tiges, uniformité et résistance au stress environnemental et aux maladies) des essences d'importance économique telles que l'eucalyptus (Watt et al., 1995).

Le crown gall est la maladie prédominante la plus rencontrée dans les pépinières d'arbres fruitiers, de plantes ornementales, de la vigne et d'arbres forestiers dans plusieurs régions du monde affectant fortement le rendement commercial (Poncet et al., 1996 ; Burr et al., 1999 ; Zoina et al., 2001 ; Krimi et al., 2006). Le meilleur moyen de contrôle du crown gall est la prévention et donc la détection de la bactérie pathogène dans les sols prévus pour les pépinières. Une bonne prophylaxie peut être obtenue par plantation de plants sains. Afin d'éviter la plantation en sol contaminé, il est nécessaire de s'assurer de l'absence d'*Agrobacterium* pathogènes dans les sols. Enfin la méthode de lutte la plus prometteuse c'est la recherche des espèces résistantes et/ou l'amélioration génétique de la résistance des espèces vis-à-vis d'*Agrobacterium* spp.

L'eucalyptus est une essence forestière sur laquelle le crown gall constitue une véritable menace surtout en pépinières en raison des pratiques culturales qui favorisent son déclenchement et son développement.

Le présent travail est une contribution à l'étude du pouvoir pathogène de trois souches d'*Agrobacterium* spp. sur l'eucalyptus et par là même de rechercher une résistance chez quelques espèces d'eucalyptus, vis-à-vis du crown gall, ainsi qu'une contribution à l'étude de la performance des trois souches inoculées sur les différentes espèces d'eucalyptus testées pour la mise en évidence d'une éventuelle utilisation de ces souches en biotechnologie (transformation génétique).

Les résultats obtenus à partir l'essai *in vitro* montrent une grande variabilité dans les réponses des espèces d'eucalyptus testées vis-à-vis des trois souches bactériennes d'*Agrobacterium tumefaciens*. Mis à part les espèces *E. camaldulensis* et *E. blackey* qui ont montré une faible sensibilité avec des taux de 18,33 et 25 % respectivement, les six autres espèces se sont révélées sensibles où l'espèce *E. gomphocephala* se montrait la plus sensible avec un taux de 65%, suivie par les espèces *E. cladocalyx* avec 53,33%, *E. microcorys* avec 48,33%, *E. saligna* avec 40%, *E. punctata* avec 35% et *E. umbellata* avec 33,33%.

Les résultats obtenus à partir l'essai *in planta* montrent une grande variabilité dans les réponses des espèces d'eucalyptus testées vis-à-vis des trois souches bactériennes d'*Agrobacterium tumefaciens*. Mis à part les espèces *E. camaldulensis* et *E. blackey* qui ont montré une faible sensibilité avec des taux de 15,55 et 23,33 % respectivement, les six autres espèces se sont révélées sensibles où l'espèce *E. gomphocephala* se montrait la plus sensible avec un taux de 57,77%, suivie par les espèces *E. cladocalyx* avec 48,88%, *E.*

microcorys avec 41,11%, *E. saligna* avec 34,44%, *E. punctata* avec 31,11% et *E. umbellata* avec 28,88%.

La comparaison entre les taux d'infection d'une même espèce de l'essai *in vitro* et *in planta*, montre que le taux d'infection enregistré par l'inoculation *in vitro* est toujours élevé par rapport au taux d'infection enregistré par l'inoculation *in planta*, ceci est dû aux conditions contrôlées (température, humidité et photopériode) que procure les techniques de la culture *in vitro* qui favorisent mieux l'infection par *Agrobacterium tumefaciens*.

D'après les résultats de cette étude pour les deux essais *in vitro* et *in planta*, les espèces *E. camaldulensis* et *E. blackey* semblent des espèces intéressantes par rapport aux taux d'infection faibles qu'elles ont enregistré et devront être exploitées en sylviculture. Les six autres espèces testées ; *E. gomphocephala*, *E. cladocalyx*, *E. microcorys*, *E. saligna*, *E. punctata* et *E. umbellata* semblent des espèces sensibles au crown gall et devront être évitées lors de l'installation de nouvelles pépinières sur des sols conductibles.

Il ressort des résultats également que les souches E2x, E17 et C58 ont été capables d'infecter les espèces d'eucalyptus, cependant les deux souches locales dont l'hôte d'origine est l'eucalyptus (E2x et E17) sont plus virulentes que la souche de référence C58 isolée de prunier par rapport à la taille des tumeurs (poids et diamètre). Le poids le plus élevé a été enregistré par la souche E2x avec une moyenne de 0,055 g, suivie par la souche E17 avec 0,037 g, et la souche C58 avec la moyenne la plus faible de 0,026 g. Concernant le paramètre diamètre, nous avons enregistré le diamètre le plus élevé par la souche E2x avec une moyenne de 3,968 mm, suivie par la souche E17 avec 3,419 mm, et la souche C58 avec la moyenne la plus faible de 2,805 mm.

Nous pouvons par conséquent considérer les deux souches isolées localement d'eucalyptus comme étant hypervirulentes et hyperperformantes pour la transformation génétique par rapport à la souche de référence, du fait que ces souches locales répondent à l'inoculation plus rapidement et donnent des tumeurs morphologiquement plus importantes, ainsi dans la majeure partie des cas, ces tumeurs se manifestent sous forme de « hairy root ». Les travaux de Cervera et al., (1998) ont considéré que les souches d'*Agrobacterium* spp. sont hypervirulentes en fonction de la rapidité de la formation des tumeurs, leur morphologie (taille et poids) et les nécroses progressives observées. Dans notre étude, nous avons remarqué à la fin de l'expérimentation que les tumeurs les plus volumineuses présentaient des signes de nécroses. Les deux souches E2x et E17 semblent très intéressantes pour une éventuelle utilisation dans la transformation génétique d'eucalyptus, ces deux souches méritent d'être plus finement étudiées. Des techniques de génie génétique couplées aux méthodes moléculaires permettraient la délétion des gènes oncogéniques de ces souches et par conséquent de leur pathogénicité pour enfin évaluer leurs aptitudes à la transformation.

