

# THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

**Centre de recherche** : Biotechnologies Végétales et Microbiennes, Biodiversité et Environnement

**Structure de Recherche** : Équipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire

**Discipline** : Biologie

**Spécialité** : Biotechnologie Microbienne

*Présentée et soutenue le 22/12/2018 par :*

*Imane CHAMKHI*

**Les microorganismes rhizosphériques associés au safran (*Crocus sativus* L.) :  
diversité et valorisation pour l'amélioration de cette culture dans la région de  
Taliouine (Maroc)**

*Devant le jury :*

**CENTRE D'ETUDES DOCTORALES - SCIENCES ET TECHNOLOGIES**

<b>El Bekkay BERRAHO</b>	<b>PES</b>	Faculté des Sciences, Université, Mohammed V, Rabat	<b>Président</b>
<b>Jamal AURAG</b>	<b>PES</b>	Faculté des Sciences, Université, Mohammed V, Rabat	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Laila SBABOU</b>	<b>PH</b>	Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	<b>Co-Directeur de thèse</b>
<b>Allal DOUIRA</b>	<b>PES</b>	Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, Kénitra	<b>Rapporteur/ Examineur</b>
<b>Jamal IBIJBIJEN</b>	<b>PES</b>	Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail, Meknès	<b>Rapporteur/ Examineur</b>
<b>Leila MEDRAOUI</b>	<b>PH</b>	Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	<b>Rapporteur/ Examineur</b>
<b>Mohamed RAHOUTI</b>	<b>PES</b>	Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	<b>Examineur</b>
<b>Hafid BAROUDI</b>	<b>Dr.</b>	Afoulki invest-123 Safran, Picardie, France	<b>Invité</b>

Année Universitaire : 2018/2019

## ***DEDICACE***

Je dédie ce modeste travail ;

A mes parents, qui m'inspirent dans ma vie et m'encouragent depuis toujours, que Dieu les protège.

Ce travail est le fruit de votre éducation, j'espère que vous y trouverez toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A mes frères et ma sœur pour leur grande aide, leur soutien et leur amour.

A tous mes ami(e)s qui m'ont encouragé tout au long de mon travail et avec qui j'ai passé des moments inoubliables, des bons et des durs.

Trouvez ici l'expression de toute ma sympathie.

## ***AVANT-PROPOS***

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été effectués au sein de l'équipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire dirigée par le professeur **Abdelkarim FILALI-MALTOUF**, affiliée au Centre de recherche Biotechnologies Végétales et Microbiennes, Biodiversité et Environnement dirigé par le professeur **Jamal AURAG** (Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat). Cette thèse a été préparée sous la direction de Monsieur **Jamal AURAG** professeur à la Faculté des Sciences de Rabat et la co-direction de Madame **Laila SBABOU** professeur habilité à la Faculté des Sciences de Rabat.

Ce travail de recherche a reçu un soutien logistique et financier de la société 123 Safran et à sa tête son directeur Monsieur **Hafid BAROUDI** et directeur scientifique de Afoulki Invest.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

C'est avec une immense gratitude que je remercie sincèrement mon très cher professeur et mon directeur de thèse **Jamal AURAG**, directeur du Centre de recherche Biotechnologies Végétales et Microbiennes, Biodiversité et Environnement. Vous avez rendu possible la réalisation de ce travail au-delà de votre rôle de directeur de thèse, le temps que vous m'avez consacré, votre investissement, votre patience, votre disponibilité, le partage de votre expérience et vos judicieux conseils m'ont fait progresser. Je vous remercie sincèrement pour tout le soutien que vous m'avez accordé depuis ma licence vous étiez mon parrain dans le monde de la recherche et vos encouragements ont su me remettre sur le droit chemin. J'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme encadrant de licence de master et de thèse. Vous avez eu un réel impact positif sur mon parcours professionnel et personnel. Je suis heureuse que vous fassiez ainsi partie aujourd'hui des personnes qui ont marqué ma vie.

Mes remerciements les plus profonds à ma chère encadrante Mme **Laila SBABOU**, professeur habilité à la faculté des sciences, sans vous ce projet sur le safran n'aurait pas vu le jour. Vous m'avez fait découvrir le safran ce petit bijoux et la région de Taliouine qui restera toujours gravée dans mon cœur. Vous m'avez accompagné avec beaucoup de patience au champ, vous m'avez guidé, toujours de façon très positive et vous m'avez toujours assuré la possibilité de travailler dans les meilleures conditions surtout au terrain. Je vous remercie pour votre investissement, votre aide et votre intérêt pour ce projet durant ces années de Master et de Thèse. Vous avez su me conseiller et me guider tout en me laissant une grande part de liberté

et de responsabilité. Je vous remercie sincèrement pour tout le soutien que vous m'avez accordé, pour votre disponibilité, et vos encouragements.

Je voudrais également exprimer mes remerciements les plus sincères et ma reconnaissance à monsieur **El Bekkay BERRAHO**, professeur à la faculté des sciences de Rabat, pour ses encouragements et aussi pour l'honneur qu'il m'a accordé en acceptant de présider le jury de ma thèse.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur **Mohamed RAHOUTI**, professeur à la faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat, pour avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie tout particulièrement Madame **Laila MEDRAOUI**, professeur habilité à la faculté des sciences de Rabat, pour vos conseils, votre soutien et votre intérêt pour ce projet, c'est un plaisir de vous avoir comme rapporteur de mon travail et membre de jury.

Je remercie également Monsieur **Jamal IBIJBIJEN**, professeur à la faculté des sciences, Université Moulay Ismail de Meknès, d'avoir aimablement accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur.

J'adresse mes remerciements aussi à Monsieur **Allal DOUIRA**, professeur à la faculté des Sciences, Université Ibn Tofail de Kénitra, veuillez trouver ici toute ma reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur.

Je remercie **Mr Hafid BAROUDI**, directeur scientifique de Afoulki Invest et directeur de la société 123 Safran, pour avoir accepté de juger le fruit de cette collaboration. Je vous remercie énormément pour votre soutien financier et aussi pour m'avoir donné l'occasion d'échantillonner dans votre ferme et de réaliser l'expérimentation de biofertilisation du safran au champ.

Je mesure l'honneur que vous me faites en acceptant de juger mon travail. J'espère qu'il sera digne de la confiance que vous m'avez accordée. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie chaleureusement mon professeur **Abdelkarim FILALI-MALTOUF**, directeur du de l'équipe Microbiologie et Biologie Moléculaire, pour son accueil au sein de son laboratoire, pour tout le soutien et l'encouragement qu'il m'a accordé au cours de cette thèse et son oreille attentive pour le bien-être des étudiants.

Je remercie également **Mr Younes BERKLIL** pour toute la logistique, les techniciens et les ouvriers mis à ma disposition lors de la plantation et l'échantillonnage.



Je remercie chaleureusement **Mlle Mina BEN ABDERRAHMAN** secrétaire de la société 123 Safran pour son accueil, son aide et son amitié.

Je tiens à remercier chaleureusement toute l'équipe LMBM, spécialement mes professeurs Madame **Jamila MAATALAH**, Madame **Ilham BOUHMOUCH**, Madame **Bouchra BELKADI** pour leurs encouragements. Je remercie aussi Professeur **Chouhra TALBI** pour son soutien et ses encouragements.

Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance envers tous les amis et collègues qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche. Ainsi je tiens à remercier plus particulièrement mes chères **Imane EL ATTAR**, **Kaoutar TAHA** et **Meryem MEKKAOUI** pour leur amitié, leur aide et leurs encouragements jusqu'au bout. **Meryem BELFQUIH** mon amie et ma binôme avec qui j'ai partagé les hauts et les bas de notre parcours. Je remercie ma chère amie **Hanaa BADI** pour son amitié sincère, sa transparence. Je remercie mon ami **Mohammed ALAMI** pour son aide et ses encouragements. C'était un plaisir de commencer et partager avec vous cette aventure à la FSR.

Je remercie également **Malika OUBOHSSAINE**, **Ouafae PAKHROU**, **Ikram DAHMANI**, **Chaimae YATRIB**, **Karim RABEH**, **Mohamed HNINI** et **Houcine OUAKRIM** qui m'ont soutenu tout le long de ces années et avec qui j'ai partagé le laboratoire. Nos diverses discussions professionnelles, mais aussi personnelles, ont été enrichissantes à tout point de vue.

Je remercie ma précieuse et formidable famille qui n'a jamais cessé de croire très fort en moi. Ni les mots ni les expressions les plus profondes ne suffiront pour les remercier. Votre amour, soutien, patience et sacrifices m'ont toujours entouré et guidé. Je vous aime tous.

## RESUME

---

Le safran (*Crocus sativus* L.) est un produit de terroir à forte valeur ajoutée qui fait partie des produits les plus prisés au niveau mondial et qui figure parmi les priorités nationales inscrites au niveau du Plan Maroc Vert.

L'objectif de cette thèse est la caractérisation et la valorisation de la diversité des populations de microorganismes rhizosphériques associées au safran dans la région de Taliouine.

L'identification moléculaire a permis, pour la première fois au Maroc, de révéler une grande diversité taxonomique de ces microorganismes, avec huit genres de champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) ; trois espèces de champignons endophytes (CE) et neuf genres de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR).

De plus, les méthodes classiques d'identification morpho-anatomique des CMA ont montré l'existence de 11 morphotypes de spores de CMA dans la rhizosphère du safran et ont mis en exergue la corrélation existant entre les pratiques culturales du safran et la diversité des spores de CMA et leur colonisation des racines.

Par ailleurs, l'étude des métabolites secondaires des CE a montré une activité antibactérienne des extraits de *Rhizopus oryzae* et une activité antioxydante chez *Aspergillus niger* et *Rhizopus oryzae*.

Le dernier volet de cette thèse a été consacré à la validation dans un essai au champ du potentiel biofertilisant des trois meilleures souches PGPR sélectionnées *in vitro* sur la culture du safran à Taliouine.

**Mots-clés** : *Crocus sativus* L. (safran) ; Taliouine; mycorhizes ; PGPR ; biofertilisation ; champignons endophytes.

## ABSTRACT

---

Saffron (*Crocus sativus* L.) is a local product with a high added value which is within the most worldwide popular product and which is among the national priorities included in the Green Morocco Plan.

The objective of this thesis is the characterization and the valorization of the diversity of the rhizosphere microorganisms populations associated with saffron in the region of Taliouine.

Molecular identification has allowed, for the first time in Morocco, to reveal a large taxonomic diversity of these microorganisms, with eight genera of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF); three species of endophytic fungi (EF) and nine genera of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR).

In addition, classical morpho-anatomical identification methods for AMFs have shown the existence of 11 AMF spore morphotypes in the saffron rhizosphere and have highlighted the correlation between cultivation practices of saffron and AMF spore diversity and their colonization of the roots.

In addition, the study of EF secondary metabolites displayed an antibacterial activity of *Rhizopus oryzae* extracts and antioxidant activities in *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*.

The last part of this thesis was devoted to the validation through a field trial of the biofertilizing potential of the three best PGPR strains selected *in vitro* on saffron culture in Taliouine.

---

**Keywords:** *Crocus sativus* L. (saffron); Taliouine; mycorrhizae; PGPR; biofertilization; endophytic fungi.

## ***PRODUCTION SCIENTIFIQUE***

### ➤ **Publications**

- **Chamkhi Imane**, Sbabou Laila and Aurag Jamal. 2018. Endophytic Fungi Isolated from *Crocus sativus* L. (saffron) as a Source of Bioactive Secondary Metabolites. *Pharmacog J.* 10 (6):1143-8.
- **Chamkhi Imane**, Younes Abbas, Khadija Tarmoun, Jamal Aurag and Laila Sbabou (2018): Morphological and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungal communities inhabiting the roots and the soil of saffron (*Crocus sativus* L.) under different agricultural management practices, Archives of Agronomy and Soil Science, DOI:10.1080/03650340.2018.1548012
- **Chamkhi Imane**, Aurag Jamal and Sbabou Laila. Application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biological fertilizers for improving the growth, the yield and the secondary metabolites of saffron (*Crocus sativus* L.) (soumis)
- **Chamkhi Imane**, Sbabou Laila, Aurag Jamal. Molecular identification and activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from the rhizosphere of saffron (*Crocus sativus* L.). (en cours de finalisation)
- **Chamkhi Imane**, Aurag Jamal and Sbabou Laila. 2017. Application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biological fertilizers for improving the growth and yield of saffron (*Crocus sativus* L.). Belhouchette H. (dir.). *Conception de systèmes de production agricole et alimentaire durables dans un contexte de changement global en Méditerranée : recueil des résumés. Montpellier : CIHEAM-IAMM. 172 p. 1. Forum Méditerranéen de Doctorants et Jeunes Chercheurs, 2016/07/18 -19, Montpellier (France). ISBN : 978-2-85352-571-8.*

### ➤ **Communications**

- **Chamkhi Imane**, Aurag Jamal and Sbabou Laila. Plants Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) biofertilization: perspective for Saffron (*Crocus sativus* L.) crop improvement. *Nitrogen Fixation for Agriculture and Environment Proceedings of the 20th International Congress on Nitrogen Fixation Granada, Spain. Du 03 au 07 Septembre 2017.*
- **Chamkhi Imane**, Sbabou Laila, Aurag Jamal. Characterization and identification of potential plant growth-promoting bacteria isolated from the rhizosphere of saffron (*Crocus sativus* L.)

growing in the region of Taliouine (Morocco). *The 5th International symposium on saffron biology and technology, Agadir, Maroc. Du 23 au 26 Novembre 2016.*

- **Chamkhi Imane**, Abbas Younes, Tarmoun Khadija, Aurag Jamal and Sbabou Laila. Molecular identification of Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in root and morphological characters analysis of spores isolated from rhizosphere soil of *Crocus sativus* L. (saffron). *The 5th International symposium on saffron biology and technology, Agadir, Maroc. Du 23 au 26 Novembre 2016.*
- **Chamkhi Imane**, Aurag Jamal and Sbabou Laila. Effect of Plants Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) inoculation as biofertilizers on yield, growth and quality of Moroccan saffron (*Crocus sativus* L.). *The 5th International symposium on saffron biology and technology, Agadir, Maroc. Du 23 au 26 novembre 2016. (Prix meilleure communication).*
- **Chamkhi Imane**, Aurag Jamal and Sbabou Laila. Application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biological fertilizers for improving the growth and yield of saffron (*Crocus sativus* L.). *1<sup>st</sup> Mediterranean Forum for PhD Students and Young Researchers «Designing Sustainable Agricultural and Food Production Systems under Global Changes in the Mediterranean », Montpellier, France. Du 18 au 19 Juillet 2016.*
- **Chamkhi Imane**, Sbabou Laila et Aurag Jamal. Etude d'une communauté bactérienne promotrice de la croissance du safran (*Crocus sativus* L.) poussant dans la région de Taliouine (Maroc). *Congrès International «Biotechnologie au service de la Société» Faculté des sciences et techniques- Fès, Maroc. Du 22 au 24 Octobre 2015.*
- **Chamkhi Imane**, Sbabou Laila and Aurag Jamal. Characterization of beneficial microorganisms isolated from the rhizosphere of saffron (*Crocus sativus* L.). *Congrès International Rhizosphere 4 : Streching the Interface of Life, Maastricht, Royaume des Pays-Bas. Du 21 au 25 Juin 2015.*
- **Chamkhi Imane**, Sbabou Laila et Aurag Jamal. Isolement, caractérisation et identification des microorganismes rhizosphériques du safran (*Crocus sativus* L.). *Doctoriales 2015 de la FSR 4<sup>ème</sup> Edition sous le thème L'employabilité, la création d'Entreprises et la Formation par la Recherche. Du 19 au 20 Février 2015. (Prix meilleure communication).*

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ABC</b> : ATP Binding Cassette	<b>NFB</b> : Nitrogen-free broth
<b>ACC</b> : Aminocyclopropane-1-carboxylate	<b>NH<sub>4</sub>Cl</b> : Chlorure d'ammonium
<b>ACP</b> : Analyse en composantes principales	<b>P</b> : Phosphore
<b>ADNr</b> : Acide désoxyribonucléique ribosomique	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b> : Pentoxyde phosphoré
<b>AIA</b> : Acide β-indolacétique	<b>PCR</b> : Réaction de polymérisation en chaîne
<b>AMF</b> : Arbuscular Mycorrhizal Fungus	<b>PDA</b> : Potato dextrose agar
<b>ANOVA</b> : Analyse de variance	<b>PDB</b> : Potato dextrose broth
<b>AOP</b> : Appellation d'Origine Protégée	<b>PGPR</b> : Plants Growth Promoting Rhizobacteria
<b>ARN</b> : Acide ribonucléique	<b>pH</b> : Potentiel hydrogène
<b>Asc A</b> : Acide ascorbique	<b>PVK</b> : Pikovskaya
<b>BCBT</b> : Test de blanchiment de β-carotène	<b>RAPD</b> : Réaction d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe
<b>BHT</b> : Hydroxytoluène butylé	<b>SDS</b> : Sodium dodécyl sulfate
<b>Blast</b> : Basic Local Alignment Search Tool	<b>SSU</b> : Sous-unité nucléaire
<b>CA</b> : Analyse de correspondance	<b>TBE</b> : Tris acide borique EDTA
<b>CaCl<sub>2</sub></b> : Chlorure de calcium	<b>TY</b> : Yeast Extract-Tryptone
<b>CAS</b> : Chrome-azurol S	<b>UFC</b> : Unités formant colonies
<b>CMA</b> : Champignons Mycorrhiziens Arbusculaires	<b>UV</b> : Ultraviolet
<b>DO</b> : Densité optique	<b>YEM</b> : Yeast Extract-Mannitol
<b>DPPH</b> : α, α-diphényl-β-picrylhydrazyle	
<b>EDTA</b> : Ethylène diamine tétraacétique	
<b>EtAC</b> : Ethyle Acetate (Acétate d'éthyle)	
<b>FAO</b> : Organisation des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture	
<b>Fe<sup>3+</sup></b> : Ions ferriques	
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> : Peroxyde d'hydrogène	
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup></b> : Dihydrogenphosphate	
<b>HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b> : Hydrogénophosphate	
<b>IGP</b> : Indication Géographique Protégée	
<b>ISO</b> : Organisation internationale de normalisation	
<b>ITS</b> : Espaceur interne transcrit nucléaire	
<b>K</b> : Potassium	
<b>KCl</b> : Chlorure de potassium	
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> : Potassium dihydrogen phosphate	
<b>KOH</b> : Hydroxyde de potassium	
<b>LA</b> : Label Agricole	
<b>LAMA</b> : Laboratoire des moyens analytiques	
<b>LB</b> : Luria-Bertani	
<b>LSD</b> : Least Significant Differences	
<b>LSU</b> : Grande sous-unité	
<b>N</b> : Azote	
<b>N<sub>2</sub></b> : diazote	
<b>NaCl</b> : Chlorure de sodium	
<b>NCBI</b> : National Center for Biotechnology Information	

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b>	Composition chimique du safran .....	10
<b>Tableau 2 :</b>	Composition pariétale et teneur en composés hydrosolubles par rapport à la matière sèche. ....	11
<b>Tableau 3 :</b>	Données relatives à l'échantillonnage pour l'enquête socioéconomique. ....	14
<b>Tableau 4 :</b>	Description des champs étudiés .....	33
<b>Tableau 5 :</b>	Liste des isolats obtenus à partir des 3 échantillons du sol et classés selon leurs activités.....	42

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b>	<i>Crocus sativus</i> L. (safran) (photos personnelles).....	4
<b>Figure 2:</b>	Caractéristiques morphologiques de la fleur du safran .....	5
<b>Figure 3:</b>	Cycle de développement du safran. ....	7
<b>Figure 4:</b>	Représentation schématique des interactions rhizosphériques possibles médiées par des exsudats radiculaires. ....	16
<b>Figure 5:</b>	Mécanismes directs et indirects des bactéries PGPR influençant la croissance des plantes.....	18
<b>Figure 6:</b>	Principaux types mycorhiziens représentés sur une coupe transversale de racine.....	22
<b>Figure 7:</b>	Classification phylogénétique des champignons CMA.....	25
<b>Figure 8:</b>	Carte de localisation de Taliouine. ....	31
<b>Figure 9:</b>	Echelle de la densité de colonisation du cortex racinaire .....	35
<b>Figure 10:</b>	Schéma de l'expérimentation au champ à la ferme 1.2.3 SAFRAN, Talakht-Taliouine .....	47



## LISTE DES ANNEXES

<b>Annexe 1 :</b>	Les milieux .....	161
<b>Annexe 2 :</b>	Les réactifs .....	163
<b>Annexe 3 :</b>	Les protocoles des kits .....	164
<b>Annexe 4 :</b>	Liste des photos .....	165

# TABLE DES MATIÈRE

<b>DEDICACES</b> .....	i
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	ii
<b>RESUME</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>PRODUCTION SCIENTIFIQUE</b> .....	vii
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	ix
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	x
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	xi
<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	xii
<b>TABLES DES MATIERES</b> .....	xiii
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
I. <i>Crocus sativus</i> L. (le safran).....	4
1. Généralités .....	4
2. Classification et description botanique.....	4
3. Caractéristiques génétiques.....	6
4. Cycle biologique .....	6
5. Exigences de la culture du safran .....	7
6. Techniques culturales du safran .....	8
7. Composition chimique du safran et caractéristiques qualitatives des stigmas.....	9
7.1. Métabolites secondaires du safran .....	9
7.2. Composition pariétale et composés hydrosolubles .....	10
7.3. Évaluation de la qualité : arôme, goût et pouvoir colorant selon la norme ISO .....	11
8. Utilisations du safran .....	11
9. Distribution du safran .....	13
9.1. Le safran dans le monde.....	13
9.2. Le safran au Maroc .....	13
10. Stratégies d'amélioration pour du safran biologique au Maroc.....	15
II. Interactions microorganismes –plantes pour une agriculture et un environnement durable : rôle des bactéries PGPR, mycorhizes et champignons endophytes. ....	15
II-A. Les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) .....	17

1. Les activités biologiques les plus intéressantes des PGPR .....	18
1.1. Synthèse de l’auxine : le régulateur de croissance des plantes .....	18
1.2. Solubilisation du phosphate .....	19
1.3. Production des sidérophores .....	19
1.4. Fixation biologique de l'azote .....	20
2. Autres activités biologiques des PGPR .....	21
II.B. Les mycorhizes .....	22
1. Généralités .....	22
2. Différents types de mycorhizes .....	22
2.1. Les ectomycorhizes .....	22
2.2. Les endomycorhizes .....	23
2.3. Les ectendomycorhizes.....	23
3. L’identification moléculaire et la classification des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA).....	23
4. Le Rôle et l’importance des champignons mycorhiziens .....	25
4.1. La dissolution des minéraux et l’absorption de l’eau .....	26
4.2. L’importance des mycorhizes dans la réduction du besoin en phosphate et en azote..	26
4.3. Résistance à certains stress biotiques et abiotiques .....	27
4.4. L’effet des champignons sur la structure et la stabilité du sol.....	27
II.C. Les champignons endophytes .....	28
1. Généralités et définition des champignons endophytes .....	28
2. Classification des champignons endophytes .....	28
3. Importance des champignons endophytes comme source de produits naturels bioactifs.....	29
4. Composés bioactifs des champignons endophytes .....	29
<b>Chapitre II. MATERIELS ET METHODES</b>	
1. Zone d’étude .....	31
2. Analyses physico-chimiques du sol .....	31
<b>Volet I: Caractérisation morphologique et moléculaire des communautés fongiques mycorhiziennes arbusculaires occupant les racines et le sol du safran (<i>Crocus sativus</i> L.) selon différentes pratiques de gestion agricole</b>	
1. Description des champs étudiés .....	32
2. Echantillonnage des sols et des racines du safran .....	33
3. Extraction des spores .....	33

4. Description morphologique et abondance relative des spores .....	34
5. Eclaircissement, coloration et observation des racines .....	34
6. Paramètres d'évaluation des mycorhizes .....	34
7. Identification moléculaire des champignons mycorhiziens .....	35
7.1. Extraction de l'ADN à partir des racines et amplification partielle par PCR d'une région d'ADNr de la grande sous-unité (LSU) .....	35
7.2. Construction d'une banque génomique .....	36
7.2.1. Clonage des ARNr amplifiés des CMA.....	36
7.3. Séquençage des ARNr clonés et dépôt des résultats sur NCBI .....	37
7.4. Analyse phylogénétique des CMA isolés et identifiés .....	37
8. Analyse statistique des données de diversité et quantitatives des mycorhizes.....	37

**Volet II: Les champignons endophytes isolés de *Crocus Sativus* L. (safran) comme source de métabolites secondaires bioactifs**

1. Isolement des champignons endophytes .....	38
2. Identification moléculaire des champignons endophytes isolés .....	38
3. Extraction des métabolites secondaires des champignons endophytes .....	38
4. Etude de l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes .....	39
4.1. Préparation des bactéries .....	39
4.2. Méthode de diffusion sur disques .....	39
5. Activité antioxydante des extraits de champignons endophytes.....	39
5.1. Méthode $\alpha$ , $\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle (DPPH) .....	40
5.2. Méthode de l'acide $\beta$ -carotène-acide linoléique (BCBT) .....	40
6. Analyse statistique des résultats des tests des activités anitbactériennes et antioxydantes...	41

**Volet III: Isolation, identification moléculaire et évaluation des activités biologiques des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) isolées de la rhizosphère du safran (*Crocus sativus* L.).**

1. Echantillonnage du sol rhizosphérique d'une safranière de Taliouine .....	41
2. Isolement sélectif des PGPR et codage des isolats .....	41
3. Evaluation des activités biologiques des collections bactériennes .....	42
3.1. Collection 1 des PGPR productrices de l'auxine .....	42
3.2. Collection 2 des PGPR productrice des sidérophores .....	43
3.2.1. Test qualitatif de production des sidérophores .....	43
3.2.2. Test semi-quantitatif de production des sidérophores .....	43

3.3. Collection 3 des PGPR solubilisatrices du phosphate inorganique.....	44
3.3.1. Test qualitatif .....	44
3.3.2. Test quantitatif .....	44
3.4. Screening des souches multi-PGP .....	44
4. Identification moléculaire des isolats PGPR du safran .....	45
4.1. Extraction de l'ADN génomique .....	45
4.2. Amplification par PCR et séquençage des gènes de l'ADNr 16S .....	45
4.3. Dépôt des séquences au niveau de la base de données NCBI .....	46
4.4. Etude phylogénétique des isolats PGPR sur la base de l'ADNr 16S .....	46
5. Analyse statistique des résultats quantitatifs des PGPR .....	46

**Volet IV : Effet de l'inoculation par des PGPR isolées sur l'amélioration de la croissance, le rendement et la qualité du safran (*Crocus sativus* L.)**

1. Dispositif expérimental de l'inoculation au champ.....	47
2. Conception de l'inoculum .....	47
2.1. Sélection des rhizobactéries .....	47
2.2. Test d'antagonisme .....	48
3. Inoculation des cormes du safran .....	48
4. Etude de l'effet de l'inoculation sur le safran .....	49
4.1. Echantillonnage des plantes de safran.....	49
4.2. Détermination de la teneur en chlorophylle.....	49
4.3. Détermination de la qualité du safran .....	49
5. Analyses statistiques des données .....	49

**CHAPITRE III. Résultats et discussion**

**Article 1: Morphological and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungal communities inhabiting the roots and the soil of saffron (*Crocus sativus* L.) under different agricultural management practices**

1. Présentation de l'article 1 .....	51
2. Introduction – objectif .....	52
3. Article 1 .....	54
4. Synthèse - conclusion .....	69

**Article 2: Endophytic Fungi Isolated from *Crocus sativus* L. (saffron) as a Source of Bioactive Secondary Metabolites**

1. Présentation de l'article 2 .....	72
2. Introduction – objectif .....	73
3. Article 2 .....	74
4. Synthèse - conclusion .....	79

**Article 3: Isolation, identification and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria associated to roots of saffron (*Crocus sativus* L.)**

1. Présentation de l'article 3 .....	82
2. Introduction – objectif .....	83
3. Article 3 .....	85
4. Synthèse - conclusion .....	108

**Article 4: Application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biological fertilizers for improving the growth, the yield and the quality of saffron (*Crocus sativus* L.)**

1. Présentation de l'article 4 .....	111
2. Introduction – objectif .....	112
3. Article 4 .....	113
4. Synthèse -conclusion .....	138

**CHAPITRE IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

1. Conclusion générale .....	141
2. Perspectives .....	144

**REFERENCES .....**

**ANNEXES .....**

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

L'agriculture connaît des changements fondamentaux dans le monde entier. Par le passé, l'objectif principal était d'augmenter le potentiel de rendement des cultures et leur productivité, alors qu'aujourd'hui, le dynamisme de la productivité est de plus en plus combiné avec la demande de la durabilité. Ce qui permettrait de satisfaire les besoins de l'homme tout en maintenant la qualité de l'environnement et en conservant les ressources naturelles pour l'avenir. L'amélioration de la durabilité agricole nécessite l'utilisation et la gestion optimales de la fertilité des sols et de ses propriétés physico-chimiques. Cela implique des pratiques de gestion qui améliorent l'activité biologique des sols et de leur biodiversité (Egamberdieva et al. 2015). L'étude des modèles de biodiversité est une étape cruciale pour atteindre l'un des principaux objectifs de l'écologie à savoir comprendre la répartition des organismes (Lubchenco et al. 1991). Les écologistes s'intéressent depuis longtemps à la relation entre la productivité et la diversité (Claire Horner-Devine et al. 2003).

L'utilisation de microorganismes et l'exploitation d'interactions bénéfiques plantes-microorganismes offrent des stratégies prometteuses et respectueuses de l'environnement pour l'agriculture conventionnelle et biologique dans le monde entier (Berg 2009). Bien que les microbiologistes aient étudié l'impact de la diversité microbienne sur la stabilité de la fonction de l'écosystème depuis les années 1960 (Hairston et al. 1968), il y a maintenant un intérêt accru pour l'effet de la diversité des communautés microbiennes sur la fonction écologique et la résilience aux perturbations des écosystèmes du sol. L'utilisation de microorganismes bénéfiques s'est révélée être une option écologiquement rationnelle pour augmenter les rendements des cultures. Les microorganismes sont essentiels au maintien de fonctions essentielles du sol, ils participent à des processus clés tels que la structuration du sol, la décomposition de la matière organique, l'élimination des toxines, la suppression des maladies, et jouent un rôle clef dans les cycles du carbone, de l'azote, du phosphore et du soufre (Garbeva et al. 2004).

La rhizosphère est la zone du sol influencée par les racines des plantes. Elle est composée de populations microbiennes qui sont en quelque sortes différentes du reste des populations du sol, généralement dénommé comme «l'effet de la rhizosphère» (Okon et al. 2015). Les interactions entre les plantes et les microorganismes peuvent influencer positivement la croissance des plantes grâce à divers mécanismes. La promotion de la croissance des plantes par les



microorganismes repose sur une meilleure acquisition des nutriments, la stimulation hormonale et plusieurs mécanismes directement ou indirectement liés à la croissance des plantes, comme la réduction/suppression des pathogènes des plantes (Berg 2009; Nihorimbere et al. 2011).

Le présent projet vise d'une part une meilleure caractérisation et la valorisation de la diversité des populations de microorganismes rhizosphériques associés à *Crocus sativus* L. (safran) dans la région de Taliouine et d'autre part la sélection et le développement d'inocula bactériens capables de promouvoir la croissance du safran. Le safran est une plante utilisée à des fins médicinales, comme épice et condiment et comme colorant depuis l'Antiquité (Gresta et al. 2009). La culture du safran constitue l'un des principaux supports de l'économie de la région de Taliouine au sud du Maroc et fait la spécificité de cette région au niveau national. C'est la culture la plus rentable dans la zone puisqu'elle est l'épice la plus chère au monde. Aussi, le safran fait figure de nouvelle ressource territoriale, susceptible de faire émerger une nouvelle destination touristique. Il est devenu représentatif d'une identité culturelle locale (Aziz and Sadok 2015). Vu l'importance de cette plante dans le monde et au Maroc, le safran figure parmi les produits retenus dans le cadre de la stratégie de développement des produits du terroir au Maroc «Plan Maroc Vert» (Aboudrare et al. 2014).