Références bibliographiques

- Adam, S., 1989. Ph.D. Dissertation, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 154p.
- Adam, S., 1986. Ann. Rech. Sylvi. AFOCEL., pp: 7-21.
- Anonyme. 1989. Food production and inspection branch. In *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck et Van Delden) Conn. Direction des pesticides Agriculture Canad, Ottawa, Ontario, 21p.
- Arbez, M., Lacaze, J.F., 1999. Les ressources génétiques forestières en France Tome 2 : les feuillus, INRA Editions, 408 p.
- Arencibia, A., Molina, P., de la Riva, G., Selman-Housein, G., 1995. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. *Plant Cell Reports*, 14, pp: 305-309.
- Aysan, Y., Sahin, F., Mirik, M., Donmez, M.F., Tekman, H., 2003. First report of crown gall of apricot (*Prunus armeniaca*) caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Turkey. *New Disease Report*. <http://www.bspp.org.uk/ndr/>.
- Banta, L.M., Joerger, R.D., Howitz, V.R., Campbell, A.M., Binns, A.N., 1994. Glu-255 outside the predicted ChvE binding site in VirA is crucial for sugar enhancement of acetosyringone perception by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 176, pp : 3242-3249.
- Baouch, H., 2007. Sensibilité de quelques espèces d'Eucalyptus vis-à-vis du crown gall et variabilité du pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium tumefaciens*. Université de Blida. Mémoire fin d'étude.
- Baron, C., Lioase, M., Zhou, S., Zambryski, P.C., 1997. VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*, is processed to a C-terminal secreted product, VirB1. *Journal of Bacteriology*, 179, pp: 1203-1210
- Batista, A.C., 1951. *Cylindrosporium scoparium* Morgan, var. *Brusiliensis* Batista ex Ciferri, um novofungo do Eucalipto. *Bol. Sec. Agric. Pernambuco*, 18, pp: 188-191.
- Becwar, M.R., Wann, S.R., Johnson, M.A., Verhagen, S.A., Feirer, R.P. Nagmani, R., 1988. Development and characterisation of in vitro embryogenic systems in conifers. In *somatic cell genetics of woody plants*. Ed. M.R. Ahuja, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 1-18.
- Beijerinck, M.W., Van Delden, A., 1902. Über die assimilation des freien stickstoffs durch bakterien. *Zentralblatt für Bakteriologie. Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II*, 9, pp: 3-43.
- Beijersbergen, A., Hooykaas, P.J.J., 1993. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. in: Nester, E.W., & Verma, D.P.S. (Ed.). *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp: 37-49.

- Bélanger, C., Louben, I., Nester, E.W., Dion, P., 1997. Variable efficiency of a Ti plasmid-encoded virA protein in different *Agrobacterium* hosts. *Journal of Bacteriology*, 179, pp: 2305-2313.
- Belaskri, A., 2006. Incidence de la maladie du crown gall de l'Eucalyptus dans les pépinières forestières de l'Ouest algérien. Université de Tlemcen. Thèse de Magister.
- Beneddra, T., Picard, C., Petit, A., Nesme, X., 1996. Correlation between Susceptibility to crown gall and sensitivity to cytokinin in aspen cultivar. *Phytopathology*, 86, pp: 225-231.
- Berjak, P., Mycock, D.J., Wesley-Smith, J., Dumet, D., Watt, M.P. Strategies for in vitro conservation of hydrated germplasm. In *in vitro* conservation of plant growth genetic resources, Ed. M.N. Normah, IPGRI. (sous presse).
- Bevan, M., 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, 12, pp: 8711-8721.
- Bigendako, M.J., 2004. Identification et Zonage des Eucalyptus Globulus au Rwanda. Chemonics International INC., sous le projet ADAR.
- Birch, R.G., 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, pp: 297-326.
- Blakeway, F.C., Herman, B., Watt, M.P., 1993. Establishment of cell suspension cultures of *Eucalyptus grandis* et *E. grandis* x *camaldulensis*. *South African Forestry Journal*, 166, pp: 17-26.
- Bleas, M.J., De Grandis, S.A., Lee, H., Trevors, J.T., 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J. Ind. Microb. Biotechnol.*, 21, pp: 99-114
- Boland, D.J., Brooker, M.I.H., Chippendale, G.M., Hall, N., Hyland, B.P.M., Johnston, R.D., Kleinig, D.A., Turner, J.D., 1984. Arbres de la forêt de l'Australie a. 4e édition. Thomas Nelson & CSIRO, Melbourne.
- Boland, D.J., Sedgley, M., 1986. Stigma and style morphology in relation to taxonomy and breeding systems in *Eucalyptus* and *Angophora* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany*, 34, pp: 569-584.
- Bonar, L., 1942. Studies on some California fungi, II. *Mycologia*, T. 34, pp: 180-192.
- Boote, K.R., 1983. Wood en Australie, Types, propriétés et les utilisations. McGraw-Hill Book Company, Sydney. [ISBN 0074510479](#)
- Bottomley, A.M., 1937. Some of the more important diseases affecting timber plantations in the Transvaal. *S. Afr. J. Sci.*, 33, pp: 373-376.
- Boudy, P., 1952. Guide du forestier en Afrique du nord. Ed. La maison Rustique, Paris, pp : 211-222.
- Bourbout, J., 1936. Uma molestia de (*Eucalyptus*) e de (*Populus*), na Bahia, causada por (*Corticium salmonicolor*). *B et Br. Rodriguésia. IT.*, pp: 301-305.
- Bouvet, J. M., 1999. Les plantations d'eucalyptus. Evolutions récentes et perspectives. *Le Flamboyant*, 49, pp : 4-14.
- Bouzar, H., 1994. Request for judicial concerning the types species of *Agrobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*
-

- Bouzar, H., Daouzli, N., Krimi, Z., Alim, A., Khemici, E., 1991. Crown gall incidence in plant nurseries of Algeria, characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* strains, and biological control of strains sensitive and resistant to agrocin 84. *Agronomie*, 11, pp: 901-908.
- Bouzar, H., Jones, J.B., 2001. *Agrobacterium larrymoorei* sp. Nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, pp: 1023-1026.
- Bouzar, H., Moore, L.W., 1987. Isolation of different *Agrobacterium* biovars from a natural oak savanna and tallgrass prairie. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, pp:717-721.
- Braun, A.C., 1947. Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown gall. *Am. J. Bot.* 34, pp: 234-240.
- Burley, J., 1989. Applications of biotechnology in forestry and rural development. In applications of biotechnology in forestry and horticulture. Ed. V. Dhawan, Plenum Press, New York et Londres, pp: 9-20.
- Burr, T.J., Bazzi, C., Süle, S., and Otten, L. 1998. Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Disease*, 82, pp:1288-1297.
- Burr, T.S.A., Bishop, A.L., Katz, M.L., Bazzi, C., 1987. A root specific decay of grapevine caused by *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium radiobacter* biovar 3. *Phytopathology*, 77, pp: 1424-1427.
- Burr, T.J., Reld, C.L., Adams, C.E., Momol, E.A., 1999. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from feral *Vitis riparia*. *Plant disease*, 83, pp: 102-107.
- Campinhos, E., 1999. Sustainable plantations of high-yield Eucalyptus trees for production of fiber : the Aracruz case. *New Forests*, 17, pp: 129-143.
- Cangelosi, G.A., Hung, L., Puvanesarajah, V., Stacey, G., Ozga, D.A., Leich, J.A., Nester, E.W., 1987. Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their role in plant interactions. *Journal of Bacteriology*, 169, pp: 2086-2091.
- Cavalcasselle, B., 1986. Les insectes nuisibles aux Eucalyptus en Italie: Importance des dégâts et méthodes de luttés. *Bult. OEPP/EPPOB.* 16, pp: 293-297.
- Cervera, M., Lopez, M.M., Navarro, L., Pena, L., 1998. Virulence and supervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* in woody fruit plants. *Physiol. Molecul. Plant Pathol.* 52, pp: 67-78.
- Chen, Z-Z., Chang, S-H., Ho, C-K., Chen, Y-C., Tsai, J-B., Chiang, V.L., 2001. Plant production of transgenic Eucalyptus camaldulensis carrying the populus tremuloides Cinnamate 4-Hydroxylase gene. *Taiwan J. For. Sci.* 16, pp: 249-258.
- Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merio, D.J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M.P., Nester, E.W., 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of Crown Gall tumorigenesis. *Cell.* 11, pp: 263-267.
- Chilton, M.D., Saiki, R.K., Yadav, N., Gordon, M.P., Quetier, F., 1980. T-DNA from *Agrobacterium* is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, pp: 4060-4064.

- Chumakov, M. I., Kurbanova, I.V., 1998. Localization of the protein VirB1 involved in contact formation during conjugation among *Agrobacterium* cells. *FEMS Microbiology Letters*, 168, pp: 297-301
- Citovsky, V., Zupan, J., Warnick, D., Zambryski, P., 1992. Nuclear localization of *Agrobacterium* VirE2 protein in plant cells. *Science*, 256, pp: 1802-1805..
- Conn, H.J., 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. *J. Bact.* 44, pp: 353-360.
- Crossway, A., Oakes, J.V., Irvine, J.M., Ward, B., Knauf, V.C., Sholmaker, C.K., 1986. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular & General Genetics: MGG* 202, pp: 179-185.
- Dagnelie, P., 1975. Théories et méthodes statistiques. Les presses Agronomiques de Gembloux, Belgique, Vol 3, 463 p.
- de Assis, T. F., 2001. Evolution of technology for cloning *Eucalyptus* in large scale. In : Proceedings of SIMPOSIO IUFRO, 3-15 Sept., Valdivia, Chile.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., Leemans, J., 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research*, 13, pp: 4777-4788.
- De Cleene, M, De Ley, J., 1976. The host range of Crown Gall. *Botanical Review*, 42, pp: 389-466.
- De Cleene, M., 1985. The susceptibility of monocotyledons to *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 113, pp: 81-89.
- De Fossard, R.A., 1978. Tissue culture propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. In proceedings of a symposium on plant tissue culture. Science Press, Peking, pp: 425-438.
- De Fossard, R.A., Bourne, R.A., 1976. Vegetative propagation of the *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. By nodal culture « in vitro » *Internat Plant Propagators Soc combined Proc.* 26, pp: 373-378.
- Dessaux, Y., Petit, A., Tempé, J., 1993. Chemistry and biochemistry of opines, Chemical mediators of parasitism. *Phytochem*, 34, pp: 31-38.
- Dickey, R.S. Relation of some edaphic factors to *Agrobacterium tumefaciens* . *Phytopathology*, vol. 51, 1961, pp: 607-614.
- Dombek, P., Ream, W., 1997. Functional domains of *Agrobacterium tumefaciens* single-stranded DNA-binding protein VirE2. *J. Bacteriol*, 179, pp: 1165–1173.
61. Dommergues, Y., Mangenot, F., 1970. *Ecologie microbienne du sol*. Ed. Masson, Paris, 796p.
- Douglas, C.J., Staneloni, R.J., Rubin, R.A., Nester, E.W., 1985. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol*, 161, pp: 850-860.
- Drahorad, w., 1983. Crown gall on fruit crop in South Tyro. In: Grill, H., Ed. *International workshop on crown gall*. Wädenswil, Switzerland: Swiss Federal Research Station, 23p.
- Du Plessis, H. J., Van vuuren, H.J.J., Hattingh, M.J., 1985. Biological control of crown gall in South Africa by *Agrobacterium radiobacter* strain K84. *Plant Disease*, 69, pp: 302-305.

- Duran-Cresswell, R., Nitsch, C., 1975. Organ culture of *Eucalyptus grandis*. *Planta*, 125, pp: 87-90.
- Eldridge, K., Davidson, J., Harwood, C., van Wyk, G., 1993. *Eucalypt domestication and breeding*. Oxford University Press Inc., New York, 288 p.
- Enriquez-Obregon, G.A., Vazquez-Padron, R.I., Prietosansonov, D.L., de la Riva, G.A., Selman-Houssein, G., 1998. Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta*, 206, pp: 20-27.
- Enriquez-Obregon, G. A., Vazquez-Padron, R.I., Prietosansonov, D.L., Pérez, M., Selman- Housein, G., 1997. Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. *Biotechnologia Applicada*, 14, pp:169-174.
- Escobar, M.A., Civerolo, E.L., Summerfelt, K.R., Dandekar, A.M., 2001. RNAi- mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, pp: 13437-13442.
- Farrand, S.K., Ryder, M.H., Hayman, G.T., O'Morchoe, S.B., Shim, J.S., Kerr, A., 1987. Genetics and molecular biology of agrocin production and sensitivity in *Agrobacterium*. *Curr. Plant. Sci. Biotechnol. Agric*, 4, pp: 42-55.
- Farrand, S.K., Van Berkum, P.B. Oger, P., 2003. *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. *I.J.S.E.M.*, 53, pp: 1681-1687.
- Felgner, L., Lingold, G.M., 1989. Cationic liposome mediated transfection. *Nature*, 337, pp: 387-388.
- Fromm, M., Taylor, L.P., Walbot, V., 1985. Expression of genes transferred into monocotyledonous plant cells by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, pp: 5824-5828.
- Genetello C., Van Larebeke N., Holsters M., De Picker A., Van Montagu M., Schell J., 1977. Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* as conjugative plasmids. *Nature*, London, 265, pp: 561-563.
- Girola, D.C., 1922. *Ganoderma sessile* Murill-Bol. *Minis. Agric. Nacion*, Buenos Aires, pp: 236-239.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorollo, B., Goldman, B.S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C., Slater, S., 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, pp: 2323-2328.
- Grimm, R., Süle, S., 1981. Control of crown gall (*Agrobacterium tumefaciens* Smith and Townsend) in nurseries. pp: 531-537. In: Lozano, J.C. and Gwin, P. (Ed). *Proceeding of the fifth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Centr. Interna. De Agric. Tropic. Cali. Colombia.
- Grout, B., 1995. Cryopreservation of excised meristems, shoot tips and somatic embryos. *Dans genetic preservation of plant cells in vitro*, Ed. Springer-Verlag, Berlin, pp: 47-61.

- Guignard, J.L., 2001. Abrégé Botanique. Systématique moléculaire. 12ème Ed. Révosée Masson.
- Gutner, L.S., 1935. Contribution à une morphologie du genre *Cyfospora* Acta. Inst. Bot. Acad.Sci. U.R.S.S. Ser. II (Plantae Cryptogamffe), 2, pp: 411-484.
- Hansen, G., Shillito R. D., Chilton M., 1997. T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94, pp: 11726-11730.
- Hamilton, C. M., Frary, A., Lewis, C., Tanksley Steven, D., 1996. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, pp: 9975-9979.
- Hansen, G., Chilton, M.D., 1996. "Agrolistic" transformation of plant cells: Integration of T-strands generated in planta. Plant Biology, 93, pp: 14978-14983.
- Hartney, V.J., 1980. Vegetative propagation of the Eucalyptus. Aust. For. Res. 10, pp: 191-211.
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M., Schell, J., 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid- derived vector. 303, pp: 209-213.
- Hignard, L., 1998. L'eucalyptus. Actes Sud, Arles, France.
- Hildebrand, E.M., 1940. Cane Gall of brambles caused by *Phytoplasma rubi* n. sp. J. Agr. Res. 61, pp: 685-696.
- Hill, K.D., Johnson, L.A.S., 1995. Systematic studies in the Eucalypts. A revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae). Telopea. 6, pp: 185-504.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A., 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. Nature, 303, pp: 179-180.
- Holm, P. B., Olsen O., Schnorf M., Brinch-Pedersen H., Knudsen S., 2000. Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. Transgenic Research, 9(1), pp: 21-32.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, S., Hoekema, A., 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants (EHA105). Trans Res. 2, pp: 208-218.
- Hopper, S.D., Moran, G.F., 1981. Bird pollination and the mating system of *Eucalyptus stoatei*. Australian Journal of Botany, 29, pp: 625-638.
- Howard, E., Citovsky, V., 1990. The emerging structure of the *Agrobacterium* T- DNA transfer complex. BioEssays, 12, pp: 103-108.
- Iglesias-Trabado, G., Carballeira-Tenreiro, R. & Folgueira-Lozano, J., 2009. *Eucalyptus universalis*: Global cultivated eucalyptus forests Map Version 1.2. Dans GIT Forestry Consulting's EUCALYPTOLOGICS: Information resources on Eucalyptus cultivation worldwide. 19 th (October).
- Imazeki, R., 1960. Introduced diseases with particular attention to the threat the pose forest protection in Asia. Proc. 5th World. For. Congr. Seattle, U.S.A, 2.
- Jacobs, M.R., 1982. Les eucalyptus dans le reboisement. Collection FAO Forests, Rome, Italie. 753 p.