Les travaux de la présente thèse sont inscrits dans le cadre de cette problématique et visent à étudier la diversité et les capacités biologiques des microorganismes rhizosphériques promoteurs de la croissance et leurs contributions dans le développement de *C. sativus* L. afin d'améliorer quantitativement et qualitativement sa production. Ceci permettrait de limiter l'apport des engrais chimiques et leur remplacement, au moins partiellement, par des inocula microbiens et ainsi préserver et pérenniser les conditions de culture biologique du produit de terroir qu'est le safran.

Ce travail est subdivisé en quatre volets:

**Volet I :** vise à approfondir la compréhension des interactions plantes microorganismes en identifiant les mycorhizes en symbiose avec la plante du safran. Le but de ce volet est la caractérisation morphologique des spores des mycorhizes présentes dans la rhizosphère et l'identification moléculaire de la communauté des mycorhizes colonisant les racines du safran. L'étude a été effectuée sur cinq champs de safran influencés par trois pratiques de gestion agricole: la date de la plantation, la méthode de la plantation et le type de fertilisation.

**Volet II :** a pour objectif d'isoler les champignons endophytes à partir des racines du safran, de les identifier et d'étudier certaines activités biologiques des métabolites secondaires extraits de ces microorganismes (activités antibactérienne et antioxydante).

**Volet III :** s'intéresse aux bactéries promotrices de la croissance (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) colonisant la rhizosphère du safran. Cette étude vise à isoler les bactéries PGPR à sur des milieux sélectifs, de les identifier par les outils moléculaires et tester leurs activités biologiques comme : la synthèse d'auxine, la solubilisation du phosphate, la production de sidérophores et la fixation biologique de l'azote.

**Volet IV :** vise à valoriser les résultats du volet précédent (volet III) en testant les effets des bactéries PGPR sur la croissance du safran au champ. Une expérimentation a été effectuée à Taliouine en utilisant les trois meilleures bactéries PGPR identifiées précédemment comme inoculum du safran. La production et la qualité du safran ont été suivies pendant trois ans.

**CHAPITRE I**  
**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. *Crocus sativus* L. (safran)

### 1. Généralités

Le mot *Crocus* est originaire du mot grec «*krokos*» qui signifie filament par référence aux stigmates de la plante. On obtient l'épice du safran par déshydratation de ses trois stigmates rouges (Figure 1). Couramment appelé «safran» vient du mot «*asfar*» en arabe signifiant jaune *via* le mot «*zaferân*» qui est le nom de l'épice en arabe due à sa propriété essentielle, appelé aussi «l'or rouge», car c'est l'épice la plus chère et rare au monde. Originaire de la Grèce, l'Asie et la Perse, le safran s'est propagé de l'est vers le Nord de l'Inde et de la Chine. Introduit en Espagne au Xe siècle après Jésus-Christ par les arabes, plus tard sa culture a été propagée aux pays voisins en Europe du Sud (Sampathu et al. 1984).



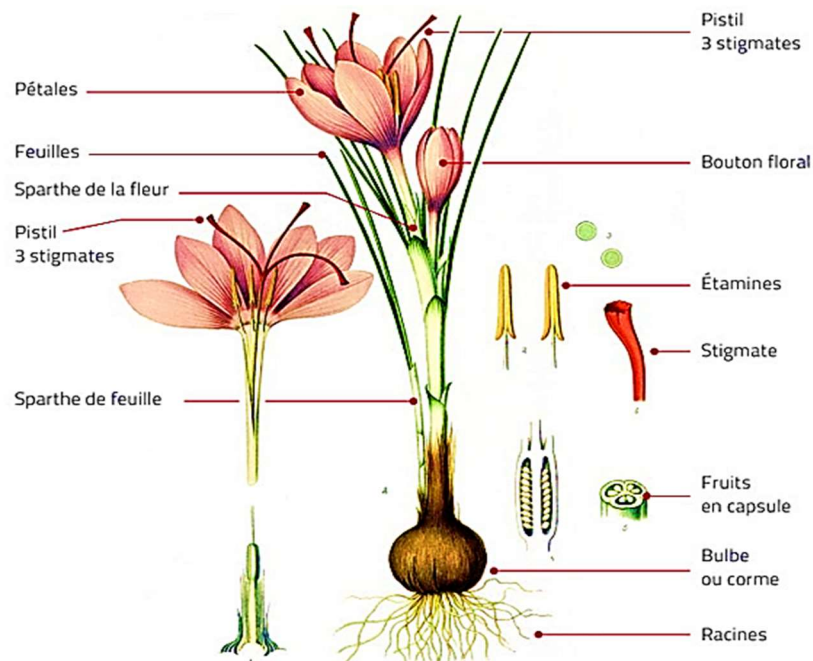
**Figure 1:** *Crocus sativus* L. (safran) (photos personnelles)

### 2. Classification et description botanique

Le genre *Crocus* regroupe environ 70 espèces, appartient à la division de Spermatophyta, sous division d'angiosperme, la classe de Monocotyledonae, sous classe de Liliidae, ordre de Liliales, la Famille d'Iridacées, le genre du *Crocus* et l'espèce *C. sativus* (Saxena 2010).

La plante du safran ne peut se reproduire que par multiplication végétative des cormes en raison de la stérilité des fleurs de type hermaphrodite. Le périanthe floral se compose de trois tépales externes et trois tépales internes qui sont sous forme tubulaire. Les organes de reproduction dont l'androcée qui est formée de trois étamines distinctes de couleur jaune et un gynécée qui comprend un ovaire infère à trois loges, surmonté d'un style qui se divise en trois stigmates sous forme d'un cornet très étroit, évasé sur la partie supérieure (Tsaftaris et al. 2007). Le pistil est composé d'un ovaire inférieur qui est surmonté par un style mince de 9 à 10 cm de long. Le style est divisé en 3 branches nommés stigmates de couleur rouge foncée de 30 à 40 mm de longs qui tombent sur les segments du périanthe. Quelques variantes de safran avec un nombre plus élevé de stigmates ont été rapportées (Gresta et al. 2009). Les cormes ou les bulbes sont des formations tuberculeuses, écrasées, aplaties à la base d'environ 4,5-5,5 cm de diamètre, et

recouvert par plusieurs tuniques fibreuses réticulées d'une coloration brune jaunâtre. Les cornes du safran possèdent un ou deux bourgeons principaux en position d'apex et environ 4-5 bourgeons secondaires ou plus, disposés irrégulièrement sous forme de spirale. Les bourgeons secondaires sont plus petits que les cornes produits par les bourgeons apicaux, chaque corne mère produit 1-3 cornes-fille. Les feuilles du safran sont au nombre de 6 à 9, dressées, étroites, au limbe long, étroit, de couleur verte sombre terminées en pointe et divisées par une ligne argentée. Le safran a deux types de racines: racines fibreuses fines à la base du corne mère et racines contractiles formées à la base des bourgeons latéraux, plus épais que le premier avec un organe de tubercule ce qui donne au corne la capacité de maintenir la profondeur dans le sol (Gresta et al. 2009; Saxena 2010). A la base du corne mère se développe des racines fasciculées longues par rapport aux racines contractiles, qui sont courtes et épaisses, se développant à la base du nouveau corne et permettant à celui-ci d'occuper la place de l'ancien corne en fin de cycle. Un troisième type de racines nommées «racines contractiles-absorbantes» qui sont plus longues et plus épaisses et atteignent leur taille maximale en mi-janvier (Renau-Morata et al. 2012) (Figure 2).



**Figure 2:** Caractéristiques morphologiques de la fleur du safran (Birouk et al. 2011)

### 3. Caractéristiques génétiques

Le safran est une espèce de géophyte triploïde ( $x = 8$ ;  $2n = 3x = 24$ ), stériles, incapables de produire des semences (Gresta et al. 2008; Saxena 2010). Sa stérilité causée par une méiose triploïde qui entraîne de nombreuses anomalies dans la sporogénèse, le développement du gamétophyte et dans la production anormale de pollen. Environ 70% des ovules de *C. sativus* contiennent un sac de type polygonatum normal à la maturité, lors de la détection d'un taux faible de viabilité du pollen et l'anomalie de la germination méiotiques le safran donne une pollinisation auto-stérile à maturité (Gresta et al. 2008). L'origine génétique de *C. sativus* n'est pas claire: elle peut avoir par autotriploïdie d'un crocus sauvage, probablement par fécondation d'un ovule diploïde non réduit, par la cellule d'un gamète haploïde ou un ovule haploïde par deux gamètes haploïdes, soit par allopolyploïde à travers l'hybridation de *C. cartwrightianus* et de *C. hadriaticus* (Brighton 1977). Dans une étude caryologique suggère que les ancêtres possibles de *C. sativus* sont *C. cartwrightianus* (Brandizzi and Grilli Caiola 1998). Ces résultats de base ont été confirmés par une analyse de l'ADN polymorphique amplifié aléatoire (RAPD), le *C. sativus* est très étroitement apparenté à *C. cartwrightianus* et également similaire à *C. thomasii* (Caiola et al. 2004).

### 4. Cycle biologique

En tant qu'une plante géophyte ou cryptophyte, *C. sativus* se propage uniquement par mode végétatif, au moyen des cormes qui jouent le rôle de structures de stockage, caractérisés par un long repos estival. Le cycle biologique du safran commence avec sa croissance végétative au début de l'automne et s'étale du mois d'octobre jusqu'au mois d'avril (Figure 3). La particularité de la plante du safran est que la floraison se fait avant, en même temps ou après l'apparition des feuilles qui apparaissent lors de la floraison (Bergoin 2005). Au printemps, l'activité photosynthétique des feuilles permet la formation des cormes de remplacement (les cormes-filles ou bulbilles). Ensuite, quand la température augmente, les feuilles se flétrissent et la plante reste seulement au-dessous du sol (Gresta et al. 2008) (Figure 3). Le végétal entre dans une période de repos végétatif ou dormance avec l'arrivée des chaleurs estivales. Vers la fin du mois d'Août, le corme se réveille, son activité métabolique augmente et le cycle commence à nouveau par l'apparition des fleurs et des feuilles (Birouk et al. 2011). Contrairement à beaucoup d'autres espèces du genre *Crocus* qui fleurit pendant la période hivernale, la floraison du safran peut se produire de la mi-octobre à la fin de Novembre, essentiellement en fonction des conditions climatiques. En général, de 60 à 90 jours après la plantation, principalement en

fonction de froid qui peut retarder la floraison. L'induction de fleurs est un mécanisme très compliqué dans le safran. Peu d'informations sont disponibles sur l'induction des fleurs dans le safran; néanmoins, la floraison semble être principalement influencée par la température et la teneur en eau du sol (Gresta et al. 2008).

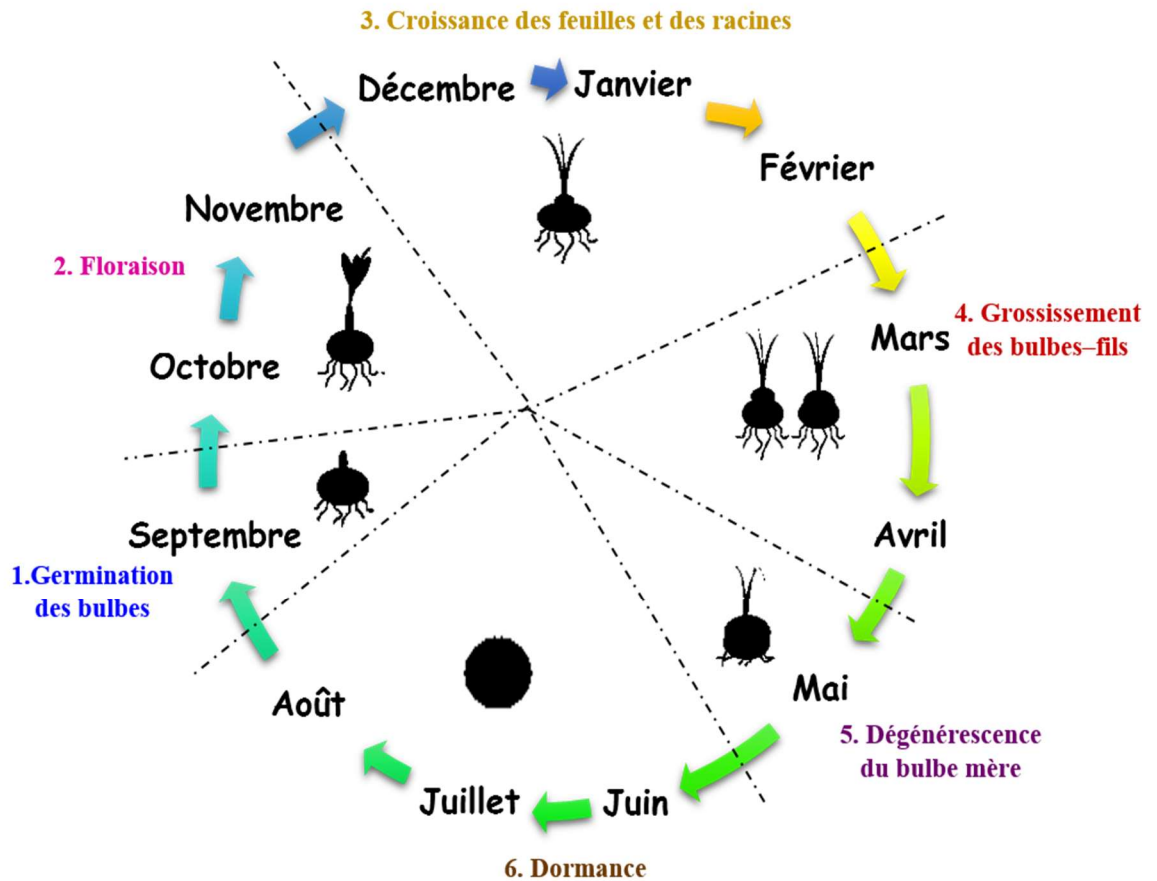


Figure 3: Cycle de développement de *C. sativus* L.

## 5. Exigences de la culture du safran

Le *Crocus* est une plante qui s'adapte à différents climats, du climat méditerranéen continental, comme au climat subtropical tempéré avec des étés chauds (jusqu'à 40°C) et secs et aussi des hivers frais (-18 °C) (Gresta et al. 2009). La culture supporte bien des températures très sévères, pouvant atteindre jusqu'à 40 °C en été et -18 °C en hiver et la neige occasionnelle d'hiver, même avec une productivité réduite (Gresta et al. 2008). Selon Mollafilabi (2004), les racines du safran tolèrent jusqu'à 22 °C et la température minimale induit la floraison d'où la réussite de la culture du safran cultivé dans divers environnements à travers le monde aussi bien en Asie

(Iran, Inde, Pakistan, Afghanistan, Azerbaïdjan,...) qu'en Europe (Italie, Grèce, Espagne, Suisse), ou encore en Afrique du Nord (Birouk et al. 2011).

Plusieurs auteurs suggèrent que les meilleurs types de sol pour la culture du safran sont les sols argileux et argilo-calcaires caractérisés par un bon drainage. D'autres auteurs rapportent que le crocus pousse mieux sur des sols limono-sablonneux ou sablonneux bien travaillés et bien drainés (Sampathu et al. 1984). Selon Mollafilabi (2004), le safran pousse bien sur les sols salins, mais la déficience en carbonate de calcium au niveau de ces sols pourrait constituer un facteur limitant pour la croissance de la plante. Le pH du sol favorable pour la culture du safran est neutre à légèrement alcalin (Gresta et al., 2008 ;Birouk et al., 2011).

## **6. Techniques culturales du safran**

### **• La plantation du safran**

Il existe 2 types de plantations pour cultiver le safran: **(i)** la méthode traditionnelle qui consiste en la culture des cornes du safran sous forme de masse dans des trous creusés dans le sol, à une profondeur de 8 à 10 cm, sans sillons ou rangées. Le terrain est planté et placé dans de petits lits d'environ 2,5 m<sup>2</sup>, puis la surface du sol est lissée par la truelle avec 3 à 15 de cornes dans chaque trou de (Mollafilabi, 2004; Moghadam et al., 2013) et **(ii)** la méthode moderne où les pistes de la safranière sont préparées selon des rangées et des sillons à 10 cm d'écart et à une distance de 5 à 6 cm entre les cornes d'une profondeur de 10 cm. La plantation moderne permet d'avoir suffisamment d'espace, de la nourriture pour chaque corne afin de produire plus de cornes-filles pour les années suivantes (Moghadam et al. 2013).

### **• Profondeur de culture**

La profondeur de la culture appropriée du safran est très importante parce qu'elle protège les cornes du gel en hiver et la chaleur en été. Planter les cornes à une profondeur supérieure à 20 cm risquerait de perturber l'apparition des fleurs et donc une perte de performances (Moghadam et al. 2013).

### **• Temps de culture**

La culture des cornes du safran commence au début du mois de Juin et continue jusqu'à la mi-septembre et à éviter lors des mois chauds de l'année (juillet et août) où l'air et la terre sont de très faible humidité relative ce qui peut endommager les cornes (Gresta et al. 2008). Au cours de la première année de plantation, on peut obtenir une récolte de 2,8 kg / ha de safran sec (Mollafilabi, 2004).



- **Irrigation**

Le premier temps d'irrigation est un facteur qui affecte la production du safran. Selon des études antérieures, la floraison commence lorsque la température atteint 12°C. Selon les agriculteurs, la première irrigation en automne aide à stimuler la croissance et la floraison. Cette irrigation doit être effectuée 15 à 20 jours avant l'apparition des fleurs où la température moyenne est d'environ 5 à 10 °C. L'irrigation précoce provoque l'apparition des feuilles plus tôt que les fleurs. La seconde irrigation est faite 35 jours après la première, la troisième irrigation est effectuée au début du printemps après le désherbage ainsi que l'utilisation du fumier et la dernière irrigation est effectuée à la fin de la saison de croissance en mois de mai (Moghadam et al. 2013).

- **Fertilisation**

Une quantité élevée d'engrais chimiques au niveau du sol, en particulier les engrais phosphoreux, réduit la productivité du safran. Ainsi, les analyses du sol sont très importantes afin d'orienter et rationaliser la fertilisation (Ramazani, 2000 cité par Moghadam et al. 2013).

- **Récolte du safran**

La floraison du safran se produit habituellement en automne (mi-octobre à mi-novembre). La température optimale pour la floraison est de 15°C à 17°C. Après la première irrigation et en fonction de la température de l'air, les fleurs de safran apparaissent. Comme elles peuvent apparaître plus tôt dans un temps froid et à l'ombre des arbres où plus tard dans un temps relativement chaud. Le safran est récolté traditionnellement et à la main et habituellement le matin avant le lever du soleil ou la température de l'air est faible et les fleurs ne sont pas encore ouvertes afin d'éviter leurs dommages (Moghadam et al. 2013).

## **7. Composition chimique du safran et caractéristiques qualitatives des stigmas**

### **7.1. Les métabolites secondaires du safran**

Le safran est une plante reconnue avec sa large gamme d'utilisations médicinales, plusieurs études biochimiques et phytochimiques ont montré de nombreux ingrédients biologiquement actifs (Tableau 1). Les molécules reconnues dans les stigmates, la crocine (responsable de la couleur), la picrocrocine (responsable du goût amer), le safranal (responsable de l'odeur et de l'arôme), sont les 3 composants caractéristiques du safran parmi les 150 composés actifs volatiles et non volatiles, dont la plupart sont des caroténoïdes, notamment zéaxanthine, le lycopène, ainsi que divers  $\alpha$  et  $\beta$  carotènes (Liakopoulou-Kyriakides and Kyriakidis 2002). Les volatiles avec une odeur très forte comprennent plus de 34 composants qui sont principalement des terpènes, des alcools terpéniques, et leurs esters. Les non-volatiles comprennent 14 crocines qui sont responsables de la couleur rouge ou brun rougeâtre des stigmates en plus des carotènes,

crocétine et picrocrocine. Ce dernier est responsable du goût amer et il est un précurseur glycosidique de safranal, qui est le principal principe organoleptique des stigmates. La crocine est responsable de la couleur jaune-orange du safran qui est le di-trans crocétine ( $\beta$ -D-gentiobiosyle) ester. La picrocrocine (4- ( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy) -2, 6,6-triméthyl-1-ène-1-carboxaldéhyde), est le glucoside amer responsable de la saveur du safran. Il a des propriétés insecticides et pesticides et peut comprendre jusqu'à 4% de safran sec. Le safranal (2,6,6-triméthyl-1,3-cyclohexadiène-1-carboxaldéhyde) est moins amer que la picrocrocine et peut constituer jusqu'à 70% de la fraction volatile du safran sec dans certains échantillons (Liakopoulou-Kyriakides and Kyriakidis 2002; Srivastava et al. 2010).

**Tableau 1** : Composition chimique du safran (Srivastava et al. 2010)

Composition chimique de safran		Analyse approximative du safran	
composants	Pourcentage de la masse	composants	Pourcentage de la masse
Carbohydrates	12-15	composant soluble dans l'eau	53
H <sub>2</sub> O	19-14	Gomme	10
Polypeptides	11-14	Pentosanes	8
Cellulose	4-7	pectines	6
Lipides	3-8	Amidon	6
Minérales	1-1,5	$\alpha$ Crocine	2
Non azotés	40	carotenoides	1
		Lipides	12
		Huiles non volatiles	6
		Huiles volatiles	1
		Proteines	12
		Matière inorganique	6
		Soluble HCl	0.5
		Eau	10
		Fibre	5

## 7.2. Composition pariétale et composés hydrosolubles

Le travail de Bergoin (2005) est l'un des principaux travaux qui ont traité le volet de la composition de la matière végétale du safran. Ce travail montre la richesse des feuilles en matières minérales et en cellulose plus que les cornes qui sont plus riches en composés hydrosolubles (Tableau 2). Cette composition est en relation avec le rôle de chaque organe : corne (réserve) et feuille (photosynthèse).

**Tableau 1:** Composition pariétale et teneur en composés hydrosolubles par rapport à la matière sèche (Bergoin, 2005)

	Feuilles		cormes	
	%	Ecart type <sup>a</sup>	%	Ecart type <sup>a</sup>
Matière minérale	10,2	0,1	1,0	0,6
Cellulose	23,9	0,4	5,0	0,1
Hémicellulose	5,5	0,7	5,3	0,4
Lignine	5,7	0,4	3,1	0,2
Hydrosolubles	49,4	0,4	73,4	0,2

<sup>a</sup> écart type sur la teneur (%)

### 7.3. Évaluation de la qualité du safran selon la norme ISO (Organisation internationale de normalisation)

La qualité du safran est chimiquement définie selon la puissance colorante de ses pigments, de l'amertume du picrocrocine et de l'intensité de l'arôme due à la composition de son huile volatile. Cette norme est basée sur un test spectrophotométrique à trois longueurs d'ondes de lecture différentes, à savoir 440, 330 et 257 nanomètres, correspondant à l'absorbance maximale d'esters de crocine, de safranal et de picrocrocine, respectivement. Un test rapide, peu onéreux et facile à réaliser (seulement un spectrophotomètre est nécessaire pour une mesure précise), mais il existe certainement plusieurs inconvénients: il est difficile de distinguer entre le safran authentique et les contaminants (surtout les adultérants qui ont des spectres d'absorbance de forme semblable à des pigments naturels), et donc d'attribuer de manière fiable sur le marché international. L'absorbance peut être directement liée à la concentration des molécules présentes en solution, à condition que cette solution ainsi que les autres conditions (température, solvant utilisé, forme physique, humidité, etc.) soient exactement les mêmes pour tous les échantillons. Les valeurs obtenues sont une estimation de la qualité de l'échantillon soumis à l'analyse (Gresta et al. 2008).

Tout en notant, le safran sec est très sensible aux fluctuations des niveaux de pH et se décompose chimiquement en présence de la lumière et de l'agent oxydant rapidement. Il doit donc être stocké dans des récipients étanches à l'air afin de minimiser le contact avec l'oxygène atmosphérique (Srivastava et al. 2010).

## 8. Utilisations du safran

- **Les propriétés médicinales du safran**

Les vertus médicinales du safran sont connues depuis l'antiquité par ces différentes utilisations antispasmodique, sédatif nerveux et gingival, carminatif, diaphorétique, stomachique...etc (Sampathu et al. 1984). Aussi, il est employé en médecine traditionnelle contre la scarlatine, la

variole, les rhumes, l'insomnie, la dépression et l'asthme. Plusieurs études ont montré de multiples propriétés thérapeutiques du *C. sativus* L. (Crozet et al. 2012). En effet, Fatehi et al. (2003), a étudié les effets des extraits de pétales de *C. sativus* sur la pression artérielle chez des rats, il a montré une réduction de la pression sanguine d'une manière dépendante de la dose. En plus, le safran est connu pour ses activités anticonvulsivantes (Hosseinzadeh and Talebzadeh 2005), l'activité antitussive (Pitsikas et al. 2008), l'effet sur le comportement sexuel (Hosseinzadeh and Talebzadeh 2005), les effets antigénotoxique et cytotoxiques, les effets antimutagène et cytotoxiques. Hosseinzadeh and Ghenaati (2006) suggèrent que le safran lui-même, ainsi que ses composants caroténoïdes, pourraient être utilisés comme agents potentiels de chimioprévention du cancer, comme anxiolytique et pourraient agir sur le comportement d'apprentissage et de potentialisation à long terme (Sugiura et al. 1995). Ils auraient des effets sur le débit sanguin oculaire et la fonction rétinienne (Xuan et al. 1999), des effets antinociceptifs et anti-inflammatoires (Hosseinzadeh and Younesi 2002), un effet sur la maladie de l'artère coronaire et comme antidépresseur (Srivastava et al. 2010).

- **Les propriétés tinctoriales et les utilisations cosmétiques et culinaires**

Le safran a un fort pouvoir colorant grâce au pigment  $\alpha$ -crocine, un caroténoïde hydrosoluble. En effet, un échantillon de safran en filaments peut colorer 100000 fois son volume d'eau et aucune couleur synthétique n'a pu imiter celle du safran. Autrefois, utilisé comme teinture des vêtements, du cuir, et aussi des cheveux (Srivastava et al. 2010). L'huile essentielle du safran, aux propriétés restructurantes basées sur l'effet antioxydant, est très recommandée pour les soins de peaux stressées ou abimées. Le safran surtout utilisé comme parfum, le safranal, un composé agréablement odoriférant, se développe au cours du processus de séchage, probablement par une dissociation enzymatique ou thermique à partir du picrocrocine le composé amer (Srivastava et al. 2010).

Plusieurs cuisines ont intégré le safran comme condiment dans la préparation des plats et desserts. La couleur et l'arôme du safran sont particulièrement appréciés. La cuisine marocaine ne fait pas l'exception et diversifie ses plats préparés avec du safran. Aujourd'hui on retrouve le safran intégré aussi dans quelques desserts. Et sans oublier le thé au safran qui est préparé exclusivement à Taliouine et qui symbolise la générosité de la région.

## **9. Distribution du safran**

### **9.1. Le safran dans le monde**

L'Iran, l'Inde, la Grèce, le Maroc et l'Espagne sont les principaux pays producteurs du safran dans l'ordre d'importance avec des productions moyennes annuelles respectives de 180 tonnes, 9 tonnes, 5,5 tonnes, 3 tonnes et 1 tonne sur la période entre 2004 et 2008, ce qui représente respectivement 90,1 %, 4,5 %, 2,8 %, 1,5 % et 0,5 % de la production mondiale (Dubois 2010). Le safran est également cultivé sur de faibles superficies en Azerbaïdjan, Afghanistan, France, Suisse, Italie, Turquie, Australie et Chine (Gresta et al., 2008; Wyeth and Malik 2008). Malgré la place importante du safran iranien dans le marché mondial l'Espagne reste le pays le plus associé à cette épice car l'Espagne contrôle bien actuellement le marché mondial du safran et plus particulièrement celui des Etats-Unis, considéré comme étant le principal marché de l'Espagne (Wyeth and Malik 2008). En effet, l'Espagne conditionne et réexporte près de 40 à 50 % du safran Iranien (Wyeth and Malik 2008). Les Emirats Arabes Unis sont également d'importants importateurs du safran Iranien (Ghorbani 2008). Les prix du safran ont connu, ces dernières années, une forte augmentation en raison, notamment, de la chute de production en 2006 et 2008 en Iran, premier pays producteur, à cause de la sécheresse et des spéculations des intermédiaires Iraniens ayant un contrôle sur le marché mondial du safran, le prix du safran Iranien est passé de 600 €/kg en 2006 à plus de 3500 €/kg en 2009 (Dubois 2010). Le prix du safran dans les marchés de haute valeur est très variable en fonction du type de certification et du type d'emballage. Ce prix dépasse les 11000 \$US/kg dans les marchés occidentaux (Aboudrare et al. 2014).

### **9.2. Le safran au Maroc**

Le safran est cultivé depuis des siècles dans la zone de Taliouine (province de Taroudant) sur une superficie de 565 ha, et plus récemment dans la zone de Taznakht (province d'Ouarzazate) sur une superficie de 105 ha (Aboudrare et al. 2014). Bien que le Maroc soit un petit producteur (environ 3 tonnes/an et 1,5 % de la production mondiale), son safran est hautement réputé au niveau national et international (Lage and Cantrell 2009). Le safran de Taliouine représente la quasi-totalité de la production du safran du Maroc. Cette zone située dans la région du Souss Massa Drâa, répartie sur la province de Taroudant (zone de Taliouine) et la province d'Ouarzazate (zone de Taznakht) (Dubois 2010).

La zone de Taliouine se trouve à la jonction du Haut-Atlas au Nord et de l'Anti-Atlas au Sud, elle est très montagneuse avec une difficulté d'accès d'une grande partie du territoire. La culture du safran est importante dans la région de Taliouine-Taznakht car la plante est adaptée à cette aire. Les caractères agronomiques de la plante avec une floraison en automne et une dormance en été, ainsi que l'adaptation aux conditions édapho-climatiques difficiles (faibles précipitations, sols pauvres) font du safran une culture alternative intéressante pour assurer une bonne production dans les systèmes d'agriculture durable (Birouk et al. 2011). Ce système permet de contribuer à l'amélioration des revenus des agriculteurs dans ces zones pauvres où il joue un rôle important pour la durabilité des systèmes de production et la viabilité sociale et économique des populations de cette région (Aboudrare et al. 2014, Aziz and Sadok 2015)

Sur un échantillon de 264 ménages répartis sur six communes rurales représentatives de la région Taliouine (Tableau 3), l'investigation socioéconomique de Aboudrare et al. (2014) sur l'importance de la filière du safran et son rôle dans la réduction de la pauvreté, a montré que le safran est la principale source de revenus pour les ménages et aussi une source de travail dans cette région.