- James, S., 1984. Lignotubers and burls- their structure, function and ecological significance in Mediterranean ecosystems. *The Botanical Review*, 50, pp: 225-266.
- Jindal, K., Bhardwaj, L., 1986. *Indian Forest*. 112. 1121 p.
- Johnson, L.A.S., 1976. Problems of species and genera in *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 125, pp: 155-167.
- Jones, A. L., Lai, E.M., Shirasu, K., Kado, C.I., 1996. VirB2 is a processed pilin-like protein encoded by the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J. Bacteriol*, 178, pp: 5706-5711.
- Jouanin, L., Brasilerio, A.C.M., Leple, J.C., Pilate, G., Corn, D., 1993. Genetic transformation : a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. *Ann. Sci. For.* 50, pp: 325-336.
- Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Ramuz, M., Allardet- Servent, A., 1998. Unconventional genomic organization in the alpha subgroup
- Kado, C.I., 1991. Molecular mechanisms of Crown Gall tumorigenesis. *Critical. Reviews in Plant Science*, 10, pp: 1-32.
- Kajangwe, V., Mukarusine, E., 2001. Etude comparative de la teneur en huiles essentielles de 61 espèces d'*Eucalyptus* de l'arboretum de Ruhunde. *Bulletin de l'Institut Rwandais de Recherche Scientifique et Technologique. (I.R.S.T)*.
- Karakaya, A., Ozcan, S., 2000. Susceptibility of different bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars to *Agrobacterium tumefaciens*. *Turk. J. Biol.* 25, pp: 447-452.
- Karakaya, A., Ozcan, S., 2001. Susceptibility of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars to *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn. *Turk. J. Biol.* 24, pp: 285-289.
- Kartha, K.K., 1985. *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. C.R.C. Press Inc., Boca Raton, Florida, 276 p.
- Katan, J., 1980. Solar pasteurization of soil for disease control: status and prospects. *Plant Disease*.
- Katan, J., De Vay, J.E., 1991. *Soil Solarization*. Boca Raton. Florida: C.R.C Press, Inc.
- Katan, J., Greenberger, H.A., Grinstein, A., 1976. Solar heating by polyethylene mulching for the control of disease caused by soil-borne pathogen. *Phytopathol*, 66, pp: 683-688.
- Keane, P.J., Kerr, A., New, P.B., 1970. Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. Biol.Sci.* 23, pp: 585-595.
- Kennedy, B.W., Alcorn, S.M., 1980. Estimates of U.S. crop losses to procaryote plant pathogens. *Plant Disease*, 64, pp: 674-676.
- Kerr, A., 1980. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Disease*, 64, pp: 25-30.
- Kerr, A., Panagopoulos, C.G., 1977. Biotype of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathol*, 90, pp: 172-179.
- Kerstens, K., De Ley, J., 1984. Genus III. *Agrobacterium* Conn 1942. In "Bergey's manual of systematic bacteriology". Krieg N.R. And Holt J.G. (Eds). Williams and Wilkins, Baltimore, USA, I, pp: 244-254.

- Kerstens, K., De Ley, J., 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their biological control. *Phytopathol.*
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C., 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327, pp: 70-73.
- Knauf, N. C., Yanofsky, H. F., Gordon, M. L., Nester, E. W., 1983. Genetic analysis of host range expression by *Agrobacterium* molecular genetics of bacteria. *Plant Koncz C., Kreuzaler F., Kalman Z., Schell J., 1984. A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and α -actin in plant tumors. EMBO J. 3, pp: 1029-1037.*
- Krens, F. A., Molendijk, L., Wullems, G.J., Shilperoort, R.A., 1985. The role of bacterial attachment in the transformation of cell-wall-regenerating tobacco protoplasts by *Agrobacterium tumefaciens*. *Planta*, 166, pp: 300-308.
- Krimi, Z., 1990. La lutte biologique contre le crown gall en Algérie: Efficacité de la souche bactériocinogène K84 et isolement de nouveaux antagonistes bactériens. Thèse de Magister. I.N.A. (Alger), 97p.
- Krimi, Z., 2001. Crown gall on *Eucalyptus occidentalis* seedlings. New and unusual records. *OEPP/EPPO bulletin*, 31, pp: 111-117.
- Krimi, Z., 2003. Persistance du plasmide Ti d'*Agrobacterium* dans le sol et son stabilité in situ et in vitro. Thèse de doctorat d'état en science, université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, Algérie.
- Krimi, Z., Petit, A., Mougel, C., Dessaux, Y., Nesme, X., 2002. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils. *Appl. Environ. Microbiol*, 68, pp: 3358-3365.
- Krimi, Z., Raio, A., Petit, A., Nesme, X., Dessaux, Y., 2006. *Eucalyptus occidentalis* plantlets are naturally infected by pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*. *European Journal of plant Pathology*, 116, pp: 237-246.
- Kummert, J., Lepoivre, P., 2003. *Phytopathologie, bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. Ed. De Boeck, Bruxelles, 218 p.
- Lacroix, M., 2003. La tumeur de collet et de tige causée par *Agrobacterium*. Laboratoire de diagnostic en phytoprotection. Direction de l'innovation scientifique et technologique.
- Lai, E.M., Kado, C.I., 1998. Processed VirB2 is the major subunit of the Promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol*, 180, pp: 2711-2717.
- Lamprecht, H., 1990. *Silviculture in the tropics: Tropical forest ecosystems and their tree species possibilities and methods for their long-term utilization*. GTZ, Eschborn. Germany, 296 p.
- Lanier, L., 1986. Maladies de l'*Eucalyptus*. *Bult. OEPP/EPPOB*. 16, pp: 163-255.
- Ledant., 1975. *Essences forestières algériennes (indigènes et exotiques)*. Notes de cours de dendrologie. Inst. Fores. Tlemcen, 333 p.
- Lee, Y.W., Gelvin, S.B., Kado, C.I., 1999. P. Sa causes oncogenic supression of *Agrobacterium* by inhibiting VirE2 protein export. *Journal of Bacteriology*, 181, pp:189-196.

- Lee, Y.W., Jin, S., Sim, W.S., Nester, E.W., 1995. Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, pp: 12245-12249.
- Lee, Y.W., Jin, S., Sim, W.S., Nester, E.W., 1996. The sensing of plant signal molecules by *Agrobacterium*: genetic evidence for direct recognition of phenolic inducer by the Vir A protein. Gene, 179, pp: 83-88.
- Leroux, B., Yanofsky, M.F., Winans, S.C., Ward, J.E., Ziegler, S.F., Nester, E.W., 1987. Characterization of the VirA locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant. EMBO J. 6, pp: 849-856.
- Letreuch- Belarouci, N., 1991. Les reboisements en Algérie et leurs perspectives d'avenir. Vol. 1 et 2. Off. Pub. Univ. Alger, 641p.
- Lippincott, B.B., Lippincott, J.A., 1969. Bacterial attachment to specific wound site as an essential stage in tumorinitiation by *Agrobacterium*. J. Bacteriol, 97, pp:620-628.
- Lippincott, J. A., Lippincott, B. B., 1977. Tumor induction by *Agrobacterium* Involves attachment of the bacterium to a site on the host plant cell wall. Plant Physiol. 59, pp:388-390.
- Lippincott, J.A., Lippincott, B.B., Starr, M.P., 1983. The genus *Agrobacterium*. In: Starr (Ed). Phytopathogenic Bacteria. Springer-Verlage, New York, pp: 842-855.
- Lopez, M.M., Miro, M. Orive, R., Temprano, F.J., Poli, M., 1981. Biological control of crown gall on rose in Spain. In: Lozano, J.C., Gwin, P., Eds Proceedings of the 5th international conference on plant pathogenic bacteria. Cali. Colombia, pp:539-547.
- Louerguioui, A., 1988. Technique par clonage « in vitro » du genre *Eucalyptus*. Université de Rouen. Thèse de doctorat, 11 p.
- Machado, L.O.R., Andrade, G.M., Cid, L.P.B., Penchel, R.M., Brasileiro, A.C.M., 1997. *Agrobacterium* strain specificity and shooty tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) . Plant Cell Reports, 16, pp: 299-303.
- Mac Rae, S., Van Staden, J., 1999. Transgenic *Eucalyptus* in Bajaj YPS (Ed). Biothecnology in agriculture and forestry. Vol.44. Transgenic Trees VII. Berlin, Heidelberg: Spring-Verlag, pp: 88-115.
- Mahmood Khawar, K., Özcan, S., 2002. In vitro induction of crown galls by *Agrobacterium tumefaciens* super virulent strain A281 (pTiBo 542) in Lentil (*Lens culinaris* Medik.). Turk. J. Bot. 26, pp: 165-170.
- Maliga, P., 2002. Engineering the plastid genome of higher plants. Current Opinion in Plant Biology, 5, pp:164-172.
- Mantis, N.J., Winans, S.C., 1992. The *Agrobacterium tumefaciens* vir gene transcriptional activator virG is transcriptionally induced by acid pH and other stress stimuli. Journal of Bacteriology, 174, pp: 1189-1196.
- Mantis, N.J., Winans, S.C., 1993. The chromosomal response regulatory gene *chv I* of *Agrobacterium tumefaciens* complements an *E. Coli* *pho B* mutation and is required for virulence. J. Bacteriol, 175, pp: 6626-6636.
- Mathysse, A.G., 1983. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. J. Bacteriol, 154, pp: 906-915.

- Mathysse, A.G., McMahan, S., 1998. Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in cell, attB, attD, and attR mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, pp: 2341-2345.
- Mathysse, A.G., Gurlitz, R.H.G., 1982. Plant cell range for attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to tissue culture cells. *Physiol. Plant. pathol.* 21, pp:381-387.
- Matin, A., Auger, E.A., Blum, P.H., Schultz, J. E., 1989. Genetic basis of stravation survival in nondefferentiating bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, pp:293-316.
- Mc Kenna, J.R., Epstein, L., 2003. Susceptibility of *Juglans* Species and interspecific hybrids to *Agrobacterium tumefasciens*. *Hort. Science*, 38, pp: 435-439.
- Menehikovsk, F., 1931. The soil and hydrological conditions of the Jordan Valley as causes of plant diseases. *Madar. T. IV*, 19p.
- Metro, A., 1963. L'eucalitticoltura in una economia forestale modera. *Ann. Acc. It. Scienze Forestali*, Firenze.
- Méziane, H., 1996. L'eucalyptus en Algérie : Un arbre controversé. *Rev. La forêt Algérienne*. 1, pp: 5-10.
- Moore, L.W., 1976. Latent infections and seasonal variability of crown gall development in seedlings of three *Prunus* species. *Phytopath.* 66, pp: 1097-1101.
- Moore, L.M., 1979. Practical use success of *Agrobacterium radiobacter* strain 84 of crown gall control. in: *Soil-Borne Plant Pathogens* (Schippers, B., and Grams, W. eds.) Academic Press, NY, pp: 553-568.
- Moore, L.M., 1988. Use of *Agrobacterium radiobacter* in agroecological ecosystem. *Microbiol. Sciences*, 5, pp: 92-95.
- Moore, L.W., Bouzar, H., Burr, T., 2001. *Agrobacterium*: in: Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. (Ed.). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, Third Edition. APS Press, St Paul, USA.
- Moore, L.W., Kado, C.I. Bouzar, H., 1988. *Agrobacterium*. In laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria: 16-36. Nw s.c.h.a.a.d.,aps press, saint paul, minnesota.
- Moore, L.W., Warren, G., 1979. *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. *Annu. Rev. Phytopathol.* 17, pp: 163-179.
62. Moore, L.W., Warren, G., Strobel, G., 1979. *Plasmid 2*, 617p.
- Morandini, R., 1964. Genetics and improvement of exotic trees. *Unasyuva no73- 74*. FAO/IUFRO meeting on forest genetics.
- Moran, G.F., Bell, J.C., Griffin, A.R., 1989. Reduction in levels in inbreeding in a seed orchard of *Eucalyptus regnans* F. Muell. compared with natural Moreshet, S., 1981. Physiological activity in a semi arid environment of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. From two provenances. *Australian Journal Bot.* 29, pp: 97-110.
- Mougel, C., Teyssier, S., D'angelo, C., Groud, K., Neyra, M., Sidi- Boumedine, K., Cloeckart, A., Peloille, M., Baucheron, S., Chalus-Dancla, E., Jarraud, S., Meugnier, H., Forey, F., Vandenesch, F., Lina, G., Etienne, J., Thioulouse, J., Manceau, C., Robbe, P., Nalin, R., Briolay, J. Nesme, X., 2001. Experimental and