**Tableau 3** : Données relatives à l'échantillonnage pour l'enquête socioéconomique (Aboudrare et al. 2014)

Altitude	Municipalité	Commune Rurale	Douar	Nombre de ménages	Nombre de ménages enquêtés	Poids d'échantillonnage (%)
Haute altitude (> 2000 m)	Taliouine	<b>Askaoune</b> (Introduction récente du safran)	Asfzimmer	110	24	21,8%
			Asggawre	48	8	16,7%
			Askaoune	92	25	27,2%
			Taourirte Oudghigh	16	5	31,3%
	Taznakht	<b>Siroua</b> (Introduction récente du safran)	Idghagh	42	13	31,0%
			Imaghlay	134	30	22,4%
Moyenne altitude (1700 m -1800 m)	Taliouine	<b>Assaïs</b> (Introduction du safran ancienne; Situé au nord de la zone d'étude au pied du Siroua)	Assais	22	10	45,5%
			Tagmoute	58	20	34,5%
			Mezouade	29	11	37,9%
		<b>Agadir Melloul</b> (Introduction ancienne du safran ; Situé sur les reliefs de l'Anti-Atlas au sud de la zone d'étude)	Iouliouil	30	10	33,3%
			Tinmalize	44	10	22,7%
Basse altitude	Taliouine	<b>Sidi Hssaïne</b> (Introduction très ancienne du safran)	Timassinine	47	14	29,8%
			Tizi	21	6	28,6%
			Agouni	28	8	28,6%

(1500 m - 1600 m)	Taznakht	<b>Iznaguene</b> (Introduction récente du safran)	Ighri	116	28	24,1%
			Ifenouane	77	30	39,0%
			Tinlif	31	12	38,7%
Total					264	

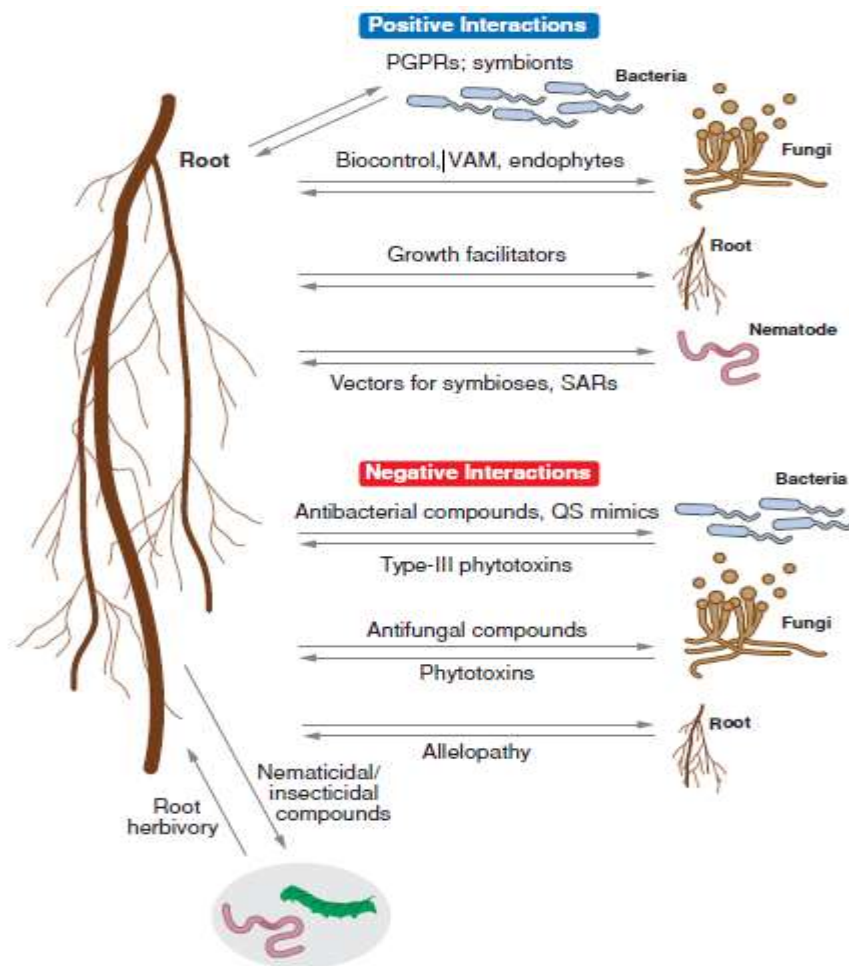
## 10. Stratégies d'amélioration pour un safran biologique au Maroc

Au Maroc, le safran fait partie des filières de production végétale retenues dans le Plan Maroc Vert avec une ambition d'augmenter son rendement, dans le cadre de la stratégie de développement et la valorisation des produits du terroir pour les populations des zones montagneuses de la région de Taliouine-Taznakht. En vue de l'organisation de la filière et la valorisation du safran, depuis 2007, le Ministère de l'Agriculture, le Conseil Régional Souss-Massa-Drâa et les Organisations non Gouvernementales locales (associations et coopératives) avec le soutien de la FAO (Organisation des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture), ont investi pour améliorer ce produit rare qui présente la source d'emploi et de revenus pour les petits producteurs, notamment dans les zones marginalisées. En 2008, une nouvelle loi (loi 25-06) a été adoptée afin de protéger l'origine et la qualité du safran. Cette loi vise la certification des produits du terroir en général par trois labels: le Label Agricole (LA), l'Indication Géographique Protégée (IGP) et l'Appellation d'Origine Protégée (AOP). Une loi qui favorise la culture du safran biologique, en outre, la certification du safran par un label de qualité reconnu à l'échelle nationale et internationale (AOP, Label Biologique) faciliterait l'accès aux marchés de haute valeur ajoutée (marché biologique, commerce équitable) (Aboudrare et al. 2014).

## II. Interactions microorganismes–plantes pour une agriculture et un environnement durable : rôle des bactéries PGPR, mycorhizes et champignons endophytes

Les scientifiques s'intéressent depuis longtemps à l'utilisation de microorganismes potentiels et efficaces comme inoculant pour le sol et les plantes afin de modifier l'équilibre microbologique de manière à améliorer la qualité du sol et les cultures agricoles respectueuses de l'environnement (Singh et al. 2011). Les micro-organismes maintiennent la croissance des plantes et ont donc des effets primaires sur la qualité du sol et de la culture (Garbeva et al. 2004). Une large gamme d'avantages est possible en fonction de leur prédominance et de leur activité à tout moment, dans la perspective d'obtenir un rendement agronomique maximal de haute qualité, sans l'utilisation d'engrais artificiels, d'herbicides, d'insecticides et de pesticides (Singh et al. 2011).

La rhizosphère se caractérise par la richesse en microorganismes qui est due à l'abondance d'exsudats énergétiques (diffusion passive hors des cellules comme les sucres et les acides aminés) ou de sécrétions et excréments (processus actif consommant de l'énergie, comme les enzymes ou des acides organiques) produits par les racines, ou encore sous forme de cellules mortes et lysats (les cellules de la coiffe et du cortex racinaires) et qui représentent un apport très important pour la matière organique (Lynch and Whipps 1990). Ces signaux chimiques peuvent provoquer des réponses différentes de différents receveurs, classées comme des associations positives (des associations symbiotiques avec des épiphytes, des champignons mycorhiziens et des bactéries favorisant la croissance des plantes) ou négatives (la compétition ou le parasitisme chez les plantes, la pathogénèse par des bactéries ou des champignons et les invertébrés) (Bais et al. 2006) (Figure 4).

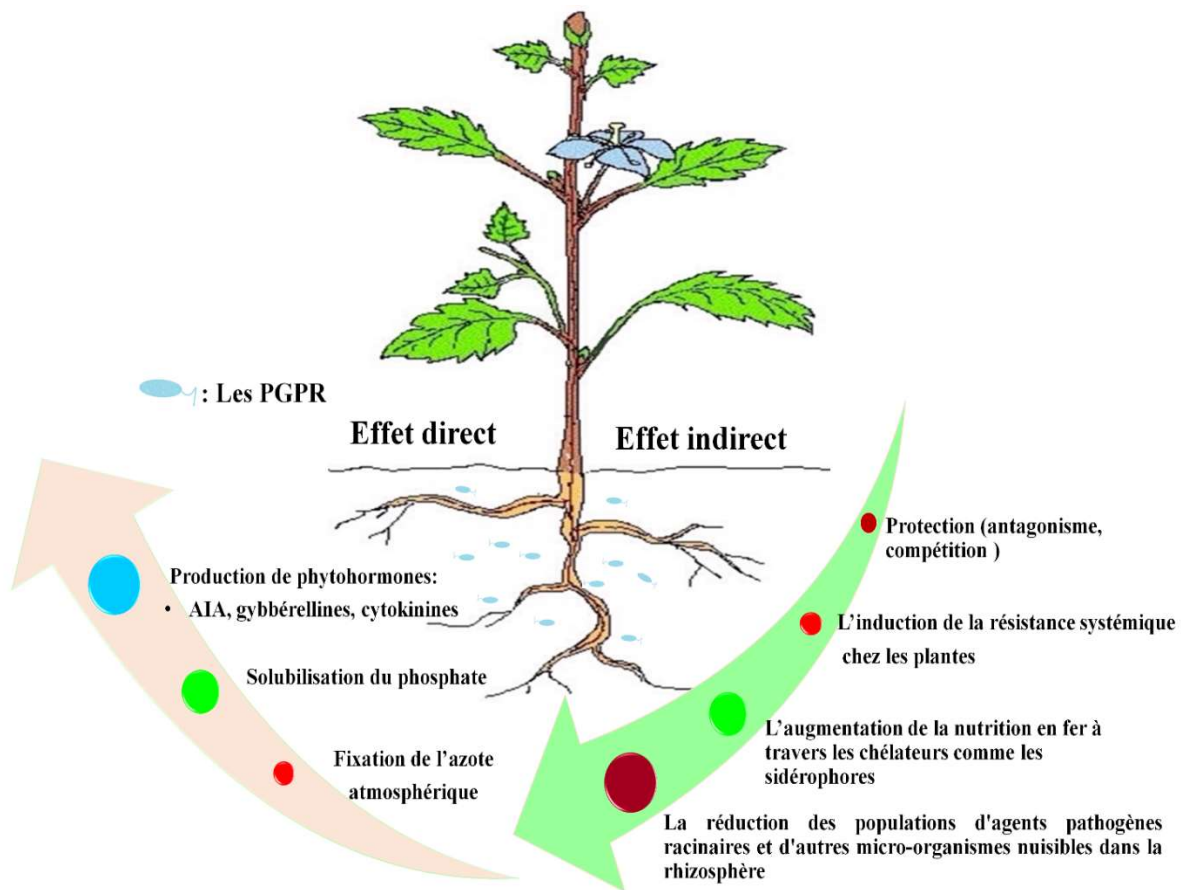


**Figure 4:** Représentation schématique des interactions rhizosphériques possibles médiées par des exsudats radiculaires (Bais et al. 2006). VAM : les mycorhizes vésiculaires à arbuscules ; SARs : la résistance systémique acquise ; QS : La détection du quorum.



## **II-A. Les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)**

Les PGPR au sens large sont les bactéries de la rhizosphère qui influencent d'une façon positive et bénéfique la croissance des plantes et ceci en colonisant la rhizosphère au niveau du rhizoplan (surface de la racine) ou la racine elle-même (dans les tissus racinaires) (Nihorimbere et al. 2011; Singh et al. 2011). Ces bactéries sont susceptibles de localiser les racines des plantes à travers des signaux exsudés de la racine, tels que les glucides et les acides aminés qui stimulent la chimiotaxie avec les bactéries (Bais et al. 2006, Nihorimbere et al. 2011). L'effet positif de ces bactéries sur la croissance des plantes peut être direct ou indirect (Figure 5). Les bactéries qui exercent un effet direct sur la croissance des plantes le font par la production de phytohormones, la solubilisation des phosphates inorganiques, l'augmentation de la nutrition en fer à travers les chélateurs comme les sidérophores et des composés qui affectent les voies de signalisation de la plante. Par ailleurs, les bactéries qui ont un effet indirect sur la croissance agissent grâce à l'antibiose, la compétition pour l'espace et les nutriments, l'induction de la résistance systémique chez les plantes contre un large spectre de pathogènes foliaires, la réduction des populations d'agents pathogènes racinaires et d'autres micro-organismes nuisibles dans la rhizosphère (Nihorimbere et al. 2011). Généralement toutes les actions directes et indirectes des PGPR ont un effet observable sur les différents paramètres de croissance des plantes (rendement des plantes cultivées, des fruits.....) (Singh et al. 2011).



**Figure 5:** Mécanismes directs et indirects des bactéries PGPR influençant la croissance des plantes

## 1. Les activités biologiques les plus intéressantes des PGPR

### 1.1. Synthèse d'auxine: le régulateur de croissance des plantes

Le PGPR peut produire différentes phytohormones comme l'auxine (acide  $\beta$ -indolacétique(AIA)), l'acide gibbérellique et les cytokinines dans le sol rhizosphérique (Shrivastava et al. 2015). L'auxine est l'une des hormones les plus importantes dans la vie de la plante, car impliquée pratiquement au niveau de tous les aspects de la croissance de la plante comme, l'activation des réactions biochimiques, le contrôle de la division cellulaire chez les plantes, la stimulation de l'élongation des cellules des parties aériennes de la plante, la détermination des sites de différenciation des vaisseaux conducteurs et contribution à ce que les cellules vasculaires forment des faisceaux connectés les uns aux autres, la reproduction et la croissance des fruits. Les concentrations les plus élevées en auxine ont été retrouvées dans des fruits en développement et la modification de l'architecture des racines (Vanneste and Friml 2009). Ce dernier point est particulièrement important, puisqu'il a été montré que l'action de

l'auxine produite par les bactéries modifie la morphologie des racines en augmentant le nombre de racines latérales et de poils racinaires, cet élargissement de la surface de la racine favorise la nutrition et l'absorption d'eau par les racines des plantes (Lambrecht et al. 2000). Certains facteurs peuvent influencer la synthèse d'auxine par les bactéries, surtout chez les rhizobactéries, comme la présence de tryptophane, précurseur de l'AIA, qui se trouve au niveau des exsudats racinaires. Cependant, certaines bactéries comme *Azospirillum* et les cyanobactéries utilisent une voie de biosynthèse d'AIA indépendante du tryptophane (Merzaeva and Shirokikh 2010).

### **1.2. Solubilisation du phosphate**

Le phosphore est l'une des exigences nutritionnelles les plus essentielles dans la croissance des plantes. Les sols peuvent avoir un grand réservoir de phosphore total, mais avec des faibles quantités disponibles pour les plantes dues à ses formes insolubles, vu que la quantité de phosphate sous forme d'ions assimilables par les cultures dans le sol n'est que 10% ( $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) (Shrivastava et al. 2015). Plusieurs micro-organismes solubilisants de phosphate sont maintenant enregistrés pour convertir la forme insoluble du phosphore en une forme soluble par acidification, sécrétion d'acides organiques ou de protons et des réactions de chélation et d'échange (Shrivastava et al. 2015). Parmi les acides organiques produits par les bactéries solubilisatrices des phosphates, on trouve les acides lactique, citrique, 2-cétogluconique, malique, oxalique, malonique, tartrique et succinique. De nombreux facteurs influent sur la dissolution du phosphate naturel dans le sol tels que la composition chimique, la taille des particules de phosphate naturel, les caractéristiques du sol et le pH (Panhwar et al. 2013).

### **1.3. Production des sidérophores**

Le mot sidérophore est issu du grec, avec « sidéros » qui signifie le fer et « phore » qui signifie porteur. Les sidérophores sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire, utilisés par les bactéries comme l'un des systèmes les plus efficaces pour l'acquisition du fer. En effet le fer est un élément très peu disponible dans les sols et sa capture est difficile car les ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ) et leurs dérivés sont très insolubles. Afin de surmonter cette situation, plusieurs microorganismes sécrètent des sidérophores qui complexent les ions ferriques et les fournissent aux cellules. Ceci est possible grâce à la très haute affinité des sidérophores pour les ions ferriques, qui vont être chélatés et extraits à partir de nombreux complexes minéraux ou organiques, les rendant ainsi accessibles aux microorganismes (Neilands 1995). Parmi les sidérophores les plus communs on peut citer: les hydroxamates, les phénolates, les

carboxylates ou les catécholates. Au niveau des mécanismes moléculaires impliqués, après fabrication et sécrétion des sidérophores par les microorganismes dans les conditions de faible disponibilité du fer, le complexe sidérophore-fer atteint la surface de la cellule et se lie à une protéine réceptrice du sidérophore. Le fer est ensuite libéré pour entrer directement dans la cellule ou bien tout le complexe sidérophore-fer est transporté dans la cellule par un transporteur à ATP Binding Cassette (ABC). Dans les milieux naturels, comme la rhizosphère, la capacité d'utiliser des sidérophores hétérologues produits par d'autres membres de la microflore rhizosphérique est un facteur positif (Loper and Henkels 1999). Ceci constitue l'un des mécanismes par lesquels les agents de lutte biologique agissent pour inhiber la croissance des agents pathogènes dans la rhizosphère ou même stimuler positivement l'organisme cible à synthétiser son sidérophore natif (Khan et al. 2006).

#### 1.4. Fixation biologique de l'azote

L'azote est un nutriment végétal principal, important et limitant dans l'écosystème agricole en raison de sa perte par les pluies et la lixiviation minérale (Shrivastava et al. 2015). La conversion de l'azote atmosphérique en ammoniac par des bactéries symbiotiques, associatives et vivantes est importante à l'environnement et à l'agriculture mondiale, car la fixation de l'azote est une partie importante du cycle de l'azote ; elle reconstitue la teneur globale en azote de la biosphère et compense les pertes subies en raison de la dénitrification. La capacité de fixer l'azote est trouvée génétiquement dans la plupart des groupes bactériens, y compris les firmibacteria, les actinomycètes, les cyanobactéries et toutes les subdivisions des protéobactéries (Dixon and Kahn 2004). Les rhizobia symbiotiques sont les PGPR les plus exploitées et les plus longtemps étudiées pour leur capacité à fixer l' $N_2$  atmosphérique en symbiose avec leurs plantes hôtes appartenant à la famille des légumineuses (Vessey 2003). D'autres bactéries fixatrices sont non symbiotiques telles que *Klebsiella pneumoniae* et *Pantoea agglomerans*, elles fixent l'azote atmosphérique à l'état libre dans le sol (Shrivastava et al. 2015). La capacité des microorganismes à fixer l'azote en symbiose ou non améliore le rendement des cultures et pourrait remplacer en partie les engrais azotés (Vessey 2003), qui constituent la plus grande interférence humaine dans le cycle de l'azote. Les engrais suscitent de grandes inquiétudes concernant l'augmentation des émissions d'oxydes d'azote, l'acidification des sols et l'eutrophisation de l'eau. Au contraire l'azote fixé biologiquement est moins enclin à la lixiviation et à la volatilisation car il est utilisé *in situ* et, par conséquent, le processus biologique contribue d'une manière importante et durable à l'agriculture (Dixon and Kahn 2004). Les bactéries fixatrices d'azote représentent ainsi un grand potentiel d'applications agro-biotechnologiques, surtout que

la fixation de l'azote à des effets bénéfiques sur la croissance des plantes surtout à certains stades de croissance végétale tels que la floraison, le remplissage des grains (Okon et al. 2015), l'augmentation de la hauteur des plantes (Dixon and Kahn 2004) et en général elle influence positivement sur le rendement de nombreuses cultures agronomiques importantes (Shrivastava et al. 2015).

## **2. Autres activités biologiques des PGPR**

En plus de leur action phytostimulatrice, certaines PGPR interviennent dans l'amélioration de l'adaptation des plantes vis-à-vis des stress biotiques et abiotiques (Dimkpa et al. 2009). Selon Glick (2005) les bactéries PGPR possèdent une enzyme, l'aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (ACC désaminase), qui dégrade l'ACC en  $\alpha$ -cétobutyrate et en ammoniac, ce dernier étant utilisé comme source d'azote par la bactérie. Or l'ACC est le précurseur de l'éthylène, qui est une phytohormone qui joue un rôle clé dans les voies de transduction des signaux liés au stress. Sa synthèse augmente lorsque la plante est exposée à différents types de stress environnementaux tels que stress hydrique, carence en éléments nutritifs, ou toxicité des métaux lourds (Glick 2005; Dimkpa et al. 2009).

La découverte de composés organiques volatils produits par les rhizobactéries constitue un mécanisme important. Ces composés, tels que les terpènes et les jasmonates, peuvent agir comme molécules de signalisation pour les microorganismes, comme ils peuvent déclencher des réponses de la plante en colonisant les racines (Shrivastava et al. 2015).

Certaines interactions des PGPR avec les plantes médicinales améliorent la puissance de ces plantes, en particulier celles cultivées. Ainsi les éliciteurs, qui sont des produits chimiques libérés en raison de la réaction antagoniste des plantes contre les phytopathogènes, peuvent déclencher des effets physiologiques et des réponses morphologiques ainsi que l'accumulation de phytoalexines dans les plantes. Le traitement des plantes avec des éliciteurs biotiques peut provoquer une série de réactions de défense, y compris l'accumulation d'une gamme de molécules bioactives défensives de plantes telles que les phytoalexines dans les plantes intactes ou l'induction des gènes responsables de la synthèse de métabolites antimicrobiens. Les microorganismes de la rhizosphère sont mieux connus pour agir comme des éliciteurs biotiques, qui peuvent induire la synthèse des métabolites secondaires dans les plantes (Kandavel 2010; Shrivastava et al. 2015).

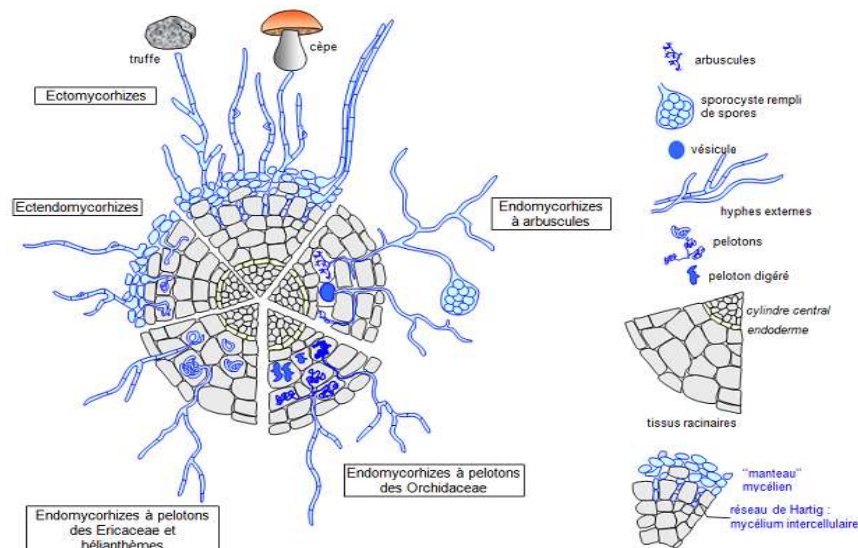
## II.B. Les mycorhizes

### 1. Généralités

Le terme mycorrhiza provient des mots grecs *mukes* = champignon et de *Rhiza* = racine, une association intime et à bénéfice réciproque entre les racines d'une plante et les filaments mycéliens d'un champignon (Le Tacon et al. 1985). Les mycorhizes se retrouvent dans de nombreux environnements et leur succès écologique reflète un degré élevé de diversité dans les capacités génétiques et physiologiques des endophytes fongiques (Bonfante 2001).

### 2. Différents types de mycorhizes

La position taxonomique de la plante et des champignons définit les types de mycorhizes, dont la principale distinction est entre les endomycorhizes, les ectomycorhizes et une structure intermédiaire sous le nom d'ectendomycorhize (Bonfante 2001) (Figure 6).



**Figure 6:** Principaux types mycorhiziens représentés sur une coupe transversale de racine (Le Tacon et al. 1985)

#### 2.1. Les ectomycorhizes

L'association mutualiste de la symbiose ectomycorhizienne entre les racines des plantes et des champignons du sol se traduit par la formation d'ectomycorhizes, organe mixte, et par l'apparition de fructifications appelées sporophores visibles à proximité de la plante hôte (Bâ et al. 2011). Ces champignons n'entrent pas dans les cellules racines et c'est pourquoi elles sont référencées comme Ecto (externe). Grâce à l'espace entre les cellules de la racine les rangées de ces champignons fournissent un réseau dense appelé réseau Hartig pour l'échange de

métabolites avec la plante hôte. La détection d'ectomycorhizes se fait aisément grâce à des changements morphologiques de la gaine racinaire (Alizadeh 2011) (Figure 6).

## **2.2. Les endomycorhizes**

Ce type de champignons pénètre dans les cellules de la racine de la plante hôte, en produisant des arbuscules et vésicules à l'intérieur de la cellule. Dans certains types de champignons endomycorhizes, les vésicules ne sont pas formées, ce type peut se référer aux champignons mycorhiziens qui appartiennent au genre *Gigaspora* et *Scutellospora* (Alizadeh 2011). Les arbuscules se localisent dans la partie interne des cellules des racines après avoir pénétré dans la chaîne des divisions cellulaires successives, tout en produisant des branches bifurquées, deviennent progressivement plus mince et subtile et crée en totalité un organe qui ressemble à de petits arbustes qui facilitent l'échange métabolique entre le champignon et la plante. La vésicule apparaît principalement dans la période végétative moyenne à tardive, où les organes qui sont semblables à des sacs, entraînent souvent un gonflement à la fin des champignons et se forment à l'intérieur ou entre la racine et sont progressivement accumulés par des gouttelettes de lipide et forment des organes de stockage et de repos (Duponnois and Plenchette, 2003; Alizadeh, 2011).

## **2.3. Les ectendomycorhizes**

Dans ce type d'association mychorizienne, le réseau Hartig est réduit (parfois absent), et les hyphes intracellulaire pénètrent les cellules épidermiques et corticales des racines (Yu et al. 2001). Ces champignons pénètrent dans les espaces entre les cellules et dans les cellules végétales hôtes et ont des organes d'aspiration partagés (Arbuscular) particulièrement formés à l'intérieur de la cellule et la vésicule se trouve à l'intérieur ou à l'extérieur du tissu hôte et forme principalement des spores ou des sporocarpes avec des structures complexes (Assigbetse et al. 2005). Les champignons d'ectomycorhizes peuvent former le mode mycorhize Ectendo sur différents hôtes et dans de bonnes conditions (Klironomos et al. 2000).

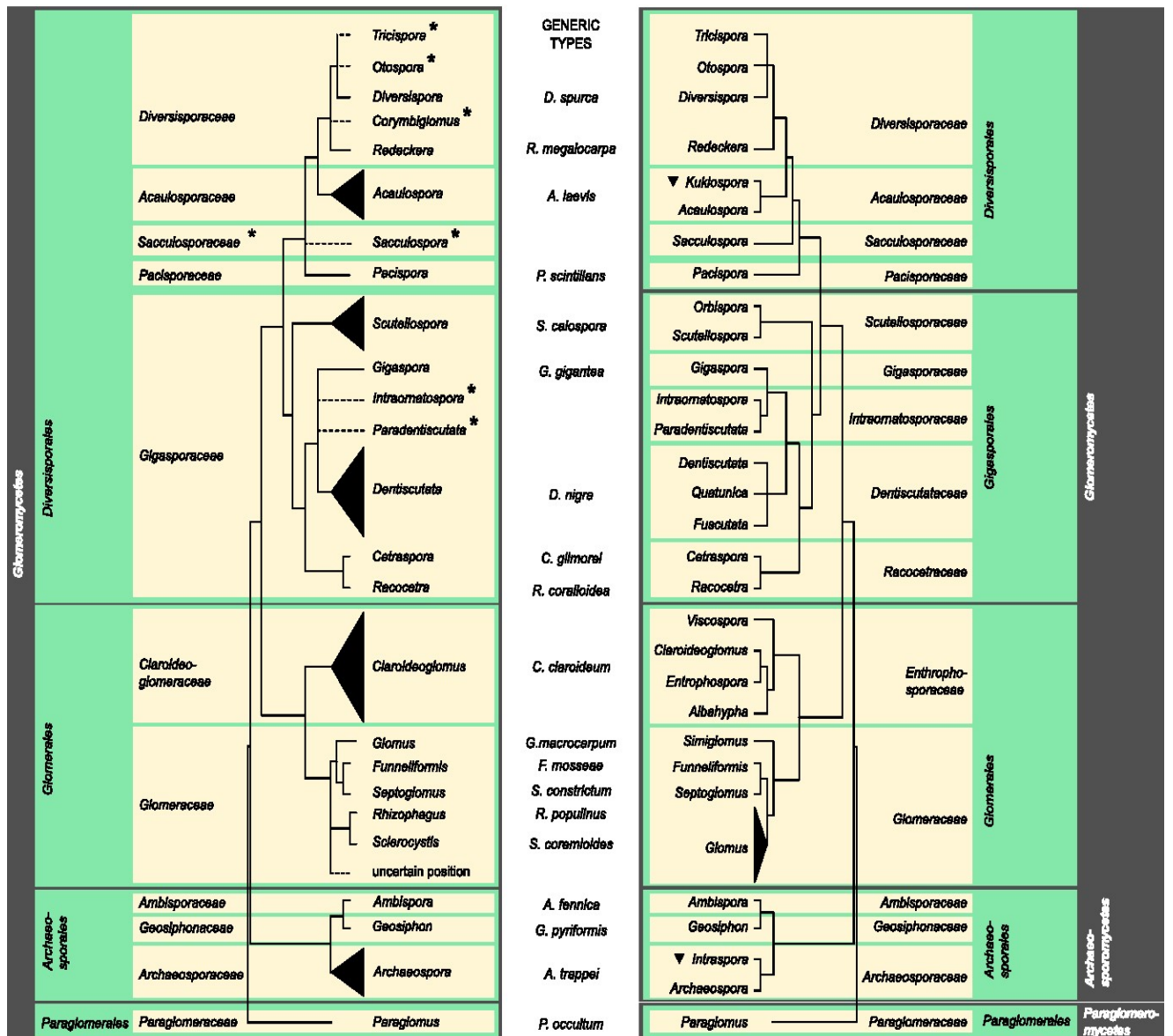
## **3. L'identification moléculaire et la classification des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)**

Le phylum des Glomeromycètes regroupe à ce jour 216 espèces décrites regroupées en 4 ordres: les *Glomerales*, les *Diversisporales* et deux lignées plus anciennes: les *Paraglomerales* et les *Archeosporales*, 13 familles et 19 genres (Schüßler 2002).

La phylogénie et la taxonomie des champignons MA continuent toujours à faire l'objet d'un débat important, en raison de la divergence et la séparation significatives entre les familles et les genres. Selon Redecker, le phylum Glomeromycota contient de nombreuses espèces dont la phylogénie est incertaine et les auteurs devraient être prudents lorsqu'ils érigent de nouveaux noms taxonomiques dans les Glomeromycota en raison de la confusion qui peut en résulter et parce que les corrections des données problématiques qui doivent être faites plus tard deviennent de plus en plus compliquées (Redecker et al. 2013).

Malgré l'importance écologique considérable des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA), la biologie et l'écologie de ces champignons ne sont toujours pas bien comprises. Cela s'explique en partie par leur mode de vie symbiotique, asexué et caché dans le sol et les racines. La caractérisation classique des CMA basée sur les structures de spores peut être insuffisante en raison de la différenciation morphologique limitée. Dans les études communautaires des CMA, une identification précise est cruciale. Elle repose de plus en plus sur la phylotaxonomie uniquement en fonction de données génétiques. Le plus couramment utilisé est le gène de l'ARNr de la petite sous-unité nucléaire (SSU) (Krüger et al. 2012). Cependant, dans les ensembles de données SSU, un phylotype (souvent défini par un niveau de similarité de séquence de 97%) peut représenter différentes espèces et, à l'inverse, différents phylotypes peuvent appartenir à une seule espèce et cela rend impossible la résolution d'espèces étroitement liées (Walker et al. 2007). La région la plus variable couvrant l'espaceur interne transcrit nucléaire 1 (ITS1), le gène de l'ARNr 5.8S et l'ADNr de ITS2 (ci-après dénommée la région ITS) a également été utilisé pour détecter les CMA (Redecker et al., 2000; Walker et al., 2007), mais souvent insuffisante pour discriminer des espèces très proches (Stockinger et al. 2010). En tant que marqueur avec une variabilité de séquence intermédiaire, le gène de l'ARNr de la grande sous-unité nucléaire (LSU), s'est avéré utile pour la détection des CMA (Gollotte et al., 2003; Mummey and Rillig, 2007). L'ensemble des données sur les séquences de régions d'ADNr nucléaire assemblées au cours de la dernière décennie devient suffisamment large au niveau taxonomique pour mener des études d'écologie moléculaire sur les communautés de CMA au champs (Krüger et al. 2012).





**Figure 7:** Classification phylogénétique des champignons CMA (Redecker et al. 2013). La classification consensuelle des Glomeromycota (panneau de gauche) en comparaison avec le système résumé par Oehl et al. (2011) (panneau de droite), y compris les taxons supplémentaires proposés par (Goto et al. 2012). Les lignes en pointillées indiquent les genres de position incertaine, les astérisques indiquent des preuves insuffisantes, mais aucune mesure officielle n'a été prise, les triangles inversés indiquent que les taxons ont déjà été rejetés dans les publications antérieures (Redecker et al. 2013).

#### 4. Le rôle et l'importance des champignons mycorhiziens

La mycorrhization c'est une interaction mutualiste, qui a un avantage net pour les deux parties grâce à différentes activités biologiques nutritives; elle représente un bio-fertilisant, un bio-protecteur et un bio-régulateur du développement des plantes.

#### **4.1. La dissolution des minéraux et l'absorption de l'eau**

Les mycorhizes jouent un rôle très important dans l'acquisition de nutriments minéraux au niveau du sol et peuvent aussi libérer activement des éléments nutritifs à partir des particules minérales et des surfaces de roche par intempéries grâce à des acides organiques de faible poids moléculaire (Finlay 2008). Cependant les plantes seules sont incapables d'optimiser le prélèvement par les racines des éléments minéraux du sol, comme le phosphore et l'azote. Grâce à son réseau mycélien, le champignon peut donc avoir accès à des ressources supplémentaires en éléments minéraux, qui sont transmises ensuite à la plante hôte. Egalement les mycorhizes sont connues par la fonction d'absorption de l'eau grâce au vaste réseau d'hyphes qui prospectent le sol en exploitant une surface bien plus grande que celle parcourue par les racines seules (Govindarajulu et al. 2005).

#### **4.2. L'importance des mycorhizes dans la réduction du besoin en phosphate et azote**

Le phosphate est un nutriment minéral essentiel pour la croissance des plantes avec des capacités de diffusion très limitées dans les sols. Son absorption rapide à partir de la solution du sol par les racines des plantes génère des zones d'épuisement de phosphate à la surface de la racine, ce qui entraîne une diminution du phosphate directement absorbé par la surface de la plante. Le réseau de mycélium fongique relié aux racines augmente de plusieurs ordres de grandeur le volume du sol qui peut être exploré par une plante afin qu'une racine mycorhizienne soit plus efficace dans l'absorption des phosphates qu'une racine non mycorhizienne (Gianinazzi et al. 2010).

Les mycorhizes interviennent également dans la nutrition azotée, qui est un élément essentiel pour les plantes. Il entre dans la composition des principales molécules du vivant: les protéines, les acides, les coenzymes, les vitamines et les hormones. Par exemple, chez *G. intraradices*, l'analyse de l'expression des gènes du métabolisme de l'azote, a montré que les gènes impliqués dans l'assimilation de l'ammonium et la synthèse de l'arginine sont exprimés dans le mycélium extra-radical alors que les gènes impliqués dans la dégradation de l'arginine et la libération de l'ammonium sont plus fortement exprimés au sein du mycélium intra-racinaire (Govindarajulu et al. 2005).

### **4.3. Résistance à certains stress biotiques et abiotiques**

Les champignons mycorhiziens ont une gamme d'effets qui contribuent à l'amélioration de différents types de stress subis par leurs hôtes végétaux, y compris la toxicité des métaux, le stress oxydatif, le stress hydrique et les effets de l'acidification du sol, par différents mécanismes comme la production d'agents chélatants, régulation des gènes qui protègent contre les espèces réactives d'oxygène, amélioration de la protection contre le stress oxydatif induit par les métaux toxiques, la tolérance au stress hydrique. Plusieurs études suggèrent qu'une tolérance accrue des plantes mycorhizées au déficit hydrique peut impliquer la modulation des gènes végétaux induits par la sécheresse et cela peut jouer un rôle dans la tolérance accrue des plantes au stress hydrique et salin (Finlay 2008). Le contrôle de la régulation stomatique et l'ajustement osmotique de la plante par le champignon dans le cas de stress hydrique (Ruiz-Lozano 2003) offre une meilleure résistance au stress salin et aux métaux lourds.

Dans les régions désertiques marocaines, la sécheresse et la salinité ont causé de sérieux dommages, rendant toute activité agricole difficile voire impossible, donc l'utilisation de champignons mycorhiziens résistants aux contraintes hydriques et capables d'aider les plantes, auxquelles ils sont associés, à tolérer les conditions climatiques défavorables, est l'un des moyens biologiques prometteurs.

Les champignons mycorhiziens offrent également à la plante une résistance à certains pathogènes, car lors de la colonisation racinaire par un champignon endomycorhizien, ces derniers sont perçus par la plante sensiblement de la même manière qu'un pathogène. Les mêmes voies métaboliques caractéristiques de l'induction de la résistance systémique sont déclenchées, permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque ultérieure par un organisme pathogène (Liu et al. 2007).

### **4.4. L'effet des champignons sur la structure et la stabilité du sol**

Au cours du développement du symbiote mycorhizien au niveau des racines, les hyphes fongiques développent un réseau complexe et ramifié dans le sol environnant qui peut atteindre jusqu'à 30m d'hyphes fongiques par gramme de sol, ce réseau peut constituer jusqu'à 50% du mycélium fongique dans le sol, ce réseau mycéliel peut avoir une action contraignante sur le sol et améliorer la structure du sol. De plus, la sécrétion de substances protéiques hydrophobes et collantes, appelée glomaline par les champignons MA contribue à la stabilité du sol et la rétention de l'eau, la combinaison d'un réseau hyphal étendu et de la sécrétion de glomaline est considéré comme un élément important pour aider à stabiliser les agrégats de sols, ce qui

entraîne une stabilité et une qualité structurelles accrues des sols (Gianinazzi et al. 2010). Une réduction de la biomasse fongique entraînera un effet négatif sur la stabilité du sol et, par conséquent, augmentera le risque d'érosion des sols.

## **II.C. Les champignons endophytes**

### **1. Généralités et définition des champignons endophytes**

L'endophytisme des champignons ou les champignons endophytes utilisé pour les champignons vivant à l'intérieur des plantes (Hardoim et al. 2015). Ils peuvent croître dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire, au-dessous des couches cellulaires épidermiques, peuvent vivre dans les plantes au-dessus des parties du sol en particulier dans les feuilles, dans les fentes intracellulaires de racines, qui est l'un des principaux porte d'entrée de ces micro-organismes sans causer d'effets négatifs (Gunatilaka 2006). Ils sont hétérotrophes colonise l'intérieur d'un organisme végétal, de manière asymptotique, prélèvent des nutriments à l'hôte sans que celui-ci ne présente de quelconques signes de maladie. Les champignons et les bactéries sont les microorganismes les plus courants vivants en tant qu'endophytes, mais les plus souvent isolés sont les champignons (Hardoim et al. 2015). Les endophytes fongiques peuvent exprimer des relations avec différents hôtes, y compris symbiotiques, mutualistes, commensalismes et parasites en réponse au génotype de l'hôte et aux facteurs environnementaux (Bano et al. 2016).

### **2. Classification des champignons endophytes**

Les champignons endophytes regroupent actuellement 4 classes, divisés selon la famille, la localisation dans les tissus de l'hôte et le mode de transmission (Rodriguez et al. 2009).

Les champignons endophytes de la classe 1, appartenant à la famille des *Clavicipitaceae* (Ascomycota) (Sung et al. 2007), constituée de 37 genres dont quatre possèdent des espèces capables d'endophytisme: *Balansia*, *Ephelis*, *Epichloë* et *Neotyphodium* (Bacon and White 2000).

Les champignons endophytes de la classe 2 sont tous issus de Dikarya. Ils sont en majorité constitués d'Ascomycota (uniquement des Pezizomycotina), comprennent également quelques représentants des Basidiomycota (Agaricomycotina, Pucciniomycotina) (Rodriguez et al. 2009).

La classe 3 est aussi issue des Dikarya. Ils sont en majorité constitués d'Ascomycota, en particulier les Pezizomycotina, (familles des Sordariomyceta, Dothideomyceta, Pezizomyceta,

Leotiomyceta et Eurotiomyceta) et des Basidiomycota, plus souvent présents dans les tissus ligneux que dans les tissus foliaires (Higgins et al. 2007; Rodriguez et al. 2009).

Par contre la position phylogénétique de la classe 4 n'est pas encore clairement établie. Ils appartiendraient aux Ascomycota du sous-embranchement des Pezizomycotina: en particulier les ordres des Pleosporales, Pezizales et Helotiales (Porrás-Alfaro et al. 2008).

### **3. Importance des champignons endophytes comme source de métabolites secondaires naturels bioactifs**

La production favorable de métabolites secondaires biologiquement actifs résulte des interactions métaboliques des endophytes avec son hôte. Dans une relation microorganismes-plante, les endophytes produisent des substances qui ont divers types d'activités biologiques, tels que antibactérien et antifongique. Les différents groupes de champignons peuvent avoir un impact sur l'écologie, la forme physique et la forme des communautés végétales, conférant une résistance aux stress abiotiques (température, pH, pression osmotique) et biotiques (des bactéries, des champignons, des nématodes et des insectes) (Bano et al. 2016). Les endophytes sont capables de synthétiser des agents bioactifs, qui peuvent être utilisés par les plantes pour se défendre contre les agents pathogènes et motiver la croissance des plantes. De même elles constituent un nouveau champ de découverte de médicaments ; ce sont des sources latentes pour les filières pharmaceutiques et en particulier la création de nouveaux métabolites bioactifs tels que les agents antimicrobiens, anticancéreux et antiviraux (Pavithra et al. 2012).

### **4. Les composés bioactifs des champignons endophytes**

La relation intime entre les champignons endophytes et les plantes donne aux endophytes la puissante capacité de produire de nouvelles substances bioactives (Zhao et al. 2010). Ils comprennent des composés présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales. Il existe des agents antimicrobiens de nature alcaloïde (les chaetoglobosines A et C, les pyrrocidines A et B), les stéroïdes (ergostérol et 5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -épidioxyergostérol), les phénols (pestalachloride A et B), les quinines (les quinones 3-O-méthylaltermine et altersolanol A) et les peptides (leuesnostatin A, la cryptocandine et cyclo (Pro-Thr) (Zhao et al. 2010; Harms et al. 2011; Bano et al. 2016).

Jusqu'à présent, près de 50 espèces de champignons différents ont été identifiées, produisant une centaine de composés anticancéreux. Près de 19 classes chimiques différentes de métabolites secondaires fongiques ont été identifiées et déclarées posséder des propriétés anticancéreuses (Kharwar et al. 2011). Comme exemples d'agents anticancéreux, on trouve le

paclitaxel (taxol) qui est un composé bioactif diterpénoïde tétracyclique qui a une action efficace prouvée contre les cancers de la prostate et la podophyllotoxine qui est une lignane d'aryltétraline ayant d'importantes propriétés anticancéreuses, antivirales, antioxydantes, antibactériennes, immunostimulantes ainsi que des propriétés antirhumatismales (Zhao et al. 2010). D'autres composés possèdent une activité antioxydante importante, comme la pestacine et l'isopestacine et des activités antimycotiques et antifongiques. L'hypericine qui est un dérivé du naphthodianthrone possède également une efficacité thérapeutique (Bano et al. 2016).

# **CHAPITRE II.**

## **Matériel et méthodes**

## 1. Zone d'étude

L'échantillonnage du matériel biologique de cette étude a été fait dans la ferme 1.2.3.SAFRAN située à Talakhat-Taliouine-Maroc. Une zone située au sud de la province de Taroudant; Région de Souss Massa au Maroc (N30 ° 28'12.997 " / W7 ° 46'22.479 "), localisée et entouré au Nord, par la province d'El Haouz, à l'ouest par Aoulouz (Province de Taroudant) à l'Est par Taznakht (Province d'Ouarzazate) et au sud par la province de Tata (Figure 8). Le climat de cette région est connu sous le nom de steppe locale (Aziz and Sadok 2015). A Taliouine, la température moyenne annuelle est de 17,4 °C. Août est le mois le plus chaud de l'année avec une température moyenne de 26,4 °C, tandis que le mois de janvier est le mois le plus froid, avec une température moyenne de 8,7 °C. Les précipitations sont faibles, avec une moyenne annuelle d'environ 317 mm (source: CLIMATE-DATA.ORG, <http://fr.climatedata.org/location/37264/>).

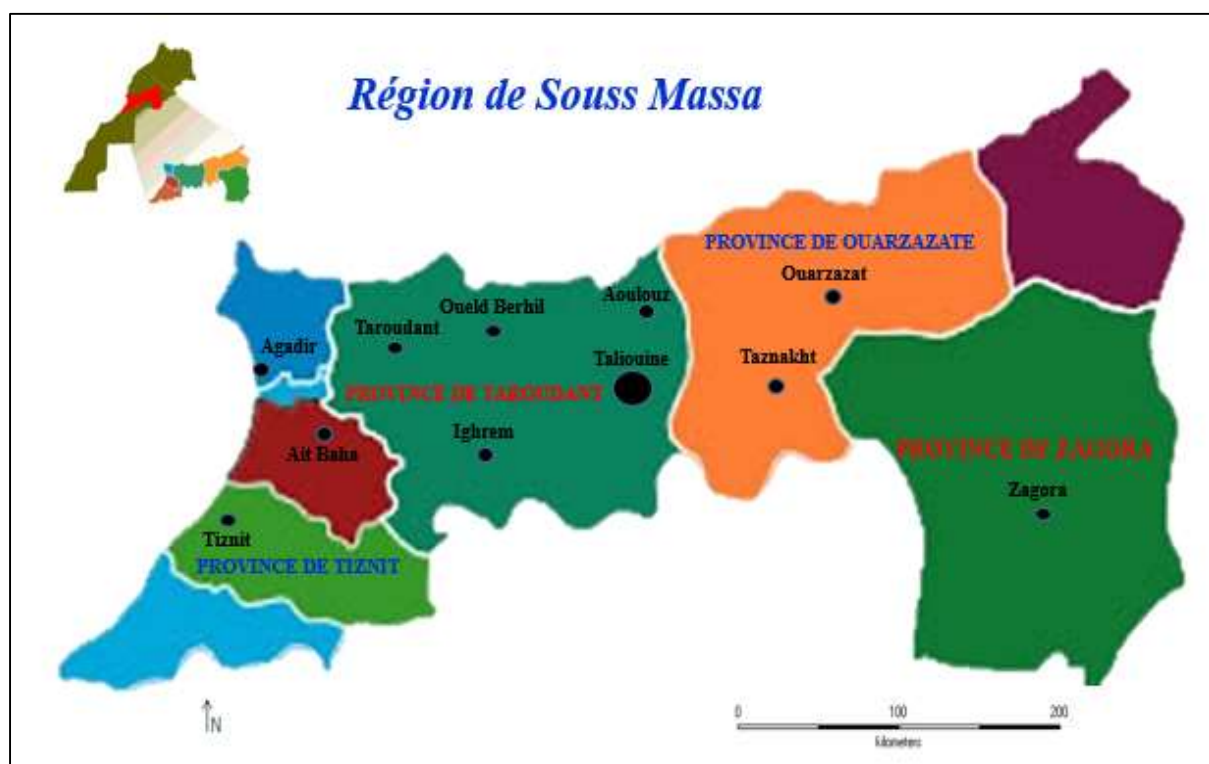


Figure 8 : Carte de localisation de Taliouine

## 2. Analyse physico-chimique du sol

Des analyses granulométriques et physico-chimiques ont été effectuées sur les échantillons de sol de la ferme safranière objet de notre étude. Les analyses ont été effectuées au laboratoire des moyens analytiques (LAMA) de l'institut de recherche pour le développement de Dakar-Sénégal (IRD). Les caractéristiques physiques du sol ont été déterminées selon la méthode de



Gee et Bauder (1986) cité par Ibou et al.(2015) et les cations échangeables selon la méthode de Thomas (1982). Le pourcentage de carbone total et d'azote a été quantifié en utilisant le système de combustion Thermo-Finnigan Flash EA 1112 (Thermo-Finnigan, France). La détermination colorimétrique du phosphore total et disponible a été effectuée selon la méthode de Dabin (1965 cité par Ibou et al. 2015). Les valeurs du pH du sol ont été mesurées dans des suspensions de KCl 2M à un rapport solide-liquide de 1: 2,5.

## **VOLET I: Caractérisation morphologique et moléculaire des communautés fongiques mycorrhiziennes arbusculaires occupant les racines et le sol du safran (*Crocus sativus* L.) selon différentes pratiques de gestion agricole**

### **1. Description des champs étudiés**

La surface de chaque champ étudié était de plus de 15 000 m<sup>2</sup>. Les informations sur les sites de terrain sont résumées dans le tableau 4. Trois paramètres différents ont été étudiés, le type d'engrais, l'âge du champ et la méthode de plantation. L'influence de l'âge a été étudiée en comparant trois champs qui ont été plantés au cours de différentes années: F1 a été planté en 2011, F2 en 2012 et F3 en 2013. La méthode de plantation a été étudiée en comparant deux champs, F3 et FT, plantés respectivement avec une méthode moderne ou avec la méthode traditionnelle. Dans la méthode moderne, les cormes de safran sont plantés dans les billons en rangs espacés de 10 cm et à 5 ou 6 cm de distance entre les cormes sur une profondeur de 10 cm, des sillons de deux rangs parallèles sont pratiqués sur toute la longueur du champ. À l'inverse, la méthode traditionnelle consistait en une culture de masse de cormes de safran dans des bassins sans billons/sillons ou rangées de 8 à 10 cm de profondeur. Le champ est planté dans de petits lits d'environ 2,5 m<sup>2</sup>, puis la surface du sol est lissée à la truelle. L'effet du type de fertilisation sur la mycorrhization du safran était le troisième paramètre évalué. Le champ (F3) a reçu un engrais organique transformé qui a été intégré à l'irrigation au goutte-à-goutte; tandis que d'autres champs (F4) ont été enrichis avec un engrais organique naturel qui a été manipulé manuellement. L'engrais organique transformé utilisé, Nabat Bio, convient à l'agriculture biologique basé sur un extrait de compost avec des acides aminés. Sa composition globale est: 25% de matière organique, macro-éléments (disponible N 3,34%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0,01%, disponible K 0,86%), oligo-éléments, acides humiques, acides fulviques et acides aminés. Le deuxième type d'engrais utilisé est un engrais organique naturel (fumier) constitué d'excréments

d'animaux sans aucun additif (F4). L'irrigation des champs a été réalisée par irrigation au goutte-à-goutte sauf pour les champs cultivés selon les méthodes traditionnelles.

**Tableau 4.** Description des champs étudiés

Plots	Date de plantation	Méthode de plantation	Type de fertilisation
Champ 1 (F1)	2011	Méthode moderne	Engrais organique transformé
Champ 2 (F2)	2012	Méthode moderne	Engrais organique transformé
Champ 3 (F3)	2013	Méthode moderne	Engrais organique transformé
Champ 4 (F4)	2013	Méthode moderne	Engrais organique naturel (Fumier)
Champ T (FT)	2013	Méthode traditionnelle	Engrais organique transformé

## 2. Echantillonnage des sols et des racines du safran

Les racines du safran avec le sol rhizosphérique ont été collectées en avril 2015 de différentes parcelles safranières à partir de la ferme "1.2.3. SAFRAN" Talakhat-Taliouine. Dix cornes avec les racines et le sol de profondeur de 5 à 30 cm ont été prélevés à partir de 5 champs étudiés.

## 3. Extraction des spores

Selon la méthode de Gerdemann and Nicolson (1963), 100g du sol du safran ont été suspendu dans de l'eau du robinet ensuite centrifugés à 2000 tr/mn pendant 5 min. Le surnageant contenant des spores mortes et les débris est éliminé et au culot nous ajoutons une solution de saccharose à 50%. Après une centrifugation de 500 tours /min pendant 10 min, le surnageant est lavé dans un tamis de 2 mm à 50µm d'ouverture de mailles. Les parties retenues par les tamis de 500µm et 50µm sont utilisées pour l'extraction des spores. Les spores sont ensuite récupérées et filtrées à l'aide des filtres Whatman. L'extraction est répétée trois fois pour chaque échantillon avant l'observation à la loupe binoculaire (Abbas et al. 2006). Les spores ont été comptées sous la loupe binoculaire et observées sous un microscope Leica ICC50 HD connecté à un ordinateur avec logiciel d'analyse d'images numériques. Les spores sont regroupées en fonction de leurs caractéristiques morphologiques. La richesse et l'abondance relative de chaque type fongique sont calculées pour 100 g de sol sec.

#### **4. Description morphologique et abondance relative des spores**

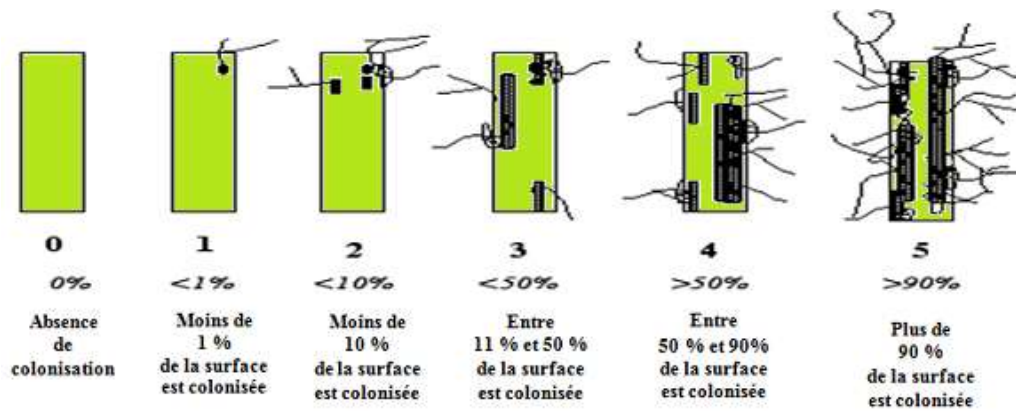
Après l'observation microscopique, les spores de chaque morphotype ont été montées entre lames et lamelles en utilisant le glycérol comme liquide de montage. L'identification des spores est basée sur la taille, la pigmentation, les caractéristiques de la paroi et de l'hyphe d'attachement, a été réalisée à l'aide du site (<http://invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions>) et différentes références (Pérez et al. 2012; Monroy et al. 2013; Pérez and Peroza 2013; Rodríguez-Morelos et al. 2014; Rajeshkumar et al. 2015 ; Błaszowski et al. 2018).

#### **5. Eclaircissement, coloration et l'observation des racines**

Les racines récoltées sont lavées avec de l'eau du robinet pour enlever le sol et les débris. Les racines ont été ensuite éclaircies, selon la méthode modifiée de Phillips and Hayman (1970). Cette méthode consiste d'abord à imbiber les racines dans une solution de KOH à 10% et ensuite à incuber au bain-marie à 90°C pendant 10 min. Les racines sont ensuite rincées proprement à l'eau du robinet. Dans une deuxième étape, les racines sont trempées quelques minutes dans de l'eau oxygénée, avec quelques gouttes d'acide lactique à 5%. Après rinçage à l'eau du robinet, les racines sont ensuite imbibées dans du bleu trypan (0,5%), et incubées dans un bain marie à 90°C pendant une durée de 15 min. Un dernier rinçage est effectué avant le montage des racines au microscope. Les racines ont été coupées en fragments de 1cm, et montées entre lames et lamelles en utilisant le glycérol comme liquide de montage. Pour chaque échantillon, quinze fragments sont analysés au microscope optique. Ainsi, trois lames sont préparées avec cinq différents fragments par lame.

#### **6. Paramètres d'évaluation des mycorhizes**

Le taux de colonisation des racines par les mycorhizes est déterminé selon la méthode de Trouvelot et al. (1986) qui consiste à analyser les racines colorées sous microscope optique en se basant sur une échelle de densité de mycorrhization (Figure 9). L'observation nous permet aussi de déterminer la présence ou l'absence de vésicules au niveau des racinaires du safran étudiés.



**Figure 9:** Echelle de la densité de colonisation du cortex racinaire (Trouvelot et al. 1986)

Afin d'évaluer quantitativement les mycorhizes, on détermine un certain nombre de paramètres (Trouvelot et al. 1986), à savoir :

#### a. Fréquence de mycorhization

Elle permet d'évaluer le pourcentage des racines mycorhizées présentes dans un échantillon selon la formule suivante :  $F\% = [(N-n) / N] \times 100$

(N : nombre de fragments, n : nombre de fragments sans trace de mycorhization)

#### b. Intensité globale de mycorhization

C'est un paramètre qui reflète l'importance de la colonisation des racines ;

$$M(\%) = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / N$$

n : nombre de fragments ayant l'indice 1, 2, 3, 4,5. N : nombre de fragments observés

## 7. Identification moléculaire des champignons mycorhiziens

### 7.1. Extraction de l'ADN à partir des racines et amplification partielle par PCR d'une région d'ADNr de la grande sous-unité (LSU)

L'ADN génomique total des racines de safran de chaque champ (F1, F2, F3, F4 et FT) a été extrait des segments de racines hautement colonisés en utilisant un kit DNeasy® (QIAGEN Inc) (Annexe 3). La qualité et la quantité des ADN extraits ont été vérifiées sur un gel d'agarose à 0,8% et par mesure de la densité optique en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop. Pour la première amplification, nous avons utilisé 50 nM d'ADN avec 500 nM de chacune des amorces LR1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GA-3 ') et FLR2 (5'-GTC GTT TAA AGC CAT TAC GTC-3 ') (Trouvelot et al. 1999) et MyTaq TMHSMix (Bioline, Londres, Royaume-Uni). Le programme de PCR a été effectué comme suit: une dénaturation initiale à 93 °C pendant 5 min suivie de 35 cycles à 93 °C pendant 1 min, 58 °C pendant 1 min et 72 °C pendant 1 min,

suivie d'une extension finale de 10 min à 72 °C. Les produits de PCR ont été dilués 1/100 et utilisés comme matrices pour la seconde réaction PCR avec les amorces FLR3 (5'-TTG AAA GGG AAA CGATTG AAG T-3 ') et FLR4 (5'-TAC GTC AAC ATC CTT AACGAA-3') dans les mêmes conditions de la première réaction PCR (Gollotte et al. 2003). Une migration des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% a été effectuée et le résultat est révélé par visualisation du gel sous une lumière UV après coloration avec du bromure d'éthidium.

## **7.2. Construction d'une banque génomique**

### **7.2.1. Clonage des ARNr amplifiés des CMA**

#### **a. Préparation des cellules compétentes**

Une pré-culture d'*E.coli* DH5 $\alpha$  a été préparée dans un milieu LB liquide, puis incubée à 37°C sous agitation pendant 2h en mesurant la densité optique jusqu'à avoir une DO d'environ 0,2 à 0,3. Après l'incubation, la culture bactérienne a été placée dans la glace pendant 15 min, ensuite centrifugée à 4000 tr/min à 4°C pendant 10min dans un tube de 50ml. Au culot récupéré, 25ml de CaCl<sub>2</sub> (0,1M) froid est ajouté ensuite les microtubes sont agités et maintenus dans la glace pendant 30min. Une centrifugation à 4000tr/min et à 4°C pendant 10 min est réalisé et le surnageant est jeté. Au culot, (6ml de CaCl<sub>2</sub> (0,1M) +glycérol 15%) sont ajoutés, agités au vortex, et la suspension est répartie dans des micro-tubes de 1,5ml et conservée à -80°C.

#### **b. Ligation**

Pour cloner les gènes d'intérêt amplifiés on utilise le plasmide du kit PGEM-T Easy Vector (Promega/Catalys, Wallisellen, Suisse). Le mélange réactionnel de la ligation est optimisé en utilisant 5 $\mu$ l du tampon de ligation, 1 $\mu$ l du plasmide (50ng), 1 $\mu$ l de laT4 ligase (3unités/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l du produit de la PCR et le volume final de 10 $\mu$ l est complété avec de l'eau pure. Le mélange réactionnel est incubé pendant une nuit à 4°C.

#### **c. Transformation**

On ajoute 2 $\mu$ L du plasmide préparé par chaque champ dans des tube contenant 100  $\mu$ l d'une suspension de bactéries compétentes, le tout est gardé dans la glace pendant 20 min, puis incubé dans un bain-marie à 42°C (sans agitation) pendant 90 secondes. Ensuite transférer les tubes rapidement dans la glace pendant 2min, ajouter 950 ml de milieu LB stérile dans chaque tube,

incuber pendant 1h30 min dans l'incubateur à 37°C sous agitation douce (150rpm), puis centrifuger à 12000g pendant 5min. Une partie du surnageant est enlevée pour ne laisser que 200 µl et le culot est resuspendu, puis étalé à raison de 100µL/boîtes de Petri contenant le milieu LB sélectif (Annexe1), incuber à 37°C pendant 24h.

#### **d. Criblage des colonies positives et séquençage**

Après incubation, on sélectionne au hasard les colonies blanches positives dans chaque boîte, puis on crible ces clones par PCR dans un volume de 25µL en utilisant les amorces universelles SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3') et T7 (5'-TAATACGA CTCACTATA-3') suivant le programme PCR: 94°C pendant 30sec, 55°C pour 1 Min 15 sec et 72 ° C pendant 1 min (35 cycles), puis 10 min à 72 ° C. Par la suite 5µl de produit PCR ont été analysés sur un gel d'agarose à 1% dans du tampon TAE et visualisés sous lumière UV après coloration au bromure d'éthidium. Les produits de PCR purifiés ont ensuite été séquencés avec les amorces universelles T7 (ou SP6) à Genoscreen, France.

#### **7.3. Séquençage des ARNr clonés et dépôt des résultats sur NCBI**

Les séquences obtenues ont été corrigées en utilisant le logiciel BioEdit et comparées par le blast (Basic Local Alignment Search Tool) avec celles déposées dans la banque de données NCBI (National Center for Biotechnology Information). Toutes les séquences obtenues dans cette étude ont été soumises à GenBank avec les numéros d'accession.

#### **7.4. Analyse phylogénétique des CMA isolés et identifiés**

Les séquences d'ADNr obtenues des CMA par LSU, ont été comparées avec des séquences de référence de Glomeromycota extraites de GenBank en se basant sur leur citation dans les publications de Krüger et al. (2012) et Błaszowski et al. (2016). Un alignement des séquences a été réalisé avec les séquences de référence en utilisant le programme ClustalW Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant le logiciel MEGA6. L'arbre phylogénétique a été construit avec la méthode Maximum likelihood et le paramètre Kimura à 2 paramètres. L'indice de robustesse de l'arbre a été estimé à l'aide de 1 000 répliqués bootstrap.

### **8. Analyses statistiques des données de diversité et quantitatives des mycorhizes**

Les résultats obtenus (densité de spores, intensité et fréquence de mycorrhization) et l'indice de Shannon-Weaver (H') ont été analysés statistiquement en utilisant l'analyse de variance (ANOVA) par le logiciel XLSTAT et comparées par le test de Fisher (LSD) avec une probabilité de 5% seuil, sans aucun traitement préalable.

## **VOLET II : Les champignons endophytes isolés de *Crocus Sativus* L. (safran) comme source de métabolites secondaires bioactifs**

### **1. Isolement des champignons endophytes**

Les racines du safran récoltées ont été lavées soigneusement à l'eau courante du robinet pour éliminer les débris, ensuite séchées et coupées en segments de 1 cm de longueur. Les surfaces de ces segments de racine ont été stérilisées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 10% pendant 3 min, et finalement rincées à l'eau stérile trois fois. Les segments ont été placés dans des boîtes de Petri contenant du milieu PDA solide (Annexe 1), ensuite incubés à l'obscurité à  $25 \pm 2$  ° C jusqu'à la croissance fongique (Di Pardo et al. 2015).

### **2. Identification moléculaire des champignons endophytes isolés**

Une section d'hyphes fongiques a été retirée de la boîte de Petri et lyophilisée dans un tube à échantillon (2 ml) pendant 48 h. L'échantillon lyophilisé a été pulvérisé dans un MixerMill pendant 10 min, ce qui a permis d'obtenir une poudre des champignons facile pour l'extraction de l'ADN.

L'extraction de l'ADN a été réalisée en utilisant le kit de purification d'ADN génomique Promega™ Wizard™ en suivant le protocole du fabricant (Annexe 3). La PCR a ensuite été réalisée en utilisant le kit Taq™ HSmix bioline et le couple d'amorce ITS1/ITS4 suivant le programme d'amplification: dénaturation initiale 95 °C pendant 15 min, dénaturation 95 °C pendant 1 min, hybridation 56 °C pour 30s, extension 72 °C pendant 1 min (35 cycles) et extension finale 10 min à 72 °C (White et al. 1990). Les produits de PCR purifiés ont ensuite été séquencés avec l'amorce universelle ITS1 chez Genoscreen, France. Les séquences ont été corrigées à l'aide du logiciel BioEdit et comparées par le BLAST avec celles déposées dans la banque de données NCBI.

### **3. Extraction des métabolites secondaires des champignons endophytes**

Les champignons ont été mis en culture sur du PDA solide à 25°C pendant cinq jours, deux ou trois pièces (0,5 x 0,5 cm) de chaque champignon ont été inoculées dans des erlenmeyers de

500 ml contenant 300 ml de PDB (Annexe 3) et répété deux fois. On incube tous les erlenmeyers à 25 °C pendant trois semaines avec une agitation à 150 tours/minute. Après l'incubation le contenu est filtré à travers une gaze stérile pour séparer le mycélium du bouillon de culture (Barik et al. 2010), ensuite centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 min, et le surnageant a été récupéré. L'extraction des métabolites a été faite par deux solvants organiques, l'acétate d'éthyle et le chloroforme, à chaque filtrat on rajoute un volume égal de solvant et on le met sous agitation pendant deux heures, la solution est ensuite mise au repos dans des ampoules à décantation pour séparer les deux phases, et la phase organique a été récupérée pour être concentrée par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (Mohanta et al. 2008). Finalement, le composé résultant a été dissous dans du méthanol.