- theoretical evaluation of typing methods based upon random amplification of genomic restriction fragments (AFLP) for bacterial populations genomics. *Genet. Sel. Evol. Suppl.* 1, pp:319-338.
- Mougel, C., Thioulouse, J., Perriere, G., Nesme, X., 2002. A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, pp: 573-586.
- Mullen, J., Adam, G., Blowers, A., Earle, E., 1998. Biolistic transfer of large DNA fragments to tobacco cells using YACs retrofitted for plant transformation. *Molecular Breeding*, 4 (5), pp: 449-457.
- Mullins, K.V., Llewellyn, D.J., Hartney, V.J., Strauss, S. and Dennis, E.S., 1997. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant cell Reports*, vol. 16, n°11, pp: 787-791.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, pp: 473-502.
- Nattrass, R.M., 1949. A botrytis disease of *Eucalyptus* in Kenya. *Emp. For. Rez.* 28, pp: 60-61.
- Neff, N.T., Binns, A.N., 1985. *Agrobacterium tumefaciens* interaction with suspension-cultures tomato cells. *Plant Physiol.* 77, pp: 35-42.
- Nesme, X., Benedra, T., Collin, E., 1990. Importance du crown gall chez les hybrides *Populus tremula*. L x *P. alba*. L. en pépinière forestière. *Agronomie*, 10, pp: 581-588.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H., 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal*, 1, pp: 841-845.
- Ogawa, Y., Ishikawa, K., Mii, M., 2000. Highly tumorigenic *Agrobacterium* *Microbiology*, 173, pp:311-315.
- Ohta, K., 1984. Studies on the crown gall disease of flower crops Pathogenicity and inoculum potential of the causal bacterium. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, 50, pp: 205-210.
- Ophel, K. Kerr, A., 1990 *Agrobacterium vitis* sp. Nov. For strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *IJSB.* 40, pp: 236-241.
- Pan, S.Q., Jin, S., Boulton, M.I., Hawes, M., Gordon, M.P., Nester, E.W., 1995. An *Agrobacterium* virulence factor encoded by Ti plasmid or a chromosomal gene is required for T-DNA transfer into plants. *Molecul. Microbiol.* 17, pp: 259-269.
- Patrick, C., Ross, S., Wen, H., 1999. Polyethylene glycol enhances lipoplex-cell association and lipofection. *Biochim. Biophys. Acta*, 1421.
- Peng, W.T., Lee, Y.W., Nester, E.W., 1998. The phenolic recognition profiles of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein are broadened by a high level of the sugar binding protein ChvE. *Journal of Bacteriology*, 18, pp: 5632-5638.
- Penfold, A.R., Willis, J.L., 1961. *The eucalyptus botany, cultivation, chemistry and utilization.* London Leonard Hill (Books) limited.
- Perron, G., 1981. L'eucalyptus à la conquête de l'Europe. " *P.H.M. revue horticole* " n° 214.

- Pilate, G., Pâques, M., Leplé, J.C., Plomion, C., 2002. Les biotechnologies chez les arbres forestiers Rev. For. Fr. LIV – 2, pp: 161-178.
- Pinto, G., Park, Y.S., Neves, L., Araújo, C., Santos, C., 2008. Genetic control of somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill. Plant Cell Reports, 27, pp: 1093–1101.
- Pionnat, S., Kelle, H., Hericher, D., Bettachini, A., Dessaux, Y., Nesme, X., Poncet, C., 1999. Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries. Appl. Microbiol. 65, pp: 4197-4206.
- Poncet, C., Antonini, C., Bettachini, A., Pionnat, S., Simonini, L., Dessaux, Y., Nesme, X., 1996. Impact of crown gall disease on vigour and yield of rose trees. Acta. Hortic. 424, pp:221-225.
- Ponsonnet, C., 1994. Structure génétique des populations d'*Agrobacterium*. Apport à l'écologie des plasmides Ti. Thèse. Université Claude Bernard, Lyon 1.
- Ponsonnet, C., Nesme, X., 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and Chromosomal regions. Arch. Microbiol. 161, pp: 300-309.
- Popoff M.Y., Kersters K., Kiredjian M., Miras I. Coynault C., 1984. Taxonomic position of *Agrobacterium* strains of hospital origin. Ann. Microbiol. Paris, 135, pp: 427-442.
- Poupon, H., 1968. Premières études des caractéristiques hydriques des feuilles d'*eucalyptus camaldulensis* en Tunisie. Annales de l'institut national de la recherche agronomique de Tunisie, 1, pp: 1-22.
- Poupon, H., 1972. Description des appareils aérien et souterrain d'*eucalyptus camaldulensis* Dehn. Introduit en Tunisie du Nord. Coh. ORSTOM. 17, pp : 47-59.
- Prakash, M.G., Gurumurthi K., 2009. Genetic transformation and regeneration of transgenic plants from precultured cotyledon and hypocotyl explants of *Eucalyptus tereticornis* Sm. Using *Agrobacterium tumefaciens*. In vitro Cell Dev. Biol. Plant, 45, pp: 429– 434.
- Pryor, L.D., 1976. The biology of eucalypts, Arnold, London, 82 p.
- Pryor, L.D., Johnson, L.A.S., 1971. A classification of the Eucalypts. Australian National University, Canberra, Australia.
- Raio, A., Zoina, A., Moore, L.W., 1997. The effect of solar heating of soil on natural and inoculated *agrobacteria*. Plant Pathol. 46, pp: 320-328.
- Raio, A., Zoina, A., Moore, L.W., 1998. Loss of *Agrobacterium tumefaciens* tumor inducing plasmid in solarized soil. IOBC Bull. 21, pp:301-305.
- Rapilly, F., 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. Annales des Epiphyties (No.H.S.), 19, pp: 1-102.
- Ream, W., 1989. *Agrobacterium tumefaciens* and interkingdom genetic exchange. Ann. Rev. Phytopathol. 27, pp: 583-618.
- Rech, E.L., Vianna Giovanni, R., Aragao Francisco, J.L., 2008. High- efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. 3, pp:410-418.

- Reis, M., Hedges, C., 1975. Status of forest diseases and insects in Latin
- Riker, A.J., Banfield, W.M., Wright, W.H., Keitt, G.W., Sagen, H.E., 1930. Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *J. Agr. Res.* 41, pp: 507-540.
- Ruger, H.J., Hofle, M.G., 1992. Marine star-shaped aggregate-forming bacteria: *Agrobacterium atlanticum* sp. Nov.; *Agrobacterium ferruginum* sp. Nov., nom, rev; *Agrobacterium gelatinovororum* sp. Nov., nom, rev; and *Agrobacterium stellulatum* sp. Nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, pp: 133-143.
- Rysheuvels, P., Laroche, M., Ver Hyen, M., 1984. Etude de l'application du contrôle biologique d'*Agrobacterium* var *radiobacter* (souche 84 de Kerr) en culture fruitière. *Parasitica*, 40, pp: 183-196.
- Salgues, R., 1935. Les tumeurs en Pathologie comparée. *Rev. Gtn. Sci. Pur. Appl.* 47, pp: 395-405.
- Sanford, J. 1988. "The biolistic process." *Trends in Biotechnology.* 6, pp: 299-302.
- Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, H., Matsumoto, S., 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, pp: 694-702.
- Scheeren-Groot, E. P., Rodenburg, K.W., Den Dulk-Ras, A., Turk, S.C.H.J., Hooykaas, P.J.J., 1994. Mutational analysis of the transcriptional activator VirG of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 176, pp: 6418-6426.
- Schmitz, G., 1956. Les termites et les moyens de les détruire. *Bulletin agricole du Congo belge*, Vol. 47.
- Sedgley, M.F., Hand, C., Smith, R.M., Griffin, A.R., 1989. Pollen tube growth and early seed development in *Eucalyptus regnans* F. Muell. (Myrtaceae) in relation to ovule structure and preferential outcrossing Australian. *Journal of Botany*, 37, pp: 397-411.
- Sheng, J., Citovsky, V. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant cell reports*, 8, pp: 1699-1710.
- Siemaszko, W., 1929. *Phytopathologische Beobachtungen in Polen.* *Centralb. Für Bukt*, Abt. 2, pp: 113-116.
- Small, W., 1925. Annual Report of the Government Mycologist. *Ann. Rept. Uganda Dept. Of Agric.* For the year ended. 31.
- Smith, E.F., Townsend, C.O., 1907. A plant tumor of bacterial origin. *Science*, New York, 25, pp:671-673.
- Smith, J. E., 1793. *Un specimen de la botanique de New Holland.* Londres.
- Sparrow, P.A.C., Townsend, T.M., Arthur, A.E., Dale, P.J., Irwin, J.A., 2004. Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility in Brassicaceae. *Theoretic. Appl. Genet.* 108, pp: 644-650.
- Spezzini, C., 1926. Observaciones y adiciones a la micologica argentina. *Bot. Acad. Nac. Cien. Cordoba*, TXXVIII, pp: 267-406.
- Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambrisky, P., 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plants cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytochemistry*, 27, pp: 2781-2785.