#### **4. Etude de l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes**

##### **4.1. Préparation des bactéries**

Six bactéries de la collection du laboratoire de microbiologie et biologie moléculaire (LMBM)-Rabat ont été choisies pour le test antibactérien des extraits. Les bactéries ont été mises à croître dans du milieu TY (Annexe 1) pour les cinq souches *Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas putida*, *Pantoea* sp., et *Luteibacter* sp. pendant 20h à 28°C, et la souche *Escherichia coli* dans du milieu LB (Annexe 1) pendant 20h à 37°C. La densité optique de toutes les souches a été ajustée à l'aide du milieu stérile de chaque bactérie pour obtenir une concentration finale équivalente de 10<sup>6</sup> UFC/ml.

##### **4.2. Méthode de diffusion sur disque**

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits obtenus par l'extraction à l'aide de l'acétate d'éthyle et du chloroforme, la méthode de diffusion sur disque a été utilisée (Hazalin et al. 2009). Les boîtes contenant du milieu gélosé approprié ont été inoculées avec 100 µl des suspensions bactériennes. 10 µl de chaque extrait ont été déposés à l'aide d'une micropipette sur les disques stériles (7 mm de diamètre) placés à la surface des géloses préalablement inoculés avec les bactéries, le méthanol a aussi été utilisé en tant que contrôle négatif. Les boîtes ensuite ont été incubées à 37°C pendant 24 heures pour la bactérie *Escherichia coli* et 28°C pour les autres bactéries. Le diamètre des zones claires autour des disques révélant l'activité antimicrobienne des extraits a été mesurée. Les tests ont été effectués en triplicata (Wang et al. 2016).

#### **5. Activité antioxydante des extraits de champignons endophytes**



L'activité antioxydante des extraits a été mesurée par deux techniques, la première méthode  $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle (DPPH) décrite par (Brand-Williams et al. 1995) a été vérifiée selon (Sánchez-Moreno et al. 1998) et la seconde  $\beta$ -carotène-acide linoléique/test de blanchiment de  $\beta$ -carotène (BCBT) décrite par (Dapkevicius et al. 1998).

### 5.1. Méthode $\alpha$ , $\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle (DPPH)

Pour étudier le piégeage des radicaux DPPH par les échantillons, on mélange les extraits acétate d'éthyle ou les extraits chloroforme avec 1,95 ml de DPPH (0,025 g/l de méthanol) et on l'incube à l'obscurité pendant 30 min à 37 °C. L'absorbance a été mesurée à 517 nm. L'inhibition du radical libre du DPPH en pourcentage (I%) a été calculée par l'équation suivante (Bentabet et al. 2014; Wang et al. 2016).

$$I\% = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] / 100$$

$A_{\text{blank}}$  : l'absorbance du témoin (contenant tous les réactifs à l'exception de l'échantillon).

$A_{\text{sample}}$  : l'absorbance de l'échantillon.

L'acide ascorbique (AscA) a été utilisé comme témoin positif et tous les tests ont été effectués en trois exemplaires.

### 5.2. Méthode de l'acide $\beta$ -carotène-acide linoléique(BCBT)

Le mélange d'acide linoléique et de  $\beta$ -carotène (solution mère) a été préparé avec 2 mg de  $\beta$ -carotène dissous dans 1 ml de chloroforme auxquels on rajouté 25  $\mu$ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme a été complètement évaporé, en utilisant un évaporateur sous vide à 40 °C pendant 5 min (Liu et al. 2007b), puis 100 ml d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) à 50 mM ont été ajoutés sous agitation vigoureuse. Un volume de 5 ml de ce mélange réactionnel ont été distribués dans des tubes à essai et 100  $\mu$ l d'extraits ont été ajoutés et mélangés au vortex (Chun et al. 2005). L'absorbance des mélanges a été mesurée à 470 nm immédiatement à T = 0h puis le système d'émulsion a été incubé à 50 °C. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en l'absence d'antioxydant est suivie à 470 nm pendant 1h, 2h, 3h, 24h, et 48h. L'activité antioxydante dans le modèle de blanchiment du  $\beta$ -carotène en pourcentage (A%) a été calculée avec l'équation suivante:

$$A\% = [1 - (A_0 - A_t) / (A'_0 - A'_t)] \times 100$$

$A_0$  et  $A'_0$  sont les absorbances de l'échantillon et du témoin, respectivement, mesurées au temps zéro, et  $A_t$  et  $A'_t$  sont les absorbances de l'échantillon et du témoin, respectivement, mesurées après 3h (Liu et al. 2007b).

## **6. Analyses statistiques des résultats des tests des activités antibactériennes et antioxydantes**

Les différents paramètres estimés ont été analysés statistiquement par ANOVA avec le test de Fisher à l'aide du programme XLSTAT (Version 2014.5.03) et comparés par le test Fisher (LSD) avec un seuil de probabilité de 5%.

### **VOLET III : Identification moléculaire et évaluation des activités biologiques des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) isolées de la rhizosphère du safran (*Crocus sativus* L.).**

#### **1. Echantillonnage du sol rhizosphérique d'une safranière de Taliouine**

L'isolement des bactéries PGPR a été effectué à partir de la rhizosphère de la plante du safran cultivée dans la région de Taliouine. Des échantillons de sol intimement liés aux racines de safran ont été collectés dans une parcelle safranière de ladite région. Les trois échantillons utilisés dans le présent travail ont été codés : BR1, BR2 et BR3.

#### **2. Isolement sélectif des PGPR et codage des isolats**

Les échantillons de sol rhizosphérique du safran ont été dilués à raison de 4g de sol dans 16 ml d'eau physiologique stérile à 9% de NaCl. A partir de cette solution mère, des dilutions successives de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  ont été réalisées dans d'eau physiologique. Trois milieux sélectifs solides, PVK, milieu Modi et milieu YEM-try (annexe 1), ont été ensemencés avec 0,1 ml de chacune des quatre dilutions. Après incubation, des différentes boîtes de Petri à 28°C pendant 24h ou 48h, les colonies isolées obtenues sont repiquées sur de nouvelles boîtes (contenant le même milieu sélectif) par la méthode des stries. L'utilisation de ces trois milieux permet la sélection de bactéries présentant certaines activités biologiques intéressantes. Le milieu PVK est préparé avec une légère modification de celui proposé par Pikovskaya (1948), il permet la sélection des microorganismes dissolvant les phosphates inorganiques insolubles dans l'eau. Le milieu MODI, dépourvu de fer, permet de sélectionner les bactéries productrices de sidérophores, qui sont des molécules à haute affinité pour le fer, alors que le milieu YEM-try, est un milieu YEM additionné de tryptophane (précurseur d'AIA), qui permet de sélectionner les bactéries productrices d'auxine.

Le codage des isolats est basé sur l'échantillon du sol à partir duquel elles ont été isolées, la dilution utilisée et aussi l'activité mise en évidence chez chaque isolat. Ainsi, on a attribué un (P) pour la solubilisation du phosphate, un (S) pour la production de sidérophores et un (A) pour la production de l'auxine (A), suivies du numéro de la colonie (Tableau 5).

**Tableau 5:** Liste des isolats obtenus à partir des 3 échantillons du sol classés selon leurs activités

Solubilisation du phosphate			Production de sidérophores			Production de l'auxine		
S11P1	S12P1	S13P1	S11S1	S12S1	S13S1	S11A1a	S12A1a	S13A1
S11P2	S12P2	S13P2	S11S2	S12S2	S13S2	S11A1b	S12A1b	S13A2
S11P3	S12P3	S13P3	S11S3a	S12S3	S13S3	S11A2a	S12A2	S13A3
S11P4	S12P4	S13P4	S11S3b	S12S4	S13S4	S11A2b	S12A3	S13A4
S11P5	S12P5	S13P5	S11S4	S12S5	S13S5	S11A3	S12A4a	S13A5
S11P6	S12P6	S13P6	S11S5	S12S6	S13S6a	S11A4	S12A4b	S13A6a
S11P7	S12P7	S13P7	S11S6		S13S6b	S11A5	S12A5	S13A6b
S11P8	S12P8	S13P8	S11S7			S11A6	S12A6	S13A7
S11P9	S12P9	S13P9	S11S8			S11A7	S12A7	
S11P10	S12P10	S13P10				S11A8	S12A8	
S11P11						S11A9		
S11P12						S11A10a		
S11P13						S11A10b		
S11P14						S11A11a		
						S11A11b		
<b>TOTAL : 34</b>			<b>TOTAL : 22</b>			<b>TOTAL : 33</b>		
<b>TOTAL : 89</b>								

### 3. Evaluation des activités biologiques des collections bactériennes

#### 3.1. Collection 1 des PGPR productrices d'auxine

Les 33 souches sur milieu YEM-try ont été utilisées pour préparer des pré-cultures bactériennes sur milieu YEM liquide, incubées à 28 °C pendant 24 h. En suivant la méthode de Glickmann and Dessaux (1995), pour chaque isolat, on utilise 50 µl de préculture bactérienne fraîche pour ensemercer 3 tubes contenant du milieu YEM additionné de 0,5mg/ml de tryptophane. Les cultures sont incubées à 28°C pendant 24h. L'absorbance (DO) d'un échantillon de la culture est mesurée à une longueur d'onde de 600 nm. Pour le dosage de l'AIA, le reste de la culture est centrifugé à 9000 tours/min pendant 10 min pour récupérer le surnageant qui est filtré à travers une membrane stérile de nylon de 0,2 µm (millipore). Le dosage est effectué en mélangeant 1ml du surnageant filtré avec 1ml du réactif Salkowsky (Annexe 2). Ce mélange est incubé pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité avant de mesurer la DO à 540 nm. La quantité d'AIA synthétisé par chaque bactérie est déterminée à partir d'une courbe étalon représentant la DO à 540 en fonction de la concentration en AIA. La gamme étalon a été

préparée à partir d'une solution mère d'AIA diluée dans du milieu YEM liquide additionné de tryptophane. Les concentrations d'AIA préparées sont : 0,1-0,2- 0,5- 1- 2- 4- 5- 8- 10- 15- 20- 25- 30- 35- 50- 75 et 100 µg/ml.

### **3.2. Collection 2 des PGPR productrices de sidérophores**

#### **3.2.1. Test qualitatif de la production de sidérophores**

La production de sidérophores est mise évidence selon la méthode de Schwyn et Neilands (1987) dans le milieu Modi. Pour ceci, des pré-cultures des 22 souches à tester sont préparées, dans du milieu YEM liquide. Après 24h d'incubation à une température de 28°C, 50 ml du milieu Modi sont inoculés avec les pré-cultures fraîches, de manière à avoir une DO initiale de 0,1 à 600nm. Ces cultures sont incubées à une température de 28°C sous une agitation de 180 rpm/min. Après 7 jours d'incubation des cultures, on mesure la DO à 600nm et, on centrifuge 10 ml de culture à 10000 rpm pendant 20 min. Les surnageants sont filtrés sur une membrane de nylon de 0,45 µm(Millipore), leur pH sont mesurés puis ramenés à la neutralité. Dans un tube à hémolyse prétraité avec du HCl (pour éliminer les traces de fer), 1 ml de surnageant est additionné avec 1 ml du réactif CAS (Annexe 2) puis incubé pendant quelques minutes à 24h selon l'intensité de la réaction. En effet pendant ce temps, on assiste à un changement de couleur du bleu vers le rouge orangé qui indique la coloration de la réaction positive.

#### **3.2.2. Test semi-quantitatif de la production des sidérophores**

Ce test consiste à classer les souches positives obtenues précédemment en se basant sur le rapport Ar/A, qui est donné par la mesure des DO à 630 nm du témoin et de l'échantillon. Pour cela, les surnageants obtenus sont utilisés dans ce test à raison de 3ml additionné de 3ml du réactif CAS. La valeur de la DO à 630nm constitue le paramètre A, alors que la valeur de Ar est donnée par la DO à 630 nm du mélange constitué de 3ml du milieu Modi (au lieu du surnageant) et 3 ml du réactif de CAS. La lecture de DO des différents échantillons et du témoin est effectuée après incubation pendant 2h à température ambiante. Les résultats sont présentés sous forme du rapport A/Ar (He et al. 2013).

### **3.3. Collection 3 des PGPR solubilisatrices de phosphate inorganique**

#### **3.3.1. Test qualitatif**

Des pré-cultures fraîches sont préparées dans des tubes contenant chacun 5ml de milieu YEM liquide. Après une incubation à 28°C pendant 24h, un volume de 1,5ml de chaque culture est prélevé et centrifugé à 12000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 1,5ml d'eau bidistillée stérile. Ensuite, des boîtes de Petri contenant du milieu PVK sontensemencées avec 10µl de la suspension bactérienne diluée. Trois répétitions sont prévues pour chaque souche. Après 3 jours d'incubation à 28°C, la croissance bactérienne est estimée visuellement selon la présence ou l'absence de colonies entourées d'un halo clair, le diamètre de ce halo indique l'étendue de la solubilisation du phosphate (Xie et al. 2009).

#### **3.3.2. Test quantitatif**

Suivant la méthode vanadate-molybdate, des pré-cultures ont été préparées sur milieu YEM liquide. Après incubation à 28°C pendant 24h sous agitation à 180 rpm/min, des fioles contenant 100 ml de milieu PVK liquide sontensemencées par les précultures de telle manière à avoir une DO initiale standard de l'ordre de 0,05 à 600nm. Les fioles sont ensuite incubées pendant 48h à une température de 28°C sous une agitation à 185 rpm/min. La croissance des souches est évaluée par mesure de l'absorbance à 600nm. Un échantillon de 2ml de culture est prélevé pour le dosage du phosphate libre. A cet effet, l'échantillon est centrifugé et le surnageant stocké à +4°C. Le reste de la culture est utilisé pour mesurer le pH final du milieu. Le dosage du phosphate solubilisé par les bactéries, 1ml de surnageant est additionné à 1ml du réactif de Vanadate-Molybdate (Annexe 2) dans une cuve de spectrophotomètre. Le mélange est laissé à température ambiante pendant 1h avant de mesurer l'absorbance à une à 400 nm. La quantité de phosphate libéré par chaque souche est déduite d'une courbe étalon représentant la DO à 400nm en fonction de la concentration en phosphate. La gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de phosphate sous forme de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , qui est diluée successivement pour avoir des concentrations allant de 0 à 140 ppm (Tandon et al. 1968).

### **3.4. Screening des souches multi-PGP**

Chaque souche isolée sur un milieu sélectif donnée a été cultivée sur les autres milieux afin de déterminer si elle présente les autres activités biologiques bénéfiques. Les protocoles utilisés sont les mêmes que ceux décrits précédemment.

En plus l'ensemble des souches ont été testés pour la fixation biologique de l'azote à l'état libre. Pour ce faire, 1,5ml de chaque préculture a été centrifugé, puis le culot a été récupéré et dilué avec 1ml d'eau distillée stérile. Un volume de 10µl est ensemencé dans des boîtes de Petri contenant le milieu Nitrogen-Free Base NFB<sup>-</sup> (sans azote combiné) et le milieu NFB<sup>+</sup> (avec azote combiné), comme control positif (Annexe 1). L'incubation a été effectuée à 28°C pendant 7 jours (Zhou et al. 2013).

#### **4. Identification moléculaire des isolats PGPR du safran**

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

Les souches de la collection ont été identifiées au niveau moléculaire par l'analyse des séquences de l'ADNr 16S. A cet effet, 3 ml de chaque pré-culture liquide sont prélevés et centrifugés pendant 10 min à 12000 rpm dans des microtubes. Les cellules bactériennes sont ensuite lysées en ajoutant au culot 300µl, de tampon de lyse (Tris-acétate 1M (pH 7,8), Acétate de sodium 3M, EDTA : 0.5 M, SDS 20%, ARNase 1mg/ml) par échantillon. Le mélange est ensuite délicatement suspendu à l'aide d'une micropipette, puis 100µl de NaCl est ajouté et mélangé avant de faire une incubation de 1h à 37°C (des mélanges par vortex sont effectués toutes les 15 min). Un volume égal de phénol/chloroforme est ajouté au mélange, suivi d'une centrifugation à 13000 rpm pendant 15 min pour la séparation des phases aqueuse et organique. La phase aqueuse contient les acides nucléiques, qui sont récupérés dans de nouveaux microtubes en prenant le soin de ne pas toucher l'interphase. Cette étape est répétée et la phase aqueuse est ensuite transférée dans de nouveaux microtubes, tout en notant le volume prélevé. Les acides nucléiques sont finalement récupérés en ajoutant 2 volumes d'éthanol absolu (-20°C) et en incubant une heure à -20°C. Une centrifugation pendant 15 min à 13000 rpm permet de récupérer le culot d'ADN qui est ensuite lavé dans 500 µl d'éthanol à 70% (-20°C) et centrifugé pendant 10 min à 13000 rpm. Le culot d'ADN est ensuite séché puis resuspendu juste après dans 55 µL de Tris EDTA (10<sup>-1</sup> mM).

##### **4.2. Amplification par PCR et séquençage des gènes de l'ADNr 16S**

Le fragment codant pour l'ADNr 16S a été amplifié en utilisant le couple d'amorces universelles

1488 (CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC) /41F (GCTCAGATTGAACGCTGG CG) et le kit MyTaq TM HSMix (Bioline, Londres, Royaume-Uni) ont été utilisées dans un volume final de 25 µl. Le programme suivi pour l'amplification: dénaturation initiale à 95 °C pour 5min

suivie 35 cycles composés: étape de dénaturation à 94°C de 40 secondes; étape d'hybridation à 64°C de 40 secondes; étape d'élongation à 72°C de 1min 30 secondes; étape d'élongation finale à 72°C de 7 min. Pour s'assurer de la réussite de l'amplification et de sa qualité, 5 µl des produits d'amplification sont mélangés à 2 µl de tampon de charge et migrés sur un gel d'agarose à 1% dans du tampon TBE. Les amplifiats ont été conservés à -20°C jusqu'au moment de les envoyer pour le séquençage chez la société Genoscreen (France).

#### **4.3. Dépôt des séquences au niveau de la base de données NCBI**

Les séquences d'ADN ont été analysées et corrigées à l'aide du programme BioEdit, et identifiées par comparaison avec les séquences de la base de données NCBI en utilisant le Blast option (Basic Local Alignment Search Tool). En effet, le BLAST est un algorithme utilisé par une famille de cinq programmes qui permettent l'alignement d'une séquence requête par rapport à une base de données (NCBI). Toutes les séquences ont été déposées dans GenBank sous les numéros d'accès.

#### **4.4. Etude phylogénétique des isolats PGPR sur la base de l'ADNr 16S**

Les séquences du sens 1488 ont été converties en complément inverse (<http://www.bioinformatics.org/sms/revcomp.html>), puis alignées sur les séquences du sens 41F par le logiciel en ligne ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Les identités et les similitudes de séquence ont été déterminées à l'aide du programme BLAST et de la base de données GenBank sur le NCBI. L'arbre phylogénétique a été construit selon le test Maximum Like-Hood avec le modèle Kimura à 2 paramètres en utilisant un programme MEGA5. La méthode du bootstrap a été utilisée comme test de phylogénie. Des séquences de référence ont été ajoutées pour optimiser la comparaison.

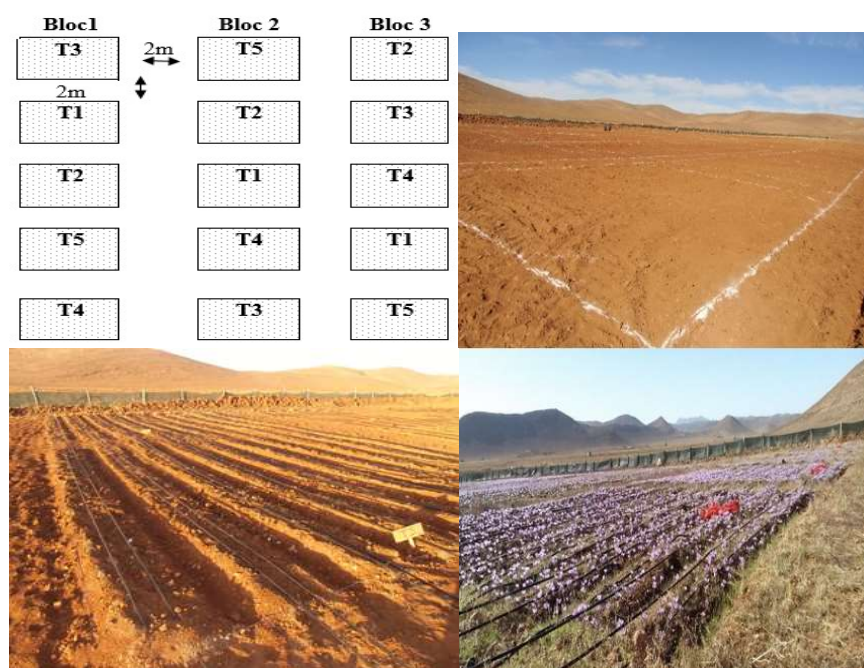
### **5. Analyses statistiques des résultats quantitatifs des PGPR**

Les analyses statistiques ont été réalisées par le programme XLSTAT (version 2014.5.03), avec une ANOVA à un facteur et comparée selon le test Fisher (LSD) avec un seuil de probabilité de 5% pour déterminer les différences entre les moyennes. L'analyse de correspondance (CA) en tant que technique d'analyse de données exploratoire a été effectuée par le logiciel XLSTAT aussi.

## Volet IV. Effet de l'inoculation par des PGPR sur l'amélioration de la croissance, le rendement et la qualité du safran (*Crocus sativus* L.)

### 1. Dispositif expérimental de l'inoculation au champ

Le dispositif utilisé est sous forme de blocs aléatoires complets avec 5 traitements (T1, T2, T3, T4, T5) et 3 répétitions pour chaque traitement donnant un total de 15 parcelles (Figure10) plantées selon la méthode moderne. Une parcelle élémentaire est de 8m x 7,5m soit 60m<sup>2</sup>, comportant 9 billons (50cm de largeur) composés de 4 lignes de 7,5m de longueur. Chaque ligne est plantée avec environ 150 cornes du safran. Chaque parcelle comportait 36 lignes du safran en total 5400 cornes par parcelle de densité de 20 à 30 cornes par mètre carré, avec des espaces entre les cornes pour laisser les cornes en place durant 3 à 4 ans. Les cornes sont plantés entre le sillon et le billon à une profondeur de 10 cm. La distance entre les parcelles est de 2 m, en général la superficie plantée de l'expérimentation est environ 1575 m<sup>2</sup>.



**Figure 10** : Schéma de l'expérimentation en champ à la ferme 1.2.3 SAFRAN, talakht-Taliouine. Expérience en blocs aléatoires complets de 5 traitements ; **T1**: Traitement témoin, **T2**: Traitement inoculé avec la souche S11P1, **T3**: Traitement inoculé avec la souche S12S4, **T4**: Traitement inoculé avec la souche S11A1a et **T5**: Traitement inoculé avec le mélange bactérien (S11P1/S12S4/S11A1a).

### 2. Conception de l'inoculum et inoculation du safran

#### 2.1. Sélection des rhizobactéries



Les bactéries PGPR utilisées ont été isolées à partir de la rhizosphère du safran. Les meilleures souches ont été choisies selon les activités biologiques étudiées (volet III). Trois meilleures souches ont été choisies pour l'inoculation : T2: S11P1, souche solubilisatrice du phosphate naturel ; T3: S12S4, souche productrice de sidérophores chélateur de fer ; T4: S11A1a, souche productrice de l'auxine.

## 2.2. Test d'antagonisme

Etant donné que parmi les inoculums testés nous avons perçu un mélange des trois souches sélectionnées, un test d'antagonisme entre ces souches a été réalisé par la méthode de la double couche d'agar. Cette technique permet de tester la présence de substances inhibitrices ayant un effet antagoniste sur la croissance des autres bactéries. Ce test est très important pour s'assurer de la viabilité des souches susceptibles de constituer un inoculum mixte (Vidaver et al. 1972). La technique consiste à déposer 10µl d'une suspension bactérienne au centre d'une boîte de Petri contenant du milieu YEM. Après incubation à 28°C pendant 48h, cette culture est grattée à l'aide d'un étaloir en verre stérile. Par la suite la boîte est exposée aux vapeurs de chloroforme pure durant 2h pour tuer toutes les cellules bactériennes. Après ce traitement, les boîtes sont gardées ouvertes dans une zone stérile pour une durée d'environ 30 min afin d'éliminer l'excès de vapeurs de chloroforme. Ensuite, le milieu est couvert par une fine couche d'agar molle stérile (0.3%). Après la solidification de cette couche d'agar, la suspension de la 2ème bactérie choisie est pulvérisée au-dessus du milieu. Finalement les boîtes sont incubées à nouveau pour une période de 48h, suivie de l'observation de la croissance de la 2ème bactérie. L'inhibition de la croissance de la deuxième souche, indique la présence d'un effet antagoniste entre les deux souches testées.

## 3. Inoculation des cormes de safran

Les inocula sont obtenus par culture en milieu nutritif complet YEM liquide pendant 24h à 28°C pour toutes les souches. Les concentrations microbiennes fixées pour l'inoculation initiale des cormes de safran et les rappels d'inoculation sont d'environ  $10^8$  UFC/ml.

Lors de l'inoculation initiale en septembre 2013, des cormes d'une forme régulière, de consistance moyenne et en bon état phytosanitaire ont été sélectionnés. Après élimination de la tunique externe qui peut contenir des spores de champignons et aussi pour permettre aux cormes de bien se saturer d'inoculum, les cormes sont imbibés dans l'inoculum pendant 25min selon la méthode de Sharaf-Eldin et al. (2008) légèrement modifiée. Après chaque traitement les

outils utilisés ont été stérilisés avec l'eau de Javel et l'alcool pour éviter toute contamination entre les traitements.

Deux rappels d'inoculation ont été effectués en septembre 2014 et Mars 2015 en arrosant les lignes par les suspensions bactériennes en fonction de chaque traitement.

#### **4. Etude de l'effet de l'inoculation sur le safran**

##### **4.1. Echantillonnage des plantes de safran**

La collecte des données de la production du safran a été faite après 2 ans de plantation. Pendant toute la durée de la saison de floraison du safran des fleurs sont récoltées et pesées chaque jour. La période de cueillette dure 20 à 25 jours par an. Les fleurs sont émondées séparément pour peser la quantité de stigmates frais obtenue pour chaque traitement pendant l'année 2014 et 2015. Pour les autres paramètres, il fallait un arrachement définitif des cornes en choisissant une parcelle élémentaire de 0,5 m x 0,5 m (Quadrat). Les paramètres étudiés : Nombre des feuilles (LN), longueur des feuilles (LL), poids frais des feuilles (LWW), poids secs des feuilles (LDW), le nombre de corne mères (MN), poids frais des corne mères (MWW), poids secs des corne mères (MDW), nombre de cornes-filles (DN), poids frais des cornes-filles (DWW), poids secs des cornes-filles (DDW) et la longueur des racines (RL).

##### **4.2. Détermination de la teneur en chlorophylle**

Les échantillons ont été analysés par spectrophotométrie à deux longueurs d'onde différentes (645 et 663 nm) (Bassa et al. 2012) afin de déterminer la concentration de la chlorophylle a (chl<sub>a</sub>), chlorophylle b (chl<sub>b</sub>) et totale.

##### **4.3. Détermination de la qualité de safran**

Des analyses spectrophotométriques UV-visibles ont été effectuées en utilisant une cellule en quartz (1 cm de longueur de trajet) selon la norme ISO 3632-2010 pour la lecture de l'absorbance à 257, 330 et 440 nm afin de déterminer le taux de picrocrocine (amertume), le taux de safranal (arômes) et le taux de crocine (colorant), respectivement. Le safran étudié est séché par deux techniques, à l'étuve sous une température de 64°C pendant 45 à 55 minutes, et à l'ombre sur un tissu pendant 1 à 2 jours, les filaments du safran restent sous le séchage pour les deux techniques jusqu'à l'obtention d'une humidité relative de 8% à 12%.

#### **5. Analyses statistiques des données**

Les résultats des différents paramètres ont été analysés statistiquement à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) par le logiciel XLSTAT. La comparaison des moyennes examinées par le test de Fisher (LSD) avec un seuil de probabilité de 5% a été effectuée pour estimer les effets de l'inoculation sur la production, la croissance et la qualité du safran. L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée en utilisant le logiciel XLSTAT et l'analyse de corrélation en utilisant le programme EXCEL (2013).

# **CHAPITRE III.**

## **Résultats et discussion**

*Article 1*

**Morphological and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungal communities inhabiting the roots and the soil of saffron (*Crocus sativus* L.) under different agricultural management practices**

**Caractérisation morphologique et moléculaire des communautés fongiques mycorhiziennes arbusculaires occupant les racines et le sol du safran (*Crocus sativus* L.) selon différentes pratiques de gestion agricole**

CHAMKHI<sup>1</sup> Imane, ABBAS<sup>2</sup> Younes, TARMOUN<sup>1</sup> Khadija, AURAG<sup>1\*</sup> Jamal  
and SBABOU<sup>1</sup> Laila

**Journal:** *Archives of Agronomy and Soil Science (GAGS)*

**Article ID:** GAGS 1548012

**Article DOI:** 10.1080/03650340.2018.1548012

**To link to this article:** <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1548012>

## **Introduction – objectif**

Les mycorhizes sont les symbioses mutualistes les plus importantes sur terre. En tant que symbionte obligatoire, les champignons mycorrhiziens arbusculaires (CMA) colonisent les racines de 80 à 90% des espèces végétales. On note environ 250 espèces de CMA décrites (Gadkar et al. 2001). Environ 6000 espèces de Glomeromycotina, Ascomycotina et Basidiomycotina ont été enregistrées comme mycorrhiziennes, et l'avènement des techniques moléculaires augmente ce nombre (Bonfante and Anca 2009). Les types les plus répandus sont les mycorhizes arbusculaires (MA) qui se développent entre les racines de la plupart des plantes terrestres et les espèces fongiques des Zygomycètes (Strack et al. 2003).

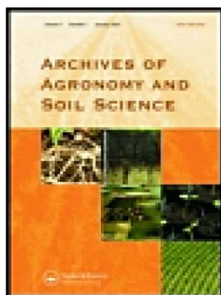
Les mycorhizes se retrouvent dans de nombreux environnements et leur succès écologique reflète un degré élevé de diversité au niveau des capacités génétiques et physiologiques des endophytes fongiques. Dans la mycorrhizosphère autour des racines colonisées par les mycorhizes, la plupart des racettes actives sont étendues au sol environnant pour l'absorption des nutriments. Étant donné que les champignons mycorrhiziens stimulés par certains exsudats racinaires peuvent modifier la morphologie des racines et les fonctions métaboliques, le volume du mycorrhizosphère est plus grand que le sol de la rhizosphère et les exsudats racinaires dans la mycorrhizosphère sont quantitativement et qualitativement différents de ceux de la rhizosphère (Solaiman and Anawar 2015). Ceci influence positivement les communautés végétales et microbiennes et aussi les processus écosystémiques. Cela comprend la mobilisation de N et P à partir de polymères organiques, la libération de nutriments à partir de particules minérales ou de surfaces rocheuses par intempéries, la médiation des réponses des plantes aux facteurs de stress tels que la sécheresse, l'acidification des sols, les métaux toxiques et les agents pathogènes des plantes, ainsi qu'une gamme d'interactions possibles avec des groupes d'autres microorganismes du sol (Finlay 2008). L'exploitation de ces symbioses dans des milieux naturels et agronomiques présente une grande valeur économique et environnementale.

A notre connaissance les études sur la diversité CMA du safran sont très peu nombreuses. Dans la revue publiée par Lone et al. (2016b), il est signalé que l'une des premières études sur l'association champignons MA-safran concerne la variation saisonnière de la densité des spores dans la rhizosphère du safran en Iran (Kianmehr 1981). D'autres études récentes ont rapporté l'effet bénéfique des applications d'inocula mycorrhiziens sur le rendement du safran (Mohebi-Anabat et al. 2015; Lone et al. 2016a). Vu l'importance de ses propriétés, cette épice la plus chère au monde nécessite l'utilisation de pratiques d'agriculture biologique et durable qui peuvent être mises en œuvre en utilisant des stratégies impliquant l'utilisation de services

écosystémiques fondamentaux tels que la fertilisation avec des microorganismes bénéfiques (Sbrana et al. 2014), comme les PGPR et les CMA. Aussi pour un niveau de qualité élevé du safran, les producteurs doivent adopter des techniques de gestion d'agriculture biologique (pas d'application de pesticides ou de fertilisation chimique) (Gresta et al. 2008).

Les communautés et les taxons des CMA sont fortement affectés par les propriétés du sol tel que le pH, la fertilité et la texture, le phosphore disponible du sol, le site géographique, en particulier l'altitude (Jansa et al. 2014) et quelques pratiques agricoles et de gestion. Dans la présente étude, nous présentons pour la première fois des résultats sur la caractérisation moléculaire et la diversité des CMA colonisant les racines de *C. sativus* L. Ces résultats contribuent à une meilleure compréhension des populations de CMA associées au safran et de leur évolution en relation avec les différentes pratiques agricoles.

Dans ce cadre général, nous avons caractérisé les spores mycorhiziennes présentes dans le sol rhizosphérique du safran et les communautés de CMA qui lui sont associées dans trois conditions de culture du safran: le type du fertilisant, la date et la méthode de plantation. Ensuite, nous avons identifié par des méthodes moléculaires les symbiotes fongiques colonisant les racines du safran dans les cinq champs étudiés situés à Taliouine.



## Archives of Agronomy and Soil Science



ISSN: 0365-0340 (Print) 1476-3567 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/gags20>

# Morphological and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungal communities inhabiting the roots and the soil of saffron (*Crocus sativus* L.) under different agricultural management practices

Imane Chamkhi, Younes Abbas, Khadija Tarmoun, Jamal Aurag & Laila Sbabou

To cite this article: Imane Chamkhi, Younes Abbas, Khadija Tarmoun, Jamal Aurag & Laila Sbabou (2018): Morphological and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungal communities inhabiting the roots and the soil of saffron (*Crocus sativus* L.) under different agricultural management practices, Archives of Agronomy and Soil Science, DOI: [10.1080/03650340.2018.1548012](https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1548012)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1548012>



Accepted author version posted online: 19 Nov 2018.  
Published online: 29 Nov 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 10



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gags20>





## Morphological and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungal communities inhabiting the roots and the soil of saffron (*Crocus sativus* L.) under different agricultural management practices

Imane Chamkhi<sup>a</sup>, Younes Abbas<sup>b</sup>, Khadija Tarmoun<sup>a</sup>, Jamal Aurag<sup>a</sup> and Laila Sbabou<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Microbiology and Molecular Biology Team, Center of Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University of Rabat, Rabat, Morocco; <sup>b</sup>Polydisciplinary Faculty, Sultan Moulay Sliman University, Beni Mellal, Morocco

### ABSTRACT

*Crocus sativus* L. cultivation is expanding to areas with low soil fertility, where mycorrhizal fungi are supposed to be essential for plants growth and ecosystems functioning. Agricultural practices applied under these conditions should lead to good saffron productivity and quality. Our objective was to study the density and diversity of mycorrhizal fungi populations associated with saffron grown in Taliouine (Morocco) under different agricultural management practices (fertilization type, age and plantation method). Morpho-anatomical studies identified rhizospheric mycorrhizal spores and assessed root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Molecular identification of AMF was realized by sequencing the Large Subunit (LSU) rDNA gene region. Among the eleven species of AMF spores identified, *Funneliformis* and *Rhizoglyphus* species were the most abundant (> 35%). Modern saffron plantation showed higher roots colonization rates (mycorrhization intensity (100%) and frequency (51.6%)), while in traditional plantations lower mycorrhization frequency values were found (17.4%). LSU sequencing identified five AMF genera and three unknown genomic groups, whereas Shannon diversity index indicated that AMF community composition changed significantly according to plantation age and fertilization type. Our results contribute to a better knowledge of saffron AMF communities and open new perspectives for a rational utilization of the agricultural practices for organic saffron production.

### ARTICLE HISTORY



Received 5 August 2017  
Accepted 11 November 2018

### KEYWORDS

Arbuscular mycorrhizal fungi; *Crocus sativus* L.; roots colonization; morpho-anatomical diversity; molecular identification

## Introduction

*Crocus sativus* L. (saffron) or 'Red gold' is the rarest and one of the most expensive spices in the world. This perennial herb is a member of the *Iridaceae* family. Saffron is used in traditional medicine for various purposes such as antitumor activity (Escribano et al. 1996), anti-inflammatory, anti-nociceptive (Hosseinzadeh and Younesi 2002), antioxidant and antimicrobial (Sengul et al. 2009). It has also aphrodisiac, antispasmodic, antiseptic and anti-fungal activities and is also used for stomach ailments treatment, reducing stomach ache and relieving tension (Bhargava 2011). Saffron is produced in many countries such as Azerbaijan, China, France, Greece, Egypt, India, Iran, Israel, Italy, Mexico, Morocco, Spain and Turkey (Pitsikas 2016). It can

**CONTACT** Jamal Aurag  auragjamal@yahoo.fr  Microbiology and Molecular Biology Team, Center of Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University of Rabat, BP 1014, Rabat 10000, Morocco

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

be cultivated under very different environmental conditions, but the best climatic conditions for high yields are rainfall autumn, warm summers and mild winters. It grows on a wide range of soils with pH ranging from neutral to slightly alkaline (Gresta et al. 2008). In Morocco, cultivation of saffron begins in early June and continues to mid-September. Two cultivation methods can be used: the traditional one or mass method and modern one or row cultivation (Moghadam et al. 2013). All farmers/producers of saffron are supposed to use the organic manure because it represents the best fertilization support for this plant, especially under non-irrigated conditions, where it supplies nutrients, but above all, improves soil moisture and structure (Gresta et al. 2008). On the other hand, organic agriculture management techniques (no pesticide application or chemical fertilization) are necessary for the production of saffron of very high level of quality. In this way, saffron is considered as an alternative plant for low-input agriculture, able to offer good production in sustainable agro-ecosystems (Gresta et al. 2008). Organic agriculture, and sustainable agriculture practices in general, can be implemented by using beneficial microorganisms (Sbrana et al. 2014), mainly plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Beneficial rhizobacteria, which enhance plant growth by a wide variety of mechanisms such as nutrients solubilization and availability, phytohormone production and bioprotection, represent nowadays a new dimension for agro-ecosystems and environmental sustainability (Bhattacharyya and Jha 2011). On the other side, arbuscular mycorrhizal fungi are endo-mycorrhizae that belong to the fungal subphylum of *Glomeromycotina* (Spatafora et al. 2016; Tedersoo et al. 2018). AMF can enhance plants growth by different beneficial pathways, such as extensive absorption of water by external hyphae, stomatal regulation through hormonal signals, improving phosphate nutrition and a greater osmotic adjustment in plants under water stress condition (Wu and Xia 2006). AMF positive effects include also the reduction of population levels of pathogenic microorganisms in the soil, the formation of water-stable soil aggregates and the production of a very stable hydrophobic glycoprotein (glomalin). This molecule is deposited on the outer hyphal walls of the extraradical mycelium and on adjacent soil particles and acts as a long-term soil binding agent. As obligate symbiont, AMF lives in the roots of 80–90% of the plant species (Gadkar et al. 2001) and about 250 species of AMF have been described. The AMF communities and AMF taxa are strongly affected by soil properties such as pH, soil fertility and texture, available soil phosphorus and geographical site, especially the altitude (Jansa et al. 2014). According to the literature published until now and to our knowledge, there are only a few studies about the diversity of AMF associated with saffron. The review published by Lone et al. (2016) reported that one of the first studies on saffron-AM fungi association concerned the seasonal variation of spores density in the rhizosphere of saffron in Iran (Kianmehr 1981). Some other recent studies reported the beneficial effect of mycorrhizal inocula applications on saffron yield (Mohebi-Anabat et al. 2015; Lone et al. 2016).

In the present study, we report for the first time results on the molecular characterization and diversity of AMF colonizing the roots of *C. sativus* L. Our finding will contribute to a better understanding of the AMF populations associated with saffron and their evolution in relation with different agricultural management practices. For this purpose, we have first characterized the mycorrhizal spores present in rhizospheric soil and the AMF communities associated with the roots of saffron cultivated under three different farming management practices: age of the plantation, plantation method, and type of fertilization. Finally, we have identified by molecular methods the fungal symbionts colonizing saffron roots in the five fields studied located in Taliouine (Morocco).

## Material and methods

### Study site

Five field sites of saffron were examined within this study; they are all located in the same area in the 1.2.3 SAFRAN farm where climate and soil conditions were approximately the same in all fields. The farm is located in Taliouine-Talakhat, an area situated in the South of Taroudant



province; Souss-Massa region in Morocco (N30°28'12.997"/W7°46'22.479"). The climate of this area is known as a local steppe climate (Aziz and Sadok 2015). In Taliouine, the average annual temperature is 17.4°C. August is the hottest month of the year with an average temperature of 26.4°C, while January is the coldest month, with an average temperature of 8.7°C. Rainfall is low, averaging about 317 mm annually (source: CLIMATE-DATA.ORG, <http://fr.climatedata.org/location/37264/>). The soil properties at this site are presented in Table 1. The soil is a sandy clay loam according to the USDA texture classification and a Luvisol according to the WRB soil classification. It is an alkaline soil, low in nitrogen (0.04%) and total carbon (0.89%). It is characterized by an elevated C/N ratio (22), a weak content in mineralizable organic matter and a very low level of available phosphorus (18 mg kg<sup>-1</sup>). Soil analysis was conducted by «Laboratoire des Moyens Analytiques de l'Institut de Recherche pour le Développement» (LAMA, IRD, Dakar, Senegal).

The surface of each field studied was more than 15,000 m<sup>2</sup>. The field sites information are summarized in Table 2, representing three different agricultural land use systems that differ in management intensity: the type of fertilizer, the age of the field and the plantation method. The influence of the age was studied by sampling in three fields that were planted in different years: F1 was planted in 2011, F2 in 2012 and F3 in 2013. The plantation method was studied by comparing two fields, F3 and FT, which were planted respectively with a modern method or with the traditional one. In the modern method, saffron corms are planted in the strips in rows 10 cm apart and at 5–6 cm distance between corms in a depth of 10 cm, furrows of two parallel rows are made along the length of the field. At the opposite, the traditional method consisted in a mass cultivation of saffron corms in basins without furrows or rows at 8–10 cm depth. The field is planked and laid into small beds of about 2.5 m<sup>2</sup> and then the soil surface is recovered and smoothed by trowel. The effect of the fertilization type on saffron mycorrhization was the third agronomic parameter assessed. The field (F3) received a processed organic fertilizer that was integrated with the drip irrigation; while the other field (F4) was enriched with a natural organic fertilizer that was handled manually. The processed organic fertilizer used, Nabat Bio, is suitable for organic farming and is based on a compost extract with amino acids. Its global composition is: 25% of organic matter, macro-elements (available N 3.34%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0.01%, available K 0.86%), oligo-elements, humic, fulvic and amino acids. The second type of fertilizer used is a natural organic fertilizer (manure) that consisted in feces of animals without any additives (F4). The irrigation of the fields was carried out with drip irrigation except for fields that were cultivated according to traditional methods.

**Table 1.** Physico-chemical characteristics of saffron soil.

Granulometry (%)		Chemical properties	
Clays	21.80	Total nitrogen %	0.04
Fine silt	11.90	Total carbon %	0.89
Coarse silt	11.20	C/N	22
Fine sands	43.20	Available P (mg kg <sup>-1</sup> )	18
Coarse-grained	11.40	pH H <sub>2</sub> O	8.3
		pH KCl	7.6

**Table 2.** Field information.

Plots	Planting date	Plantation method	Fertilization type
Field 1 (F1)	2011	Modern method	Processed organic fertilizer
Field 2 (F2)	2012	Modern method	Processed organic fertilizer
Field 3 (F3)	2013	Modern method	Processed organic fertilizer
Field 4 (F4)	2013	Modern method	Natural organic fertilizer (Manure)
Field T (FT)	2013	Traditional method	Processed organic fertilizer

### **Roots and soil sampling**

Roots of saffron and their rhizospheric soil were collected in April 2015. Three replicate samples per field site were separately collected. For each replicate in each field site, ten saffron corms with their roots and rhizospheric soil were taken up to a depth of 10 cm at 30 cm. In total 150 corms with their roots and rhizospheric soils were sampled from the 5 fields. Part of the samples (roots and soil) was kept at 4°C until performing the microscopic analysis while part of the roots was put at –80°C until the molecular analysis.

### **AM fungal spore extraction from saffron soil**

To assess the AMF spore communities and their composition, we extracted the spores from 3 soil samples of each field and determined the density of each identified species. Spores were extracted from 100 g of air-dried substrate of each sample using a wet sieving, then centrifuged in a water sucrose solution 50% (50% w/v) (Abbas et al. 2006) at  $53 \times g$  for 10 min following the methodology of Gerdemann and Nicolson (1963).

### **Enumeration and morpho-anatomical identification of AMF**

The spores were counted under the binocular microscope and observed under a Leica ICC50 HD microscope connected to a computer with digital image analysis software. They were grouped according to their morphological characteristics. The richness and relative abundance of each fungal type were calculated per 100 g of dry soil.

The spores were grouped into species basing on their shape, color, size, hyphal attachment mode/ specific attributes, surface conditions and spore contents. The relative abundance of each species and AMF spore density (total number of spores in 100 g of dry soil) were assessed. For taxonomic identification, AMF spores were mounted on glass slides in glycerol. The classification was carried out according to the original description of the International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Mycorrhizal Fungi (INVAM) (<http://invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions>) and also based on several references (Pérez et al. 2012; Monroy et al. 2013; Pérez and Peroza 2013; Rodríguez-Morelos et al. 2014; Rajeshkumar et al. 2015; Błaszowski et al. 2018).

### **Assessment of roots colonization by AM fungi**

For assessment of AMF colonization, the root systems of all samples collected from the five fields were washed and cleared in 10% KOH for 10 min at 90°C (contact time was adapted to take into account the fineness and fragility of saffron roots). Then they were cooled to room temperature and incubated for few minutes in oxygenated water (30%) with few drops of 5% lactic acid and then stained with Trypan blue in 0.05% lactoglycerol. The roots were cut into pieces of 1 cm and placed on microscopic slides for analysis of fungal features (Phillips and Hayman 1970). The frequency and intensity of mycorrhization were assessed following the method of Trouvelot et al. (1986).

### **Molecular identification of AMF colonizing saffron roots**

#### **DNA extraction from roots and PCR amplification of a partial large subunit (LSU) rDNA region**

The total genomic DNA of 200 mg of saffron roots sampled in each field was extracted from segments of roots highly colonized by using a DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN Inc). The quality and quantity of DNA in the samples were checked on a 0.8% agarose gel and using Nanodrop spectrophotometer. Five separate PCR reactions were performed. The first PCR amplification of a partial LSU rDNA region, 50 nM DNA was used with 500 nM of each of the primers LR1 (5'-GCA



TAT CAA TAA GCG GAG GA-3') and FLR2 (5'-GTC GTT TAA AGC CAT TAC GTC-3') (Trouvelot et al. 1999) and MyTaq<sup>TM</sup>HSMix (Bioline, London, UK). The PCR program was carried as follows: an initial denaturation at 93°C for 5 min followed by 35 cycles at 93°C for 1 min, 58°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by final extension 10 min at 72°C. PCR products were diluted 1/100 and used as templates for the second PCR with the primers FLR3 (5'-TTG AAA GGG AAA CGATTG AAG T-3') and FLR4 (5'-TAC GTC AAC ATC CTT AACGAA-3') under the same PCR conditions (Gollotte et al. 2003). PCR products were run on a 2% agarose gel and visualized under UV light after staining with Ethidium Bromide.

#### **Construction of LSU rDNA libraries and sequencing**

The PCR products generated with FLR3 and FLR4 primers and roots DNA extracts of *C. sativus* L. collected from the 5 fields of saffron were cloned into pGEM-T Easy Vector (Promega/Catalys, Wallisellen, Switzerland) following the manufacturer's instructions and transformed into *Escherichia coli* DH5α cells. The positive transformants were selected randomly and screened by PCR using the universal primers SP6 (5'-TATTTAGGTGACTATAG-3') and T7 (5'-TAATACGACTCACTATA-3') following the PCR program: 94°C for 30 sec, 55°C for 1 min 15 sec and 72°C for 1 min (35 cycles), followed by 10 min at 72°C. Five µl of PCR products were run on a 1% agarose gel and visualized under UV light after staining with Ethidium Bromide. Purified PCR products were then sequenced using either the T7 or SP6 primers (Genoscreen, Lille, France). The DNA sequences obtained were corrected using BioEdit software and identified from GenBank using BLAST. All sequences were deposited in GenBank (accession numbers: KX791279-KX791354).

#### **Phylogenetic trees construction**

For the phylogenetic assignment of AMF LSU rDNA sequences obtained, reference sequences of Glomeromycota were taken from GenBank basing on their citation in the publications of Krüger et al. (2012) and Błaszowski et al. (2016). DNA sequences alignment was performed using ClustalW program Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). The phylogenetic tree was constructed with the Maximum likelihood method and Kimura 2-parameter. Nodal robustness of the tree was assessed using 1000 bootstrap replicates. Phylogenetic analyses were performed using MEGA6 software.

#### **Statistical analysis**

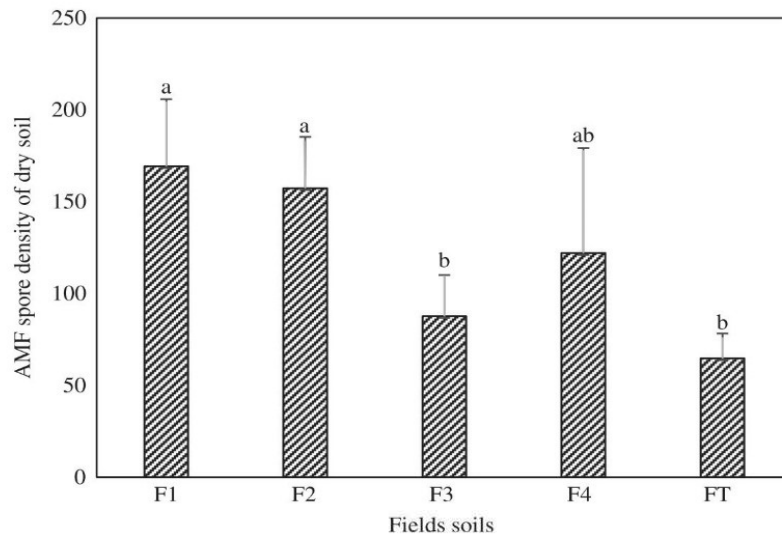
The data obtained for spore density, intensity, frequency of mycorrhization and Shannon-Weaver index ( $H'$ ) were analyzed statistically using analysis of variance (ANOVA) by the XLSTAT software and compared by the test of Fisher's (LSD) with a 5% probability threshold, without any prior processing.

### **Results**

#### **Density and morpho-anatomical analysis of AMF spores communities**

The AMF spore density varied between the five fields of saffron (Figure 1) in the following decreasing order  $F1 > F2 > F4 > F3 > FT$ . As a result, the AMF spore density was affected significantly by the planting date, it was higher in the F1 soil (169.33) which contained the oldest saffron plantation compared with F3 (87.66) the most recent. But we did not found any significant effect of plantation or fertilization methods on the AMF spore density (Figure 1).

The morpho-anatomical characterization of the spores allowed the identification of a total of 11 AMF species in the saffron soils of Taliouine, corresponding to *Glomus tenebrosum*, *Glomus reticulatum*, *Septoglomus deserticola*, *Sclerocystis taiwanensis*, *Rhizoglomus aggregatum*, *Rhizoglomus intraradices*, *Funneliformis mosseae*, *Funneliformis coronatus*, *Enterophospora infrequens*, *Acaulospora* sp. and



**Figure 1.** AMF spore density/100 g of rhizospheric soil in five different saffron fields. Different letter on each bar indicates significantly different mean at  $p < 0.05$  according the Fisher's test (LSD).

**Table 3.** Diversity and abundance of AM fungal spores in soil of *Crocus sativus* L.

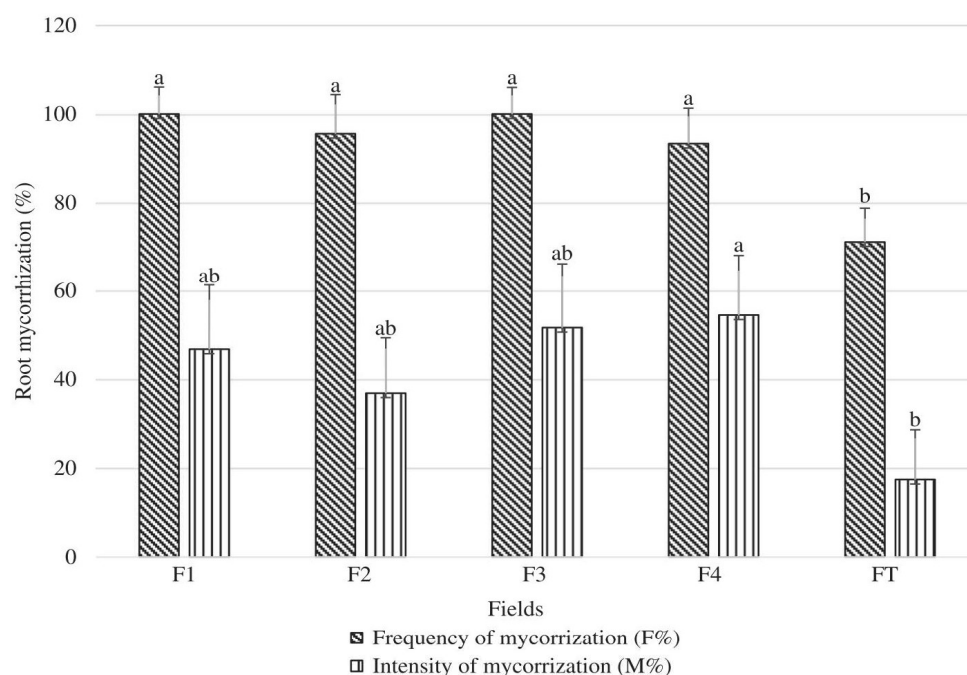
Plots	Genera/Species	Relative abundance (%)
F1	<i>Glomus reticulatum</i>	30.26
	<i>Funneliformis mosseae</i>	41.32
	<i>Rhizoglyphus aggregatum</i>	16.91
	<i>Enterophospora infrequens</i>	8.05
	<i>Funneliformis coronatus</i>	1.46
	<i>Glomus tenebrosum</i>	2
F2	<i>Rhizoglyphus intraradices</i>	38.70
	<i>Rhizoglyphus aggregatum</i>	12.90
	<i>Glomus tenebrosum</i>	27.42
	<i>Acaulospora</i> sp.	14.53
	<i>Funneliformis coronatus</i>	6.45
F3	<i>Funneliformis mosseae</i>	43.03
	<i>Rhizoglyphus intraradices</i>	37.97
	<i>Glomus tenebrosum</i>	17.74
	<i>Sclerocystis taiwanensis</i>	1.26
F4	<i>Funneliformis mosseae</i>	34.37
	<i>Septoglyphus deserticola</i>	21.87
	<i>Rhizoglyphus intraradices</i>	43.76
FT	<i>Rhizoglyphus intraradices</i>	62.14
	<i>Funneliformis</i> sp	37.86

*Funneliformis* sp. It's interesting to note that *Glomus*, *Funneliformis*, and *Rhizoglyphus* are the most wide-spread and diversified genera in the 5 fields analyzed. Compared to F4 and FT, the fields F1, F2 and F3 showed more AMF spores abundance and also a diversified spore communities belonging to the *Glomeraceae* family (Table 3).

### Intensity and frequency of saffron mycorrhization

The microscopic observation of saffron root samples showed the presence of extensive hyphal, vesicular and arbuscular stages of AM fungal colonization and the presence of spores within the roots. Statistical analysis of the frequency and the intensity of mycorrhization showed that there is no significant effect of the date of plantation or of the fertilization type on roots mycorrhizal





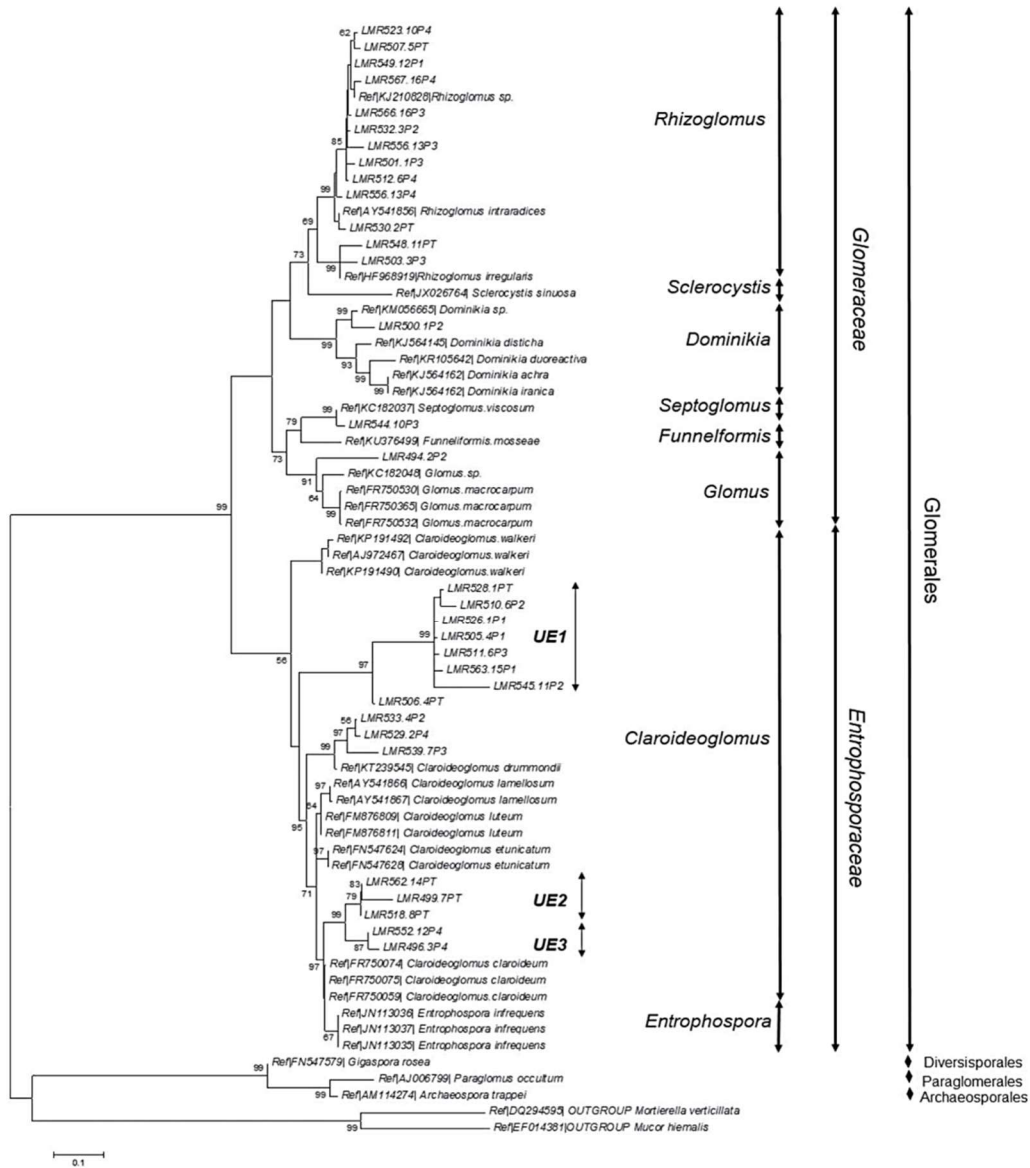
**Figure 2.** Mycorrhization frequency and intensity of *Crocus sativus* L. roots. Bars with different letters for the same parameter F% or M% indicate that values are significantly different according to the Fisher's test (LSD).

colonization, which is contrasting with the plantation methods. We noticed that the roots isolated from the F3 field (modern plantation method) showed higher values for both mycorrhization intensity (100%) and frequency (51.6%) compared to the FT field roots (traditional plantation method), that presented lower values especially for mycorrhization frequency (17.4%) (Figure 2).

### Community composition of AMF colonizing saffron roots

From a total of 75 LSU rDNA sequences obtained from saffron roots, 45 sequences were identified as arbuscular mycorrhizal fungi according to the most recent related publications (Błaszowski et al. 2016, 2018; Pereira et al. 2016). These sequences are represented by 33 sequences in the phylogenetic tree that was built based on the alignment of partial LSU fragments (600 nucleotides). Phylogenetic analyses revealed that the saffron AMF sequences are distributed in different clades of the phylogenetic tree (Figure 3). They belong to 5 known genera: *Rhizoglomus*, *Septoglomus*, *Glomus*, *Claroideoglomus* and *Dominikia*, which is a new genus recently identified (Błaszowski et al. 2015a, 2016). These genera belong to 2 families in the order of Glomerales: *Glomeraceae* (*Rhizoglomus*, *Glomus*, *Dominikia* and *Septoglomus*) and *Entrophosporaceae* (Oehl et al. 2011) also named *Claroideoglomeraceae* (Schüßler and Walker 2010; Redecker et al. 2013) that is containing the genus *Claroideoglomus*. Three uncultured *Entrophosporaceae* (UE1, UE2 and UE3) are clearly individualized in the phylogenetic tree. They are not close to the known *Claroideoglomus* species reported recently by Błaszowski et al. (2015b) and therefore may belong to new genera or species of the *Entrophosporaceae* family.

Following the alignment and the phylogenetic analysis, we determined the distribution of the genera in the roots of saffron for each field (Figure 4). The Glomerales order dominated the AMF associated with saffron roots, with two families represented (*Glomeraceae* and *Entrophosporaceae*). At the family level, the *Entrophosporaceae* were more abundant in saffron roots sampled in F1 and F2 with the uncultured *Entrophosporaceae* UE1 as a dominant genomic sequence in both fields. At the opposite roots obtained from F3 and F4 contained mostly members of the *Glomeraceae* family



**Figure 3.** Phylogenetic tree of Arbuscular Mycorrhizal Fungal sequences obtained from *Crocus sativus* L. roots. The phylogenetic tree was constructed using the Maximum likelihood method and Kimura 2-parameter method. Levels of bootstrap value are indicated >50%. The reference sequences are based on LSU (28S) sequences of the *Glomeromycota* phylum from Krüger et al. (2012). UE1: uncultured *Entrophosporaceae* 1, UE2: uncultured *Entrophosporaceae* 2 and UE3: uncultured *Entrophosporaceae* 3.

and in particular the genus *Rhizoglossum*. Saffron roots sampled in FT field contained equal proportions of both AMF families and the dominating genomic sequences belonged to the uncultured *Entrophosporaceae* UE3 and *Rhizoglossum irregulare*.

Shannon diversity index calculation showed that the AMF community composition significantly changed with the age of plantation, as a result we noticed that AMF community in field F3, the most recent field, was more diversified (1.49) compared with F1 field, the oldest one (0.9). On the other hand, the AMF community composition of F3 field (amended with processed organic fertilizer) was significantly different and diversified compared with the F4 field that was fertilized with an organic fertilizer (1.21) (Figure 5).



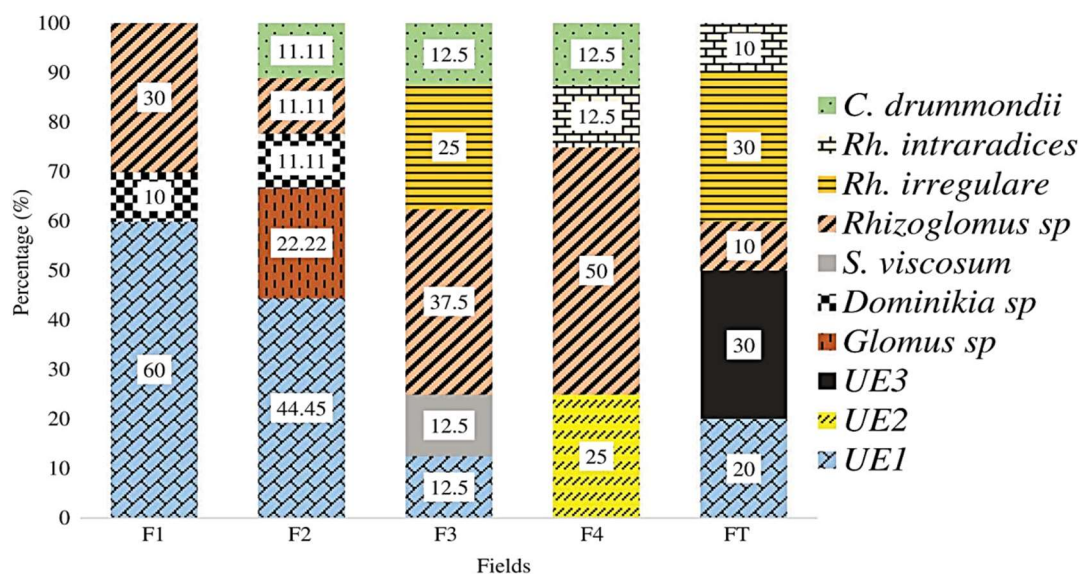


Figure 4. Composition of the *Glomeromycota* community colonizing saffron roots in each plot (percentage) as determined by LSU rDNA sequencing. UE1: Uncultured *Entrophosporaceae* 1; UE2: Uncultured *Entrophosporaceae* 2; UE3: Uncultured *Entrophosporaceae* 3; *C. drummondii*: *Claroideoglomus drummondii*; *Rh. intraradices*: *Rhizoglomus intraradices*; *Rh. irregulare*: *Rhizoglomus irregulare* and *S. viscosum*: *Septoglomus viscosum*.