- Stapleton, J.J., De Vay, J.E., 1986. Soil solarization: a non-chemical approach for management of plant pathogens and pests. *Crop Protection*, 5, pp:190-198.
- Stomp, A.V., Loopstra, C., Chilton, W.S., Sederoff, R. R., Moore, L. W., 1990. Extended host range of *A. tumefaciens* in the genus *Pinus*. *Plant Physiol.* 92, pp: 1226-1232.
- Süle, S., Mozar, J., Burr, T.J., 1994. Crown gall resistance of *Vitis* spp. and grapevine rootstocks. *Phytopathol.* 84, pp:607-611.
- Sundberg, C., Meek, L., Carroll, K., Das, A., Ream, W., 1996. VirE1 protein mediates export of the single stranded DNA- binding protein VirE2 from *A. tumefaciens* into plant cells. *J. Bacteriol.* 178, pp: 1207-1212.
- Tanimoto, E., Douglas, C., Halperin, W., 1979. Factors affecting crown gall Tumorigenesis in Jerusalem artichoke *Helianthus tuberosum* L. *Plant Physiol.* 63, pp:989-994.
- Teulieres, C., Marque, C., Boudet, A.M., 1994. Genetic transformation of *Eucalyptus*. In: Bajaj YPS (Ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 29, Springer- Verlag, Berlin, pp: 289-307.
- Thomas, D., Warkentin, Alan, Mc., 1991. Crown gall transformation of lentil (*Lens culinaris* Medik.) with virulent strains of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 10, pp: 489-493.
- Tourte, Y., 2001. *Les OGM - La Transgénèse Chez Les Plantes*. Dunod, 144p.
- Thorstenson, Y. R., Zambryski, P.C., 1994. The essential virulence protein VirB8 localizes to the inner membrane of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 176, pp: 1711-1717.
- Tooke, F.G.C., 1995. *The Eucalyptus Snout Beetle, Gonipterus scutellatus* Gyll. A study of its ecology and control by Biological Means. Union of South Africa, Dept of Agric. Entomology Memoirs, Vol 3.
- Trigui, A., 1984. Les principales maladies de l'amandier en Tunisie. *CIHEAM. Options Med.* 11, pp:151-159.
- Turubull, JW., 1991. Future use of eucalyptus : opportunities and problems. In : A.P.G. Schonau (ed). *IUFRO Symp Intesive for the role of eucalyptus*. Southern African Institute of Forestry, Pretoria, pp: 2-27.
- Urbanczyk, H., Suzuki, K., Yoshida, K., Kondo, K., 2003. Physical and gene maps of *Agrobacterium* biovar 2 strains and their relationship to biovar 1 chromosomes. *Microbiology*, 149, pp: 3035-3042.
- Valentine, I., 2003. *Agrobacterium tumefaciens* and the plant: the David and Goliath of modern genetics (update on *Agrobacterium* mediated transformation of plants). *Plant physiology*, 133, pp: 948-955.
- Van der Bulk, R.W., 1991. Application of cell and tissue culture and in vitro selection for disease resistance breeding – a review. *Euphytica*, 56, pp: 269-285.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperroort, R.A., Schell, J., 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for Crown Gall-inducing ability. *Nature*, 252, pp: 169-170.

- Viegas, A.P., 1946. Alguns fungos do, Brasil.XII. Fungi Imperfecti. Melanconiales. *Rrugantia*, S. Paulo, t. VI, fasc.I, pp: 1-37.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters,A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids res.* 23, pp: 4407-4414.
- Viss, W., Humann, J.L., Cook, M., Driver, J., Ream, W., 2003. Crown-gall- resistant transgenic apple trees that silence *Agrobacterium tumefaciens* oncogenes. *Molecular Breeding*, 12, pp: 283-295.
- Wallace, G.B., 1934. Report on a survey of plant diseases in the Irinna. pp: 18-20.
- Wallace, G.B., 1949. Annual Report of Plant Pathologist. Rep. Dep. Agric. Tanganyika, pp: 144-145.
- Watt, M.P., Blakeway, F., Cresswell, C.F., Herman, B., 1991. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. *South African Forestry Journal*, 157, pp: 60-66.
- Watt, M.P., Duncan, E.A., Ing, M., Blakeway, F.C., Herman B., 1995. Field performance of micropropagated and macropropagated eucalyptus hybrids. *South African Forestry Journal*, 173, pp: 17-21.
- Werwoerd, L., Du Plessis, S.J., 1931. Description of some new species of South African fungi and of species not previously recorded in South Africa. III. *S. African. J. Sci.* 27, pp: 290-297.
- White, F.F., Nestre, E.W., 1980. *J. Bacteriol.* pp: 134-141.
- Woese, C.R. Stackebrandt, E., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Madigna, M.T., Fowler, V.J., Hahn, C.M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K.H., Fox, G.E., 1984. The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* 5, pp: 315-326.
- Wood, D.W., Setubal, J.C., Kaul, R., Monks, D.E., Kitajima, J.P., Okura, V.K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G.E., Almeida, Jr N.F., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Karp, P.D., Grant, C., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M.J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao Z.Y., Dolan M., Chumley F., Tingey S.V., Tomb J.F. Milton P.G., Maynard, V.O., Nester, W.E., 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, pp:2317-2323.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., 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*. *IJSEM.* 51, pp:89-103.
- Yossi, H., Kaya, B., Traoré, C.O., Niang, A., Butare, I., Levasseur, V., Sanogo, D., 2006. Les haies vives au Sahel Etat des connaissances et recommandations pour la recherche et le développement. ICRAF Occasional Paper. Nairobi : World Agroforestry Centre, 6, pp: 14-31.

- Zhen, Z., Baolin, S., Chunming, L., Guifang, X., Xianghui, L., 1994. Transformation of wheat protoplasts mediated by cationic liposome and regeneration of transgenic plantlets. *Chin. J. Biotechnol.* 9, pp: 258–261.
- Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J., Farrand, S.K. Winans, S.C., 2000. The bases of Crown Gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.* 182, pp: 3885-3895.
- Zoina, A., Raio, A., 1999. Susceptibility of some peach rootstocks to crown gall. *J. Plant. Pathol.* 81, pp: 181-157.
- Zoina, A., Raio, A., Peluso, R., Spasiano, A., 2001. Characterization of agrobacteria from weeping fig (*Ficus benjamina*). *Plant. Pathol.* 50, pp:620-627.