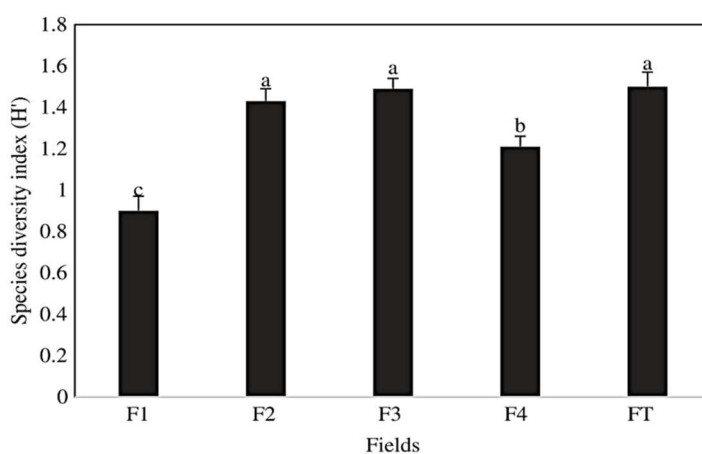


Figure 5. Shannon's diversity index of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing root saffron. Bars with the same letter are not significantly different according to the Fishers test ( $p < 0.05$ ).

## Discussion

### AMF spore diversity, abundance and density in fields under different agronomic practices

The field prospection of cultivated saffron in Taliouine showed that AMF successfully develops symbiotic mycorrhizal associations under the conditions prevailing in the area. By examining the spores collected from the soil of *C. sativus*, we identified five genera belonging to the *Glomeraceae* family: *Glomus*, *Rhizoglomus*, *Funneliformis*, *Septoglomus*, and *Sclerocystis*. Spores of *Enterophospora* (*Enterophosporaceae*) and *Acaulospora* (*Acaulosporaceae*) genera were also found.

Furthermore, *Glomeraceae* family was found to be dominant according to the number of species encountered in *C. sativus* soil. In a similar study, Mohebi-Anabat et al. (2015) isolated only three major types of AMF spores from a saffron soil in the North eastern part of Iran, but they belonged to a single genus, *Glomus* (*G. aggregatum*, *G. mosseae* and *G. etunicatum*). Our results indicate that the saffron soils in Talouine contain a richer and diversified population of AMF spores that are dominated by the *Funneliformis* and *Rhizoglomus* genera (Former *Glomus* genus (Schüßler and Walker (2010))). Similarly Abdelhalim et al. (2014) reported the same dominant genus in the AMF associated with 13 selected crops in White Nile state, Central Sudan. Moreover *Glomus* species are known to be the most common AM fungi occurring throughout the world, which may be related with their adaptability to varying soil conditions such as acidity or alkalinity, and climatic conditions such as varying temperatures (Pande and Tarafdar 2004). Likewise *Glomus* species have the potential to produce a relatively high number of spores within a very short period of time (Oehl et al. 2009).

Quantitative and qualitative differences were observed according to the age of saffron plantation. At this respect spores density in saffron fields F1, F2 and F3, which differ by the date of plantation, increased significantly after one year of plantation and then the increase was not significant. Saffron plantations with the same age had significantly the same spore densities even if they were cultivated under different agronomic practices (F3, F4 and FT). We also noticed a variation at the species level from year to year. Indeed, some species not recovered the first year such as *Glomus reticulatum*, *Rhizoglomus aggregatum*, *Enterophospora infrequens* and *Funneliformis coronatus* have emerged the second or third year while others such as *Rhizoglomus intraradices* and *Sclerocystis taiwanensis* disappeared 2 or 3 years after plantation. The increased trend in spore density with the increased age of the fields was also reported by Burni et al. (2011) and Birhane et al. (2017). They suggested that this relation may be attributed to an increase in the organic matter content of the soil and its water holding capacity which may enhance AMF sporulation from year to year. It can also be postulated that AM fungi community of the soil is evolving according to the evolution of the environmental conditions. In fact, it is known that better-adapted AM fungi can replace the less-adapted ones as environmental conditions change (Yang et al. 2010).

#### **AMF root colonization of *C. sativus* under different agronomic practices**

The evaluation of mycorrhization parameters demonstrated that saffron mycorrhization is affected by the cultivation method used. The modern technique of saffron cultivation (F3) has a benefic effect on AMF-symbiosis, expressed by the high frequency and the intensity of mycorrhization of the roots compared to the traditional one (FT). The beneficial effect of modern plantation on AMF development can be explained by the fact that row cultivation allows the bulb roots to take better advantage of soil solution which is not the case in the traditional plantation, which is consisting in a mass cultivation of saffron corms in basins with bulbs cultivated profoundly (Moghadam et al. 2013). Also, the water regime could have an effect on the development of mycorrhization and the density of spores. The field planted with the traditional method (FT) was irrigated by spreading water in the parcel while fields of modern cultivation method are based on a drip irrigation system. Some authors reported that changes in soil water availability can highly influence the AMF community structure inside the host plant's roots (Symanczik et al. 2015).

#### **LSU rDNA region diversity**

The diversity of mycorrhizal fungi associated with saffron roots was assessed by studying the variability of the LSU rDNA region. Amplification and sequencing of this marker allowed us to identify different genera/species of saffron AMF that were dominated globally by the genus *Rhizoglomus*. Thus, we were able to identify approximately 42% of the sequences while the rest corresponded to unidentified fungi. At the species level, *Rhizoglomus irregulare* was the most



abundant (11.1%). It was remarkable that more than 42% of the sequences corresponded to the family of *Entrophosporaceae*, but only 6.7% of them belonged to a previously identified species (*Claroideoglomus drummondii*). The remaining sequences formed clearly three individualized new clades that are different from the known genera and species of *Entrophosporaceae*. These results show the existence of a wide diversity of AMF inhabiting roots of saffron that are dominated by different families belonging to the *Glomerales* order. Moreover, our study reports the first data concerning a molecular identification of AMF within *C. sativus* roots. In a recent publication Ambardar et al. (2016) studied the dynamics of fungal diversity associated with the rhizosphere and corms (in addition to roots) by using internal transcribed spacer (ITS) gene targeted metagenome sequencing (454 pyrosequencing technology). They failed to identify any sequence belonging to known AMF genera and curiously only endophytic fungi sequences were found. At the opposite, the technique of amplification of the LSU rDNA region using LR1/FLR2 and FLR3/FLR4 primers used here is suitable for the identification of AMF taxa associated with saffron roots. This marker gene, can under certain conditions, be more accurate for fungus identification than the ITS marker (Porrás-Alfaro et al. 2014): the LSU rDNA marker outperformed the ITS1 and ITS2 fragments at the genus level when full-length sequence sections were used, while the ITS1 and ITS2 showed higher accuracy when smaller fragment sizes of the same length and 50% bootstrap cutoff were used. The use of the LSU rDNA marker is also supported by the results of Řezáčová et al. (2016) who found that the amplification with LSU primers (LR1-FLR2) clearly yielded the highest AMF OTU and generic richness. However, our results showed that with the primers used 30 out of 75 amplified LSU sequences couldn't be related to known arbuscular mycorrhizal fungi. To overcome these limitations and to ensure a reliable and robust resolution of molecular systematics and environmental community analyses of AMF from phylum to species level, Krüger et al. (2012) suggested to analyze a substantial part of the nuclear locus encoding ribosomal RNA (the small subunit rDNA (SSU), the internal transcribed spacer region (ITS) and the large subunit rDNA (LSU)).

Our results show that globally the AMF identified inside the roots using LSU rDNA sequence analysis did not correspond exactly with those determined by the morpho-anatomical studies of the spores collected from soil. Members of the *Entrophosporaceae* family were identified inside the roots using LSU rDNA analysis while in the rhizosphere, spores of *Rhizoglosum*, *Funneliformis* and *Glomus* genera (*Glomeraceae*) were the most frequent, in addition to some representatives of the *Acaulosporaceae* family.

The latter group wasn't identified inside the roots by the molecular technique used. These results may be explained by the fact that the molecular marker used here is more precise than the morpho-anatomical identification of the spores, which is a difficult task that needs a high level of expertise and can lead to miss-identification of samples. Indeed, spores are relatively simple structures that offer only a limited number of potential discriminating features and the same AMF can produce spores of different morphologies and colors (Young 2012). In addition, it is known that the production of spores is not always correlated with the colonization of the roots. Counting or identification of the spore populations provide only partial information on the fungi that contribute to arbuscular mycorrhizal fungi and thus it can be assumed that spores do not sufficiently reflect the structure of the communities actually active in the roots (Merryweather and Fitter 1998).

### **Species diversity of AMF colonizing the roots under the different practices studied**

The species diversity index ( $H'$ ) of AMF colonizing saffron roots show that field F3 (the recent one) was more diversified than the oldest one, including the distribution. Notably taxons distribution in the different fields revealed that at the family level, the *Entrophosporaceae* were more abundant in saffron roots sampled from fields F1 and F2, the most ancient fields that were planted respectively in 2011 and 2012 using the modern method of plantation and a processed organic fertilizer. Eighteen months after sowing saffron bulbs, the AMF population in the roots was clearly

dominated by members of the *Glomeraceae* family (75%). In the two subsequent years a progressive shift in the dominating populations of AMF colonizing saffron roots was recorded, with the identification of more abundant *Entrophosporaceae* sequences (55.5% and 60% respectively 40 and 52 months after sowing the saffron bulbs). These results are comparable to those of Kil et al. (2014) who reported that the diversity of AMF species colonizing roots of the perennial herb *Panax ginseng* significantly decreased with the root age.

In the more recent fields, planted in 2013 using modern cultivation method (F3 and F4), Shannon diversity index declined in F4 compared to F3, probably due to the manure fertilization used. Besides, AMF populations of saffron roots were dominated by the *Glomeraceae* family, whatever the type of organic fertilizer used (processed or natural). The roots of saffron planted in 2013 using a traditional plantation method and the processed organic fertilizer contained equally proportions of both AMF families. At that matter, the traditional method of saffron cultivation leads to a more diversified and equilibrated population of AMF colonizing saffron roots.

## Conclusions

In conclusion, we have assessed for the first time in Morocco the density and diversity of mycorrhizal fungi in the soil and roots of *C. sativus* L. growing in Taliouine, the principal region of saffron production in Morocco. A wide variety of arbuscular mycorrhizal spores were identified in the rhizosphere of this plant by morpho-anatomical investigations, while the microscopic observations of intraradicular hyphae indicated a high colonization rate of saffron roots that depended on the plantation method used. The diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing saffron roots was also assessed by sequencing cloned PCR-amplified LSU rDNA gene region. The results obtained in this study constitute a solid scientific basis and another pathway to preserve and maybe to improve the quality of the saffron production in Taliouine region.

## Acknowledgments

The authors thank the responsible of the company 123 SAFRAN for giving them the opportunity to sample under the different agricultural practices used for saffron cultivation in their farm, the financial support to the PhD student Imane Chamkhi and for all the logistic, technicians and workers that they put at their service during the sampling.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## References

- Abbas Y, Ducouso M, Abourouh M, Azcón R, Duponnois R 2006. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters woodlands in Morocco. *Ann For Sci.* 63:285–291.
- Abdelhalim TS, Finckh MR, Babiker AG, Oehl F 2014. Species composition and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in White Nile state, Central Sudan. *Arch Agron Soil Sci.* 60:377–391.
- Ambardar S, Singh HR, Gowda M, Vakhlu J 2016. Comparative metagenomics reveal phylum level temporal and spatial changes in mycobiome of belowground parts of *Crocus sativus*. *PLOS One.* 11:e0163300.
- Aziz L, Sadok W 2015. Strategies used by the saffron producers of Taliouine (Morocco) to adapt to climate change. *J Alp Res/Rev Géographie Alp* 103–2. Available from: <https://rga.revues.org/2902>
- Bhargava V 2011. Medicinal uses and pharmacological properties of *Crocus sativus* Linn (Saffron). *Int J Pharm Pharm Sci.* 3:22–26.
- Bhattacharyya PN, Jha DK 2011. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol.* 28:1327–1350.
- Birhane E, Gebremedihin KM, Tadesse T, Hailemariam M, Solomon N 2017. Enclosures restored the density and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in Tigray, Northern Ethiopia. *Ecol Process.* 6:33.



- Błaszczkowski J, Chwat G, Góralska A 2015b. *Acaulospora ignota* and *Claroideoglossum hanlinii*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) from Brazil and Cuba. *Mycol Prog.* 14:18.
- Błaszczkowski J, Chwat G, Góralska A 2016. *Dominikia lithuanica* and *Kamienskia divaricata*: new species in the Glomeromycota. *Botany.* 94:1075–1085.
- Błaszczkowski J, Góralska A, Ryszka P, Kovács GM 2015a. Two new genera, *Dominikia* and *Kamienskia*, and *D. disticha* sp. nov. in Glomeromycota. *Nova Hedwig.* 100:225–238.
- Błaszczkowski J, Kozłowska A, Niezgodna P, Goto BT, Dalpé Y 2018. A new genus, *Oehlia* with *Oehlia diaphana* comb. nov. and an emended description of *Rhizoglossum vesiculiferum* comb. nov. in the Glomeromycotina. *Nova Hedwigia.* Available from [https://doi.org/10.1127/nova\\_hedwigia/2018/0488](https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2018/0488).
- Burni T, Hussain F, Sharief M 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi (amf) associated with the rhizosphere of *Mentha arvensis* L., and *M. longifolia* huds. *Pak J Bot.* 43:3013–3019.
- Escribano J, Alonso G-L, Coca-Prados M, Fernández J-A 1996. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett* 100:23–30.
- Gadkar V, David-Schwartz R, Kunik T, Kapulnik Y 2001. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. *Plant Physiol.* 127:1493–1499.
- Gerdemann JW, Nicolson TH 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc.* 46:235–244.
- Golotte A, van Tuinen D, Atkinson D. 2003. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza.* 14: 111–117.
- Gresta F, Lombardo GM, Siracusa L, Ruberto G 2008. Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. A review. *Agron Sustain Dev* 28:95–112.
- Monroy LHJ, Salamanca SCR, Cano C, Moreno-Conn LM, Orduz-Rodríguez JO 2013. Influencia de las coberturas en cultivos de cítricos sobre los hongos formadores de micorrizas arbusculares en Oxisoles del piedemonte llanero colombiano. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecu.* 14:53–65.
- Hosseinzadeh H, Younesi HM 2002. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol.* 2:7.
- Jansa J, Erb A, Oberholzer H-R, Šmilauer P, Egli S 2014. Soil and geography are more important determinants of indigenous arbuscular mycorrhizal communities than management practices in Swiss agricultural soils. *Mol Ecol.* 23:2118–2135.
- Kianmehr H 1981. Vesicular—arbuscular Mycorrhizal spore population and infectivity of saffron (*Crocus sativus*) in Iran. *New Phytol.* 88:79–82.
- Kil Y-J, Eo J-K, Lee E-H, Eom A-H 2014. Root age-dependent changes in Arbuscular Mycorrhizal Fungal communities colonizing roots of *Panax ginseng*. *Mycobiology.* 42:416–421.
- Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüßler A 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol.* 193:970–984.
- Lone R, Shuab R, Malla NA, Gautam AK, Koul KK 2016. Beneficial effects of arbuscular mycorrhizal fungi on underground modified stem propagule plants. *J New Biol Rep.* 5:41–51.
- Merryweather J, Fitter A 1998. The arbuscular mycorrhizal fungi of Hyacinthoides non-scripta L. Diversity of fungal taxa. *New Phytol.* 138:117–129.
- Moghadam GD, Sadeghi SM, Droodian H 2013. Types of cultivation methods in saffron (*Crocus sativus*) and observing the Principles of Fight against Pests and Weeds. *Persian Gulf Crop Prot.* 2: 8–13.
- Mohebi-Anabat M, Riahi H, Zanganeh S, Sadeghnezhad E 2015. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on the growth, photosynthetic pigments and soluble sugar of *Crocus sativus* (saffron) in autoclaved soil. *Int J Agron Agri Res.* 6:296–304.
- Oehl F, Da Silva GA, Sánchez-Castro I, Goto BT, Maia LC, Vieira HEE, Barea J-M, Sieverding E, Palenzuela J. 2011. Revision of Glomeromycetes with entrophosporoid and glomoid spore formation with three new genera. *Mycotaxon.* 117: 297–316.
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Wiemken A, Boller T 2009. Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. *Agric Ecosyst Environ.* 134:257–268.
- Pande M, Tarafdar JC 2004. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity in neem-based agroforestry systems in Rajasthan. *Appl Soil Ecol.* 26:233–241.
- Pereira CMR, Maia LC, Sánchez-Castro I, Palenzuela J, Silva DKA, Sudová R, Sýkorová Z, Rydlová J, Čtvrtlíková M, Goto BT, et al. 2016. *Acaulospora papillosa*, a new mycorrhizal fungus from NE Brazil, and *Acaulospora rugosa* from Norway. *Phytotaxa.* 260:14–24.
- Pérez A, Botero C, Cepero M 2012. Diversidad de micorrizas arbusculares en pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus de fincas ganaderas del municipio de Corozal-Sucre. *Rev MVZ Córdoba.* 17:3024–3032.
- Pérez A, Peroza V 2013. Micorrizas arbusculares asociadas al pasto angleton (*Dichathium aristatum* Benth) en fincas ganaderas del municipio de Tolú, Sucre-Colombia. *Rev MVZ Córdoba.* 18:3362–3369.
- Phillips JM, Hayman DS 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc.* 55:158-IN.

- Pitsikas N 2016. Constituents of saffron (*Crocus sativus* L.) as potential candidates for the treatment of anxiety disorders and schizophrenia. *Molecules*. 21:303.
- Porras-Alfaro A, Liu K-L, Kuske CR, Xie G 2014. From genus to phylum: large-Subunit and Internal Transcribed Spacer rRNA operon regions show similar classification accuracies influenced by database composition. *Appl Environ Microbiol*. 80:829–840.
- Rajeshkumar PP, Thomas GV, Gupta A, Gopal M 2015. Diversity, richness and degree of colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in coconut cultivated along with intercrops in high productive zone of Kerala, India. *Symbiosis*. 65:125–141.
- Řezáčová V, Gryndler M, Bukovská P, Šmilauer P, Jansa J 2016. Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi—contributions of PCR primer and host plant selectivity to the detected community profiles. *Pedobiologia*. 59:179–187.
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer SL, Morton JB, Walker C 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza*. 23:515–531
- Rodríguez-Morelos VH, Soto-Estrada A, Pérez-Moreno J, Franco-Ramírez A, Díaz-Rivera P 2014. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the rhizosphere of seedlings and mature trees of *Swietenia macrophylla* (*Magnoliophyta: meliaceae*) in Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. *Rev Chil Hist Nat*. 87:9.
- Sbrana C, Avio L, Giovannetti M 2014. Beneficial mycorrhizal symbionts affecting the production of health-promoting phytochemicals. *Electrophoresis*. 35:1535–1546.
- Schüßler A, Walker C (2010). The Glomeromycota: a species list with new families. Arthur Schüßler and Christopher Walker, Gloucester. Published in December 2010 in libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. Printed copy available under ISBN-13: 978-1466388048, ISBN-10:1466388048. Available at <http://www.amf-phylogeny.com>
- Sengul M, Yildiz H, Gungor N, Cetin B, Eser Z, Ercisli S 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak J Pharm Sci*. 22:102–106.
- Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, Bonito G, Corradi N, Grigoriev I, Gryganskyi A, et al. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*. 108:1028–1046.
- Symanczik S, Courty P-E, Boller T, Wiemken A, Al-Yahya'ei MN 2015. Impact of water regimes on an experimental community of four desert arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) species, as affected by the introduction of a non-native AMF species. *Mycorrhiza*. 25:639–647.
- Tedersoo L, Sanchez-Ramirez S, Koljalg U, Bahram M, Doring M, Schigel D, May T, Ryberg M, Abarenkov K 2018. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fung Divers*. 90: 135–159.
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle [Measurement of VA mycorrhization rate of a root system. Search for estimation methods with functional significance]. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzin S (eds.), *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, INRA Press, Paris (France), p. 217–221.
- Trouvelot S, van Tuinen D, Hijri M, Gianinazzi-Pearson V. 1999. Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza*. 8: 203–206.
- Wu Q-S, Xia R-X 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *J Plant Physiol*. 163:417–425.
- Yang C, Hamel C, Schellenberg MP, Perez JC, Barbara RL 2010. Diversity and functionality of arbuscular mycorrhizal fungi in three plant communities in semiarid grasslands National Park, Canada. *Microb Ecol*. 59:724–733.
- Young JPW. 2012. A molecular guide to the taxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*. 193:823–826.

## Synthèse

L'objectif de ce volet est d'examiner la diversité des mycorhizes colonisant la rhizosphère et les racines du safran sous l'effet de trois pratiques de gestion agricole (l'âge de la plantation, la méthode de plantation et le type de fertilisation).

La prospection sur le terrain du safran cultivé à Taliouine a montré que les CMA développent avec succès des associations mycorhiziennes symbiotiques dans les conditions prévalant dans la région (Annexe 4).

En examinant les spores recueillies du sol de la rhizosphère de *C. sativus* (annexe 5), onze espèces ont été trouvées dans les sols du safran de Taliouine, correspondant à *Glomus tenebrosum*, *Glomus reticulatum*, *Septoglomus deserticola*, *Sclerocystis taiwanensis*, *Rhizoglomus aggregatum*, *Rhizoglomus intraradices*, *Funneliformis mosseae*, *Funneliformis coronatus*, *Enterophospora infrequens*, *Acaulospora* sp. et *Funneliformis* sp. (Annexe 4). Il est intéressant de noter que les genres *Glomus*, *Funneliformis* et *Rhizoglomus* sont les genres les plus répandus et les plus diversifiés. Les espèces *Glomus* sont les champignons MA les plus répandus dans le monde et les auteurs suggèrent que cela pourrait être dû à leur adaptabilité à diverses conditions du sol telles que l'acidité ou l'alcalinité du sol et aux conditions climatiques (Pande and Tarafdar 2004).

Dans nos sols la densité des spores des CMA était significativement affectée par la date de plantation. Ainsi la densité des spores est plus élevée dans le champ de safran le plus ancien (F1) par rapport au champ le plus récent (F3). Par contre, nous n'avons pas trouvé d'effet significatif des méthodes de plantation ou de fertilisation sur la densité des spores des CMA.

Nous avons également noté une variation au niveau des espèces d'une année à l'autre. En effet, certaines espèces non récupérées la première année telles que *Glomus reticulatum*, *Rhizoglomus aggregatum*, *Enterophospora infrequens* et *Funneliformis coronatus* sont apparues la deuxième ou la troisième année de plantation. Par contre, d'autres espèces telles que *Rhizoglomus intraradices* et *Sclerocystis taiwanensis* ont disparu 2 ou 3 années après la plantation. Burni et al. (2011) et Birhane et al. (2017) ont suggéré que cette relation pouvait être attribuée à une augmentation de la teneur en matière organique du sol et à sa capacité de rétention d'eau, ce qui pourrait améliorer la sporulation des CMA d'une année à une autre. On peut également expliquer cette relation par l'évolution de la communauté des champignons MA du sol en fonction de l'évolution des conditions environnementales. En effet, il est connu que les champignons MA mieux adaptés peuvent remplacer les champignons les moins adaptés lorsque les conditions environnementales changent (Yang et al. 2010).

La technique moderne de culture du safran (F3) a un effet bénéfique sur la symbiose des CMA, exprimée par la fréquence élevée et l'intensité de la mycorrhization des racines par rapport à la technique traditionnelle de culture (FT). L'effet bénéfique des plantations modernes sur le développement des CMA peut s'expliquer par le fait que la culture en lignes permet aux racines des cormes de mieux tirer parti de la solution du sol, ce qui n'est pas le cas dans les plantations traditionnelles en bassins avec les cormes profondément cultivés (Moghadam et al. 2013). De plus, le régime hydrique pourrait avoir un effet sur le développement de la mycorrhization et la densité des spores. Le champ planté avec la méthode traditionnelle (FT) a été irrigué en épandant de l'eau dans la parcelle, tandis que les champs de culture moderne sont basés sur un système d'irrigation goutte à goutte. Certains auteurs ont signalé que les changements dans la disponibilité de l'eau dans le sol peuvent fortement influencer la structure de la communauté AMF à l'intérieur des racines de la plante hôte (Symanzik et al. 2015).

D'autre part, la diversité des champignons mycorrhiziens associés aux racines du safran a été évaluée en étudiant la variabilité de la région de l'ADNr LSU. Les résultats ont montré que les CMA du safran sont dominés globalement par le genre *Rhizophagus*. Au niveau de ce genre, *Rhizophagus irregularis* est l'espèce la plus abondante (11,11%). Il est remarquable que plus de 42% des séquences obtenues correspondent à la famille des *Entrophosporaceae*, et que seulement 6,66% d'entre elles appartiennent à une espèce précédemment identifiée (*Claroideoglossum drummondii*). Les séquences restantes forment clairement trois nouveaux clades individualisés, différents des genres et espèces connus de la famille d'*Entrophosporaceae*. Ces résultats montrent l'existence d'une grande diversité des AMF dans les racines du safran dominées par différentes familles appartenant à l'ordre des Glomerales. Globalement les CMA identifiés à l'intérieur des racines à l'aide de l'analyse de séquence d'ADNr LSU ne correspondent pas exactement à celles déterminées par les études morpho-anatomiques des spores prélevées du sol. Les membres de la famille des *Entrophosporaceae* ont été identifiés à l'intérieur des racines à l'aide de l'analyse de l'ADNr LSU tandis que les spores de la rhizosphère de *Glomus* et *Funneliformis* (*Glomeraceae*) étaient les plus fréquentes en plus de quelques représentants de la famille des *Acaulosporaceae*. Le dernier groupe n'a pas été identifié à l'intérieur des racines par la technique moléculaire utilisée. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le marqueur moléculaire utilisé ici est plus précis que l'identification morpho-anatomique des spores.

L'indice de diversité ( $H'$ ) des espèces de CMA colonisant les racines du safran montre que le champ F3 (le plus récent) était plus diversifié que le champ le plus ancien, y compris la distribution. La répartition des taxons dans les différents champs a notamment révélé que la



famille des *Entrophosporaceae* est la plus abondante dans les racines du safran prélevées dans les champs F1 et F2 qui sont les champs les plus anciens, plantés respectivement en 2011 et 2012 en utilisant la méthode moderne de plantation et le fertilisant organique transformé. En notant aussi que l'indice de diversité de Shannon a diminué dans F4 par rapport à F3, probablement en raison de la fertilisation du fumier utilisée. En outre, les populations de CMA des racines de safran étaient dominées par la famille des *Glomeraceae* indépendamment du type d'engrais organique utilisé (transformé ou naturel).

### **Conclusion**

Notre étude est la première au Maroc à avoir évalué la densité et la diversité des champignons mycorhiziens dans le sol et les racines de *C. sativus* L. en croissance à Taliouine, principale région de production de safran au Maroc. Une grande variété de spores mycorhiziennes arbusculaires a été identifiée dans la rhizosphère de cette plante par des investigations morpho-anatomiques, tandis que les observations microscopiques des hyphes intraradiculaires indiquaient un taux de colonisation élevé des racines de safran dépendant de la méthode de plantation utilisée. La diversité des champignons mycorhiziens à arbuscules colonisant les racines de safran a également été évaluée par séquençage du gène de l'ADNr LSU. Les résultats obtenus dans cette étude constituent une base scientifique solide et une autre voie à suivre pour préserver et peut-être améliorer la qualité de la production de safran dans la région de Taliouine.

*Article 2*

**Endophytic fungi isolated from *Crocus sativus* L. (Saffron) as a source of bioactive secondary metabolites**

**Les champignons endophytes isolés de *Crocus Sativus* L. (Safran) comme source de métabolites secondaires bioactifs**

Imane Chamkhi<sup>1</sup>, Laila Sbabou<sup>1</sup> and Jamal Aurag<sup>1</sup>

**Article Details:** PJ Vol 10, Issue 6, Nov-Dec, 2018

**Article DOI** : 10.5530/pj.2018.6.195

**Article URL** : <http://www.phcogj.com/article/732>

**Cite this article:** Chamkhi I, Sbabou L, Aurag J. Endophytic Fungi Isolated from *Crocus sativus* L. (Saffron) as a Source of Bioactive Secondary Metabolites. Pharmacog J. 2018;10(6):1143-8.

## **Introduction – objectif**

Différentes études ont mené à la découverte de l'importance des champignons endophytes grâce à la production d'un grand nombre de métabolites secondaires intéressants, notamment des composés anticancéreux, antifongiques, antidiabétiques et immunosuppresseurs similaires à ceux produits par les plantes hôtes. La production de ces composés intéressants fait des champignons endophytes une source alternative et naturelle de métabolites secondaires importants pour les plantes (Priti et al. 2009). Les endophytes fongiques pourraient être bénéfiques pour les plantes hôtes en augmentant leur tolérance aux facteurs de stress biotiques et abiotiques (Schardl et al. 2004; Rodriguez et al. 2009). La production de composés bioactifs par les endophytes, en particulier ceux qui sont exclusifs à leurs plantes hôtes, est très importante du point de vue écologique, biochimique et moléculaire (Kusari et al. 2011).

Huang et al. (2008) ont montré que les 1160 isolats fongiques provenant de 29 espèces de plantes médicinales présentaient une biodiversité élevée, une récurrence de l'hôte et une spécificité tissulaire. Certains composés phénoliques ont plus de chances de coexister avec certains champignons endophytes dans les mêmes plantes et leur étude systématique a révélé que les plantes médicinales traditionnelles constituent une source riche et fiable de nouveaux champignons endophytes. A partir de cette constatation on peut supposer que les plantes médicinales en général et en particulier, le safran, pourraient constituer une autre source de champignons endophytes.

Dans ce contexte, nous avons étudié les champignons endophytes qui colonisent les racines de *C. sativus* dans la région de Taliouine au sud du Maroc. Notre objectif principal était d'isoler et d'identifier ces champignons, puis d'en extraire les métabolites secondaires et finalement évaluer leurs activités biologiques éventuelles et plus particulièrement leurs activités antibactérienne et antioxydante.

## Endophytic Fungi Isolated from *Crocus sativus* L. (Saffron) as a Source of Bioactive Secondary Metabolites

Imane Chamkhi\*, Laila Sbabou, Jamal Aurag

Imane Chamkhi\*, Laila Sbabou, Jamal Aurag

Microbiology and Molecular Biology Team, Center of Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, MOROCCO.

### Correspondence

Imane Chamkhi

Center of Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Avenue IbnBattouta, BP 1014, Rabat 10000, MOROCCO.

Phone no : 21 26318 09913

E-mail: chamkhi.imane@gmail.com

### History

- Submission Date: 10-05-2018;
- Review completed: 22-06-2018;
- Accepted Date: 23-07-2018

DOI : 10.5530/pj.2018.6.195

### Article Available online

<http://www.phcogj.com/v10/i6>

### Copyright

© 2018 Phcog.Net. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



### ABSTRACT

**Introduction:** Endophytic fungi are becoming an important source of new natural bioactive products. Many interesting endophytic fungi have been isolated from traditional medicinal plants. *Crocus sativus* L. (saffron) is one of the most expensive and rarest spices in the world, used as a dye, aroma and for medicinal purposes. This study reports on the molecular characterization of endophytic fungi isolated from roots of saffron plants growing in Taliouine-Morocco, and the examination of the antibacterial and antioxidant activities of secondary metabolites extracted from these endophytes. **Methods and Material:** The fungi were isolated from sterilized saffron root fragments and identified using internal transcribed spacer (ITS) rRNA gene sequence analysis. Three endophytes were fermented and extracted with ethyl acetate (EtOAc) and chloroform (CHCl<sub>3</sub>). The antibacterial activity of fungi extracts was evaluated using the Agar Diffusion Method against six strains, *Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas putida*, *Pantoea* sp., *Luteibacter* sp. and *Escherichia coli*. The antioxidant activity was tested by using the  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) analysis and  $\beta$ -Carotene bleaching test (BCBT) methods. **Results:** Sixty fungal isolates were recovered and purified from saffron roots. ITS rDNA sequences were 99-100% identical to three different species: *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus fumigatiaffinis* and *Aspergillus niger*. Both *Rhizopus oryzae* extracts had high antibacterial activity against most of the bacteria tested, while *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae* extracts showed an antioxidant capacity using DPPH and BCBT methods, respectively. **Conclusion:** The fungal endophytes inhabiting saffron roots could be a potential source of natural plant bioactive secondary metabolites especially for antibacterial and antioxidant purposes.

**Key words:** *Crocus sativus* L., Endophytic fungi, ITS rDNA, Secondary metabolites, Antibacterial activity, Antioxidant activity.

## INTRODUCTION

Endophytic fungi are microorganisms that live in the intercellular spaces of stems, petioles, roots, and leaves of plants.<sup>1</sup> These endophytes colonize plants internally without apparent adverse effects and they are not considered as saprophytes since they are associated with living tissues without causing any noticeable symptoms of a disease. However, some endophytic fungi may become pathogenic under stressful conditions.<sup>2</sup> Endophytic fungi have been detected in hundreds of plants including many important agricultural commodities.<sup>3</sup> Different studies demonstrated that they produce a large number of interesting secondary metabolites including anti-cancer, antifungal, antidiabetic and immune-suppressant compounds comparable to those produced by host plants. The production of these interesting compounds makes endophytic fungi an alternative and natural source of important plant secondary metabolites.<sup>4</sup> In addition, fungal endophytes could be beneficial to host plants by increasing their tolerance to biotic and abiotic stress factors.<sup>5</sup> Many endophytes have the potential to synthesize various

bioactive metabolites that may directly or indirectly be used as therapeutic agents against numerous diseases, such as paclitaxel, podophyllotoxin, hypericin, vinblastine, camptothecine and diosgenin which are also produced by their host.<sup>6</sup> The production of bioactive compounds by endophytes, especially those exclusive to their host plants, are highly important from ecological, biochemical and molecular perspective.

Investigations concerning 29 medicinal plant species and 1.160 fungal endophytes showed the existence of high biodiversity, host recurrence, tissue specificity, and spatial heterogeneity.<sup>7</sup> Some phenolic compounds were found to more likely coexist with certain endophytic fungi in the same plants, and their systematic investigation revealed that traditional medicinal plants are a rich and reliable source of novel endophytic fungi. This information has led us to assume that saffron could constitute another source of endophytic fungi with biological activity.

**Cite this article:** Chamkhi I, Sbabou L, Aurag J. Endophytic Fungi Isolated from *Crocus sativus* L. (Saffron) as a Source of Bioactive Secondary Metabolites. Pharmacogn J. 2018;10(6):1143-8.



Saffron is a perennial crop culture that belongs to the large family of Iridaceae and to the genus *Crocus* which includes about 162 species (National Center for Biotechnology Information). *Crocus sativus* represents the most interesting species because of the natural coloring, bitterness and aromatic power of its dried stigmas.<sup>8</sup> The saffron have been used as a dye in cosmetics and perfumes, as spice in food and also as medicinal plant, with a potent chemotherapeutic effect for the treatment of various diseases.<sup>9</sup> Saffron is cultivated under different climates in different countries of Asia and the Mediterranean basin. Iran is the main producer of saffron, accounting for more than 90% of world production, followed by India (5%) and countries of the Mediterranean basin (Greece, Morocco, Spain, Italy and Turkey).<sup>10</sup> However, the Mediterranean region is recognized worldwide as producing the best quality of saffron, which is attributed to many factors.<sup>10-11</sup>

However, up to date no studies have been carried out on the endophytic fungi of Moroccan saffron. At the international level studies focused on endophytic fungi recovered from corms and stems of saffron, but to our knowledge no study has looked at the roots that are the entry point for endophytic fungi.<sup>12-13</sup> In this context our main objective was the isolation of endophytic fungi from roots of saffron growing in Morocco, their molecular identification and assessment of their possible antibacterial and antioxidant activities through the extraction of secondary metabolites.

## MATERIAL AND METHODS

### Study area, plant sampling and endophytic fungi isolation

Plant samples of *C. sativus* were collected randomly during April 2016 from 1.2.3. SAFRAN farm (N30°28'12.997"/W7°46'22.479") located in Talakhat-Taliouine zone at Taroudant province, Souss-Massa region (Morocco). Root samples were separated from individual healthy plants. Each root sample was washed thoroughly under running tap water to remove soil particles, dried and cut into 1 cm length segments. The root segments were surface sterilized following the protocol of Fernández Di Pardo,<sup>13</sup> then placed in Petri dish plates containing potato dextrose agar (PDA) and incubated in the dark at 25±2°C until fungal growth appeared.

### Molecular identification of endophytic fungi

A lyophilized sample of fungal hyphae (0.2 g) was powdered in a Mixer Mill for 10 min. DNA isolation was performed using the Promega™ Wizard™ Genomic DNA Purification Kit according to the manufacturer's protocol. The isolated DNA was dissolved in 50 µl of the elution buffer. PCR reaction was performed using my Taq TMHS mix bioline kit and ITS1 (5'-TCCGATGGTGAACCTGCGG-3') as the forward primer and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') as the reverse primer. The PCR program was carried as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 35 cycles of a denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 56°C for 30s and an extension at 72°C for 1 min then a final extension of 10 min at 72°C.<sup>14</sup> Purified PCR products were sequenced using the universal primer ITS1 at Genoscreen (Lille, France). The sequences were corrected using BioEdit software and compared to the available databases deposited in the NCBI.

### Extraction of endophytic fungi secondary metabolites

The fermentation broth of the different fungus species was prepared as explained by Barik.<sup>15</sup> Metabolites were extracted using two organic solvents: EtOAc and CHCl<sub>3</sub>. Each filtrate was mixed with an equivalent volume of solvent and placed under stirring for 2 h. The organic layer (EtOAc) was separated from the aqueous layer in the separating funnel, this is the EtOAc fraction. The CHCl<sub>3</sub> fraction was also obtained using

the same procedure. The collected organic phase was recovered and concentrated under pressure by evaporating the solvent using a rotary evaporator.<sup>16</sup> Finally, the resultant compound was dissolved in methanol.

### Antimicrobial activity

The endophytic fungi extracts were evaluated against six bacterial strains from the collection of the Microbiology and Molecular Biology team (Faculty of sciences, Rabat, Morocco). One Gram-positive *Bacillus* sp. strain and five Gram-negative strains belonging to different genera: *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas putida*, *Pantoea* sp. and *Luteibacter* sp. and the reference strain *Escherichia coli* (DH5α). All bacterial suspensions were prepared in liquid medium, *Escherichia coli* was grown in Luria-Bertani (LB) medium for 20 h at 37°C while the other strains were grown in Tryptone Yeast (TY) medium for 20 h at 28°C until the stationary growth phase. Microbial suspensions were diluted with either LB or TY media to a final concentration of 10<sup>6</sup> CFU/ml. The antimicrobial test was carried out using the Agar Diffusion Method.<sup>17</sup> Each microbial suspension was spread on the surface of the appropriate agar media. Sterilized Whatman paper discs of 7 mm diameter was deposited on the agar surface and 15 µl of each extract was added on the top of the disc, then incubated at 37°C/28°C for 24 h. The antimicrobial activity was measured by the diameter of the inhibition zone.<sup>18</sup>

### Antioxidant activity

The antioxidant activity of the extracts was measured by two methods;

#### The DPPH method

DPPH is a stable, nitrogen-centered free radical of a purplish color which fades to shades of yellow color in the presence of scavenging compounds (antioxidants). The absorbance measurement used to calculate the percentage of DPPH radical inhibition is proportional to the anti-radical power of the sample. To test the antioxidant activity of the extracts studied, 50 µl of each endophytic fungus extract was mixed with 1.95 ml DPPH (0.025 g/l) and incubated in darkness at 37°C for 30 min. The DPPH scavenging capacity of the sample was calculated using the equation adopted by Wang.<sup>19</sup> Ascorbic acid (Asc A) was used as a positive control and all the tests were carried out in triplicate.

#### The BCBT method

The mixture of β-carotene linoleic acid was prepared as follows: 2 mg β-carotene was dissolved in 1 ml chloroform and 25 µl of linoleic acid and 200 mg of Tween 40 were added, then chloroform was completely evaporated using a vacuum evaporator at 40°C for 5 min. Finally, 100 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM was added while shaking vigorously. Five milliliters of this reaction mixture was dispensed into test tubes and 100 µl of a prepared methanol extract of endophytic fungi were added and vortexed. The absorbance of the mixtures was measured at 470 nm immediately (T=0 h), then the emulsion system was incubated at 50°C during 3 h to calculate the percentage (A%) of antioxidant activity by using the equation mentioned in Liu.<sup>20</sup> Butylhydroxytoluene (BHT) and methanol were used as positive and negative controls, respectively. The discoloration kinetics of the emulsion of each sample was measured using a spectrophotometer at 470 nm immediately after sample preparation (T=0 h) and at 1 h, 2 h, 3 h, 24 h, and 48 h.

### Statistical analysis

All parameters were statistically analyzed using XLSTAT program (Version 2014.5.03), with \ one-way ANOVA and compared using Fisher's Least Significant Difference test with a 5% probability threshold.



**Table 1: Accession numbers of endophytic fungi isolated from the roots of *C. sativus***

Fungal isolate	Fungus species	Accession number
LMR568	<i>Rhizopus oryzae</i>	KY042103
LMR569	<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i>	KY042104
LMR570	<i>Aspergillus niger</i>	KY042105

**Table 2: Antibacterial activity of EtOAc and CHCl<sub>3</sub> extracts of endophytic fungi isolated from the roots of *C. sativus***

Extracts	Inhibition zone (mm)						
	Control	Chloroform extracts			Ethyl acetate extracts		
		Aspergillus fumigatiaffinis	Aspergillus niger	Rhizopus oryzae	Aspergillus fumigatiaffinis	Aspergillus niger	Rhizopus oryzae
Endophytic fungi							
Stenotrophomonas sp	0±0 <sup>f</sup>	12±0 <sup>d</sup>	0±0 <sup>e</sup>	20±0 <sup>e</sup>	11.5±1.15 <sup>d,e</sup>	11±0 <sup>d,e</sup>	15.03±0.05 <sup>e</sup>
Escherichia coli	0±0 <sup>f</sup>	0±0 <sup>f</sup>	0±0 <sup>f</sup>	11±0 <sup>d,e</sup>	26±0 <sup>a</sup>	10±0 <sup>e</sup>	11±0 <sup>d,e</sup>
Pseudomonas putida	0±0 <sup>f</sup>	12±0 <sup>d</sup>	10±0 <sup>e</sup>	23±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>f</sup>	10±0 <sup>e</sup>	12±0 <sup>d</sup>
Bacillus sp	0±0 <sup>f</sup>	12±0 <sup>d</sup>	0±0 <sup>f</sup>	0±0 <sup>f</sup>	12±0 <sup>d</sup>	10±0 <sup>e</sup>	9±0 <sup>e</sup>
Pantoea sp	0±0 <sup>f</sup>	12±0 <sup>d</sup>	10±0 <sup>e</sup>	10±0 <sup>e</sup>	15±0 <sup>c</sup>	10±0 <sup>e</sup>	14±0 <sup>c</sup>
Luteibacter sp	0±0 <sup>f</sup>	10±0 <sup>e</sup>	0±0 <sup>f</sup>	22±0 <sup>b</sup>	11±0 <sup>d,e</sup>	10±0 <sup>e</sup>	20±0 <sup>b</sup>

Values with different letters differ significantly (P < 0.05)

## RESULTS

### Isolation and molecular identification of isolated endophytic fungi

Sixty pure fungal isolates were obtained from roots of saffron plants and their DNA was extracted, amplified and sequenced. Their ITS rDNA sequences were 99–100% identical to three fungal species. *Rhizopus oryzae* was the most abundant (93.54%) followed by *Aspergillus fumigatiaffinis* (4.83%) and *Aspergillus niger* (1.61%). All sequences obtained in this study were submitted to NCBI data bank. Accession numbers of the three isolates used in this study are available in Table 1.

### Antimicrobial activity

The effect of three endophytic fungi extracts against six different studied bacteria by the Agar Diffusion Method showed an interesting antibacterial activity (Table 2). Antibacterial effects of EtOAc solvent fraction extracts were superior to those of CHCl<sub>3</sub> extracts, particularly the EtOAc extract of *Rhizopus oryzae* inhibited all bacteria tested. However, different levels of bacterial sensitivity were recorded from high to low, with *Luteibacter* sp. being the most sensitive followed by *Stenotrophomonas* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* and finally *Bacillus* sp. The EtOAc extract of *Aspergillus niger* also inhibited all tested strains with a similar zone of inhibition while the EtOAc extract of *Aspergillus fumigatiaffinis* inhibited almost all the strains tested except *Pseudomonas putida* which was more resistant, while the *Escherichia coli* strain was the most sensitive.

On the other hand, CHCl<sub>3</sub> extract of *Rhizopus oryzae* inhibited all the Gram-negative strains tested while the Gram-positive strain *Bacillus* sp. was resistant. The CHCl<sub>3</sub> extract of *Aspergillus fumigatiaffinis* inhibited all the bacteria except *Escherichia coli*, while the CHCl<sub>3</sub> extract of *Aspergillus niger* was only efficient on *Pseudomonas putida* and *Pantoea* sp. strains.

### Antioxidant activity

#### The DPPH tests

The calculated percentage of DPPH decolorization showed that the performance of EtOAc extract of *Aspergillus niger* was high but still

lower as compared to the standard substance: ascorbic acid (5µg/ml) (Asc A) (Figure 1). According to the inhibition percentage of DPPH, extracts of the endophytic fungi can be classified in a decreasing order: *Aspergillus niger* (EtOAc) > *Rhizopus oryzae* (EtOAc) > *Rhizopus oryzae* (CHCl<sub>3</sub>) > *Aspergillus fumigatiaffinis* (EtOAc) > *Aspergillus fumigatiaffinis* (CHCl<sub>3</sub>) > *Aspergillus niger* (CHCl<sub>3</sub>).

These results indicate that EtOAc fraction extracts has higher radical scavenging activities than CHCl<sub>3</sub> fraction extracts.

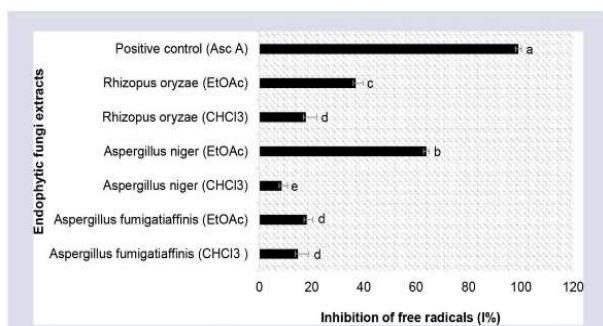
#### The BCBT test

The bleaching kinetics of β-carotene of the studied extracts were measured spectrophotometrically following the fading of the β-carotene at 470 nm during 48 h (Figure 2).

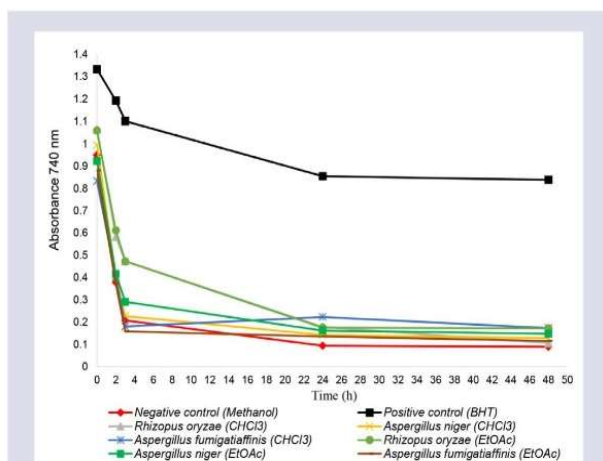
The β-carotene undergoes rapid discoloration in the absence of an antioxidant, the negative control, followed by *Aspergillus fumigatiaffinis* (EtOAc) and *Aspergillus fumigatiaffinis* (CHCl<sub>3</sub>). At the opposite both *Rhizopus oryzae* extracts appear to be the best inhibitor of linoleic acid oxidation. The results of β-carotene bleaching measurements presented in Figure 3 confirmed that both extracts of *Rhizopus oryzae* have good antioxidant potentials, with 43.17%±7.54b and 42.82%±4.04b respectively, compared to the other endophytic fungi extracts.

## DISCUSSION

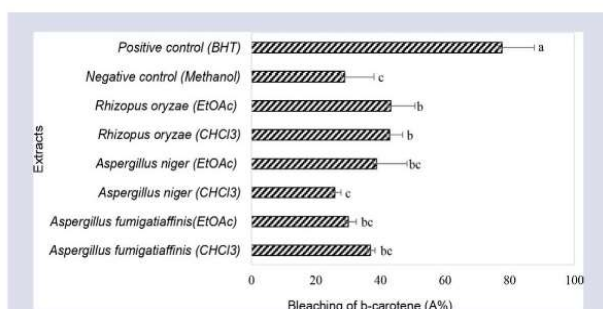
In this study, 60 fungal isolates were purified from segments of *C. sativus* roots. The most abundant fungi species was *Rhizopus oryzae* followed by *Aspergillus fumigatiaffinis* and *Aspergillus niger*. Two recent studies reported the results about fungal endophytes associated with saffron corms and/or stems collected from different sites in Jammu and Kashmir State (India).<sup>21-22</sup> The dominant endophytes in the first study were *Rhizoctonia* sp followed by *Fusarium* sp. and *Phytophthora* sp.,<sup>21</sup> while *Phialophora mustea* and *Cadophora malorum*. dominated in the second one.<sup>22</sup> In a third study conducted in China only *Penicillium vinaceum* was isolated from corms of *C. sativus* growing in the Changxing Island.<sup>12</sup> In our study the dominant endophytic fungi associated with saffron roots belonged to different genera and species than those reported in the previous studies. The striking differences in community composition



**Figure 1:** Antioxidant activity of EtOAc and CHCl<sub>3</sub> extracts of endophytic fungi isolated from the roots of *C. sativus* evaluated by the DPPH method. Data expressed as means ± standard deviation. Values with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).



**Figure 2:** Kinetics of the inhibition of  $\beta$ -carotene oxidation by EtOAc and CHCl<sub>3</sub> extracts of saffron endophytic fungi during the 48 h interval.



**Figure 3:** Antioxidant activity of EtOAc and CHCl<sub>3</sub> extracts of endophytic fungi isolated from saffron roots evaluated by the BCBT method. Data expressed as means ± standard deviation. Values with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

can be explained by the different organs examined in the different studies and/or by differences in the environment of studied areas that might harbor different fungi-saffron plants associations. These facts may also suggest that the degree of endophytic colonization reflect the degree of adaptation of the host to the biotic (potential mycobiota) and the abiotic (climate, etc) conditions of the site.<sup>23</sup>

Endophytic fungi from medicinal plants are important regarding their ability to produce a variety of bioactive compounds possibly those produced by their host plant.<sup>24</sup> In this study, we investigated the antioxidant and antibacterial capacity of saffron endophytic fungi extracts. The five Gram-negative and one Gram-positive bacteria tested were highly sensitive to the extracts of the three endophytic fungi tested. The extract of *Rhizopus oryzae* was the most bactericidal followed by those of *Aspergillus fumigatiaffinis* and *Aspergillus niger*. Our results were consistent with those reported for *Rhizopus* sp. isolated from the medicinal plants *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum*.<sup>25</sup> Other studies indicated that secondary metabolite compounds of *Aspergillus fumigatiaffinis* and *Aspergillus niger* possess antimicrobial activities.<sup>26-27</sup> The bioactive compounds of fungal endophytes tested showed an antibacterial effect against Gram-negative species despite the complex structure and arrangement of their cell wall compared to the Gram-positive bacteria.<sup>28</sup> This effect is probably due to the large number of bioactive compounds that can be found in endophytic fungi extracts exhibiting antibacterial activity such as chaetoglobosins A and C, pyrrolicidines A and B, ergosterol and 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxyergosterol, pestalochloride A and B, 3-O-methylalaternin and altersolanol A.<sup>29</sup>

Overall, the results showed that the antioxidant activity varies depending on the type of the test used. In the DPPH method, *Aspergillus niger* extract showed the highest antioxidant activity while it was *Rhizopus oryzae* extract in the BCBT method. The absence of significant correlation between the results obtained with both methods can be explained by the fact that the antioxidant activity can involve various mechanisms and different parameters.<sup>30</sup> Noting that DPPH method is the most known for the evaluation of free radical-scavenging activity because it is sample polarity-independent, very rapid, simple and reproducible.<sup>31</sup> Discrepancies between the two methods cannot affect the recognized efficacy of the bioactive antioxidant components of the endophytic fungi especially those of *Aspergillus niger*<sup>26</sup> and *Rhizopus oryzae*.<sup>32</sup>

On the other hand, the nature of the solvent used in the extraction process is crucial. In our study ethyl-acetate extracts exhibited the highest antioxidant activity. This result may be explained by the fact that the active components are not well dissolved out of the extracts when using chloroform as solvent, or and if so, a very small quantity is being extracted out which gives little or no effectivity. Another possibility is that the bioactive components have a polarity which is best extracted out by ethyl acetate among the solvent fractions.<sup>33</sup>

## CONCLUSION

In summary, roots of *C. sativus* collected from Taliouine in the south of Morocco harbor at least three species of endophytic fungi that possess not only an antibacterial activity against different bacteria tested but also an antioxidant activity. Our results suggest that the fungal endophytes of *C. sativus* could be an appropriate source of bioactive secondary metabolites.

## CONFLICT OF INTEREST

There are no conflicts of interest.



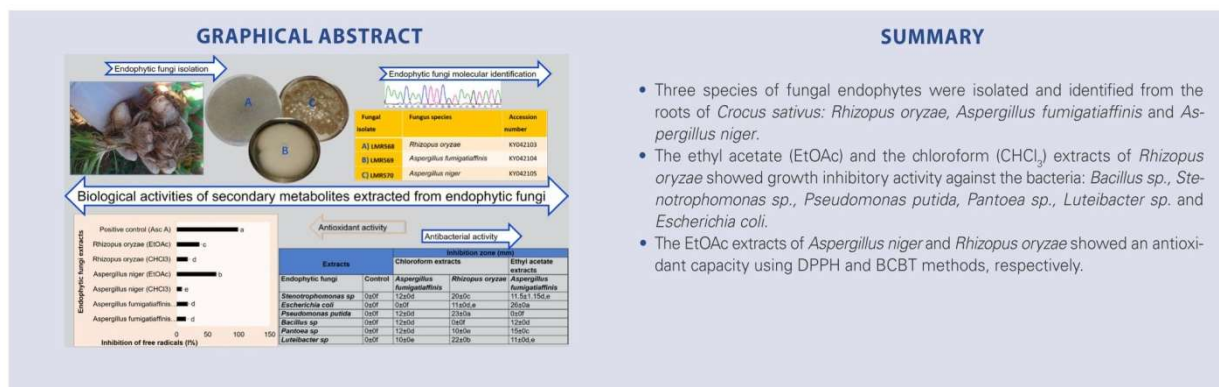
ABBREVIATIONS

PDA: Potato dextrose agar; PDB: Potato dextrose broth; LB: Luria-Bertani; TY: Tryptone Yeast; CFU: colony forming unit; EtOAc: Ethyl acetate; CHCl<sub>3</sub>: Chloroform; ITS: Internal transcribed spacer; DPPH: α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl; BCBT: β-Carotene bleaching test; Asc A: Ascorbic acid; BHT: butylhydroxytoluene; NCBI: National Center for Biotechnology Information.

REFERENCES

- Lu H, Zou WX, Meng JC, Hu J, Tan RX. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Sci*. 2000;151(1):67-73.
- Yang X, Strobel G, Stierle A, Hess WM, Lee J, Clardy J. A fungal endophyte-tree relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana*. *Plant Sci*. 1994;102(1):1-9.
- Vega FE, Posada F, Catherine Airme M, Pava-Ripoll M, Infante F, Rehner SA. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biol Control*. 2008;46(1):72-82.
- Priti V, Ramesha BT, Singh S, Ravikanth G, Ganeshiah KN, Suryanarayanan TS, et al. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites. *Curr Sci*. 2009;97(4):477-8.
- Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol*. 2009;182(2):314-30.
- Mishra M, Prasad R, Varma A. Endophytic fungi: biodiversity and functions. *Int J Pharm Bio Sci*. 2015;6(1):18-36.
- Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, Corke H, Sun M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. 2008 [cited 2018 Feb 15]; Available from: <http://hub.hku.hk/handle/10722/60713>
- Gresta F, Lombardo GM, Siracusa L, Ruberto G. Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. A review. *Agron Sustain Dev*. 2008;28(1):95-112.
- Bukhari SI, Manzoor M, Dhar MK. A comprehensive review of the pharmacological potential of *Crocus sativus* and its bioactive apocarotenoids. *Biomed Pharmacother*. 2018;98:733-45.
- Gresta F, Lombardo GM, Siracusa L, Ruberto G. Effect of mother corm dimension and sowing time on stigma yield, daughter corms and qualitative aspects of saffron (*Crocus sativus* L.) in a Mediterranean environment. *J Sci Food Agric*. 2008;88(77):1144-50.
- Lage M, Cantrell CL. Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. *Sci Hortic*. 2009;121(3):366-73.
- Zheng CJ, Li L, Zou J, Han T, Qin LP. Identification of a quinazoline alkaloid produced by *Penicillium vinaceum*, an endophytic fungus from *Crocus sativus*. *Pharm Biol*. 2012;50(2):129-33.
- Fernández DPA, Chiochio MV, Barrera V, Colombo RP, Martínez AE, Gasoni L, et al. Mycorrhizal fungi isolated from native terrestrial orchids of pristine regions in Córdoba (Argentina). *Rev Biol Trop*. 2015;63(1):275-83.
- Xu L, Zhou L, Zhao J, Li J, Li X, Wang J. Fungal endophytes from *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity. *Lett Appl Microbiol*. 2008;46(1):68-72.
- Barik BP, Tayung K, Jagadev PN, Dutta SK. Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. *EJBS*. 2010;2(1):8-16.
- Mohanta J, Tayung K, Mohapatra UB. Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three ethno-medicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *Internet J Microbiol*. 2008;5(2).

- Artur SJ, Monache FD, Smânia FA, Cuneo RS. Antibacterial activity of steroidal Compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphylophoromycetideae) Fruit Body. *IJM [Internet]*. 1999 [cited 2018 Feb 16];1. Available from: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/708ae68d64b17c52,541026cc01c467e3,6d7118b651c7a14.html>
- Oliveira DA, Salvador AA, Smânia A, Smânia EFA, Maraschin M, Ferreira SRS. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *J Biotechnol*. 2013;164(3):423-32.
- Wang L, Qiu P, Long XF, Zhang S, Zeng ZG, Tian YQ. Comparative analysis of chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activities of ethylacetate extracts of *Polygonum cuspidatum* and its endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. A0916. *Chin J Nat Med*. 2016;14(2):117-23.
- Liu X, Dong M, Chen X, Jiang M, Lv X, Yan G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chem*. 2007;105(2):548-54.
- Raj P, Khan SS, Modak M, Lone ZA, Rather SA, Yaqoob M. Biodiversity of endophytic fungi in saffron (*Crocus sativus*) and antimicrobial activity of their crude extract. *Indo Am J Pharm Res*. 2013;3:3702-13.
- Wani ZA, Mirza DN, Arora P, Riyaz-Ul-Hassan S. Molecular phylogeny, diversity, community structure, and plant growth promoting properties of fungal endophytes associated with the corms of saffron plant: An insight into the microbiome of *Crocus sativus* Linn. *Fungal Biol [Internet]*. 2016 [cited 2016 Nov 3]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614616300964>
- Hata K, Futai K. Variation in fungal endophyte populations in needles of the genus *Pinus*. *Can J Bot*. 1996;74(1):103-14.
- Jain P, Pundir RK. Diverse endophytic microflora of medicinal plants. In: *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants [Internet]*. Springer, Cham; 2015 [cited 2018 Feb 15]. p. 341–57. (Soil Biology). Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-13401-7\\_17](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-13401-7_17)
- Xing YM, Chen J, Cui JL, Chen XM, Guo SX. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thysiflorum* from Vietnam. *Curr Microbiol*. 2011;62(4):1218-24.
- Zhang H, Tang Y, Ruan C, Bai X. Bioactive secondary metabolites from the endophytic *Aspergillus* genus. *Rec Nat Prod*. 2016;10(1):1-16.
- Schuster E, Coleman N, Frisvad J, Dijk PV. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002;59(4-5):426-35.
- Lambert PA. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol*. 2002;92 Suppl:46S-54S.
- Bano N, Rizvi IF, Sharma N, Siddiqui MH, Kalim M, Khan A, et al. Production of bioactive secondary metabolites from endophytic fungi. *IRJET [Internet]*. 2016 [cited 2016 Nov 1];03. Available from: <https://www.irjet.net/archives/V3/i6/IRJET-V3i6343.pdf>
- Koleva II, Vanbeek TA, Linssen JPH, Groot A, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for Antioxidant Activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal*. 2002;13(1):8-17.
- Kartal N, Sokmen M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chem*. 2007;100(2):584-9.
- Peeran FM, Prasad L, Kamil D. Characterization of secondary metabolites from *Rhizopus oryzae* and its effect on plant pathogens. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2018;7(3):705-10.
- Ogundare AO, Adetuyi FC, Akinyosoye FA. Antimicrobial activities of *Vernonia tomoreana*. *Afr J Biotechnol [Internet]*. 2006 [cited 2018 Feb 11];5. Available from: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/55815>





## Synthèse

Les endophytes fongiques sont des microorganismes qui colonisent les tissus internes vivants des plantes sans provoquer d'effets négatifs, car ils demeurent dans (endo) la plante (phyton), de façon bénéfique invisible (Aly et al. 2010). Contrairement aux champignons parasites, qui provoquent des lésions au niveau de la plante d'où se libèrent des spores propageant la maladie à d'autres plantes. Selon Aly et al. (2010), dans de nombreux cas, la tolérance des plantes hôtes au stress biotique a été corrélée avec les produits naturels fongiques. La majorité des produits naturels produits par les microorganismes endophytiques se sont révélés avoir une activité antimicrobienne. En effet, ils ont été impliqués dans la protection de la plante hôte contre les microorganismes phytopathogènes (Aly et al. 2010). Ces métabolites montrent des activités cytotoxiques et antibactériennes (Hazalin et al. 2009) et se sont révélés être des sources prometteuses de nouveaux produits naturels et biologiquement actifs présentant un intérêt pour des applications médicales ou agrochimiques spécifiques (Strobel and Daisy 2003; Strobel 2002).

Cette étude rapporte l'isolement et la caractérisation moléculaire des champignons endophytes isolés à partir des racines de la plante du safran ainsi que l'examen de l'activité antibactérienne et antioxydante des métabolites secondaires extraits des endophytes isolés à l'aide de deux solvants organiques (l'acétate d'éthyle et le chloroforme). Soixante isolats fongiques ont été récupérés et purifiés à partir des segments de racines du safran et identifiés en utilisant l'analyse de la séquence de l'espaceur transcrit interne (ITS) du gène de l'ARNr. Les séquences des ITS étaient identiques à 99-100% à trois champignons endophytes différents: *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus fumigatiaffinis* et *Aspergillus niger*. *Rhizopus oryzae* était le plus abondant, suivi par *Aspergillus fumigatiaffinis* et *Aspergillus niger*. Cette étude