Annexe

Annexe 1 : Composition des milieux de culture utilisés

1.1. Composition du milieu de base (Murashige et Skoog; 1962).

	Eléments	Concentrations en mg/l
Macroéléments (MS)	KNO ₃ , NH ₄ NO ₃ , CaCl ₂ , 2H ₂ O, MgSO ₄ , 7H ₂ O, KH ₂ PO ₄	1900 1650 440 370 170
Microéléments (MS)	MnSO ₄ , 4H ₂ O, ZnSO ₄ , 4H ₂ O, H ₃ BO ₃ , KI, Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O, CuSO ₄ , 5H ₂ O, CoCl ₂ , 6H ₂ O	22,3 8,6 6,2 0,83 0,25 0,025 0,025
Fe-EDTA	Na ₂ EDTA, FeSO ₄ , 7H ₂ O	37,25 27,85
Vitamines (MS)	Myoinositol, Glycine, Pyridoxine, Acide nicotinique, ThiamineHCl	100 2 0,5 0,5 0,1
Divers	Sucre, Agar	45.000 7.000

1.2 : Milieu MG (Mannitol-Glutamate) (Keane et al., 1970)

Mannitol.....	10.0 g
L(-) acide glutamique.....	2.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
NaCl.....	0.2 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2 g
Extrait de levure	0.5 g
Agar.....	15 g

Pouvoir pathogène et performances de transformation de trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* in vitro et in planta sur quelques espèces d'eucalyptus

pH =7.20

MgSO4 doit être solubilisé séparément dans 20 à50 ml d'eau distillée.

Pour la préparation du milieu en boites; le milieu est stérilisé en autoclavage à une température de 120°C pendant 20 minutes, puis coulé en boites de pétries

Annexe 2 : Tableaux d'analyses de la variance

Tableau 2.1 : Analyse de la variance pour le paramètre taux d'infection in vitro.

Variable à expliquer: taux d'infection

Facteurs: espèce

souche

Nombre de sujets complets: 480

Source de variation	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité	T.H.
A, espèce	9,81458	7	1,40208	6,79	0,0000	Significative
B, souche	5,81667	2	2,90833	14,09	0,0000	Significative
Interactions						
AB	5,21667	14	0,372619	1,80	0,0354	Significative
Résiduelle	94,15	456	0,206469			
Totale corrigée	114,998	479				

Tableau 2.2 : Analyse de la variance pour le paramètre taux d'infection in planta.

Variable à expliquer: taux d'infection

Facteurs: espèce

souche

Nombre de sujets complets: 720

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité	T.H.
A, espèce	11,8431	7	1,69187	8,46	0,0000	Significative
B, souche	6,63611	2	3,31806	16,59	0,0000	Significative
Interactions						
AB	6,45278	14	0,460913	2,31	0,0043	Significative
Résiduelle	139,167	696	0,199952			
Totale corrigée	164,099	719				

Tableau 2.3 : Analyse de la variance pour le paramètre poids des tumeurs.

Variable à expliquer: poids

Facteurs:

espèce

souche

Nombre de sujets complets: 218

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité	T.H.
A, espèce	0,0626728	5	0,012534	4,37	0,0009	Significative
B, souche	0,0255285	2	0,012764	4,45	0,0129	Significative
Interactions						
AB	0,0539853	10	0,0053985	1,88	0,0497	Significative
Résiduelle	0,574141	200	0,002870			
Totale corrigée	0,75841	217				
B, souche	0,0255285	2	0,012764	4,45	0,0129	Significative
Interactions						
AB	0,0539853	10	0,0053985	1,88	0,0497	Significative
Résiduelle	0,574141	200	0,002870			
Totale corrigée	0,75841	217				

Tableau 2.4 : Analyse de la variance pour le paramètre diamètre des tumeurs.

Variable à expliquer: diamètre

Facteurs:

espèce

souche

Nombre de sujets complets: 218

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité	T.H.
A, espèce	106,277	5	21,2554	12,29	0,0000	Significative
B, souche	37,0223	2	18,5111	10,70	0,0000	Significative
Interactions						
AB	36,5263	10	3,65263	2,11	0,0251	Significative
Résiduelle	345,869	200	1,72934			
Totale corrigée	586,303	217				

Annexe 3 : Tableaux des tests (LSD).

Tableau 3.1 : Tests des étendues multiples pour le paramètre taux d'infection par espèce d'eucalyptus in vitro.

Méthode: 95.0 % LSD

Espèce	Efficacité	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
E camaldulensis	60	19,33	0,39	X (E)
E blackey	60	29	0,43	X (D)
E combretata	60	33,33	0,45	X (C)
E punctata	60	35	0,47	X (C)
E saligna	60	40	0,47	X (C)
E microcorys	60	48,33	0,49	X (B)
E cladocorys	60	53,33	0,47	X (B)
E gomphocorypha	60	65	0,41	X (A)

Tableau 3.2 : Tests des étendues multiples pour le paramètre taux d'infection par souche in vitro.

Méthode: 95.0 % LSD

Souche	Efficacité	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
C58	160	24,37	0,42	X (B)
E2x	160	45,62	0,46	X (A)
E17	160	49,37	0,44	X (A)

Tableau 3.3 : Tests des étendues multiples pour le paramètre taux d'infection par espèce d'eucalyptus in planta.

Méthode: 95.0 % LSD

Espèce	Efficacité	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
E camaldulensis	90	19,56	0,36	X (F)
E blackey	90	23,32	0,41	X (E)
E combretata	90	28,88	0,42	X (D)
E punctata	90	31,11	0,46	X (D)
E saligna	90	34,44	0,46	X (D)
E microcorys	90	41,11	0,48	X (C)
E cladocorys	90	48,88	0,48	X (B)
E gomphocorypha	90	57,77	0,44	X (A)

Tableau 3.4 : Tests des étendues multiples pour le paramètre taux d'infection par souche in planta.

Méthode: 95.0 % LSD

Souche	Efficacité	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
C58	240	21,66	0,40	X (B)
E2x	240	40,41	0,46	X (A)
E17	240	43,33	0,46	X (A)

Tableau 3.5 : Tests des étendues multiples pour le paramètre poids par espèce d'eucalyptus.

Méthode: 95.0 % LSD

Espèce	Efficacité	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
E punctata	28	0,0165776	0,016319	X (C)
E microcorys	37	0,0192075	0,00916092	X (C)
E combretata	26	0,0387847	0,0123628	X (B)
E saligna	31	0,0424869	0,0100797	X (B)
E cladocorys	44	0,0607976	0,00841260	X (A)
E gomphocorypha	52	0,0823603	0,00830239	X (A)

Tableau 3.6 : Tests des étendues multiples pour le paramètre poids par souche.

Méthode: 95.0 % LSD

Souche	Efficacité	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
C58	84	0,0282052	0,0083936	X (C)
E17	87	0,0374316	0,0083938	X (B)
E2x	87	0,0522822	0,00591747	X (A)

Tableau 3.7 : Tests des étendues multiples pour le paramètre diamètre par espèce d'eucalyptus.

Méthode: 95.0 % LSD

Espèce	Efficacité	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
E punctata	28	2,47844	0,253245	X (D)
E microcorys	37	2,50734	0,224841	X (D)
E combretata	26	3,375	0,203493	X (C)
E saligna	31	3,80393	0,204422	X (B)
E cladocorys	44	5,92857	0,206472	X (B)
E gomphocorypha	52	4,36012	0,203772	X (A)

Tableau 3.8 : Tests des étendues multiples pour le paramètre diamètre par souche.

Méthode: 95.0 % LSD

Souche	Efficacité	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
C58	84	2,80558	0,2116931	X (C)
E17	87	3,41604	0,235945	X (B)
E2x	87	3,96845	0,148239	X (A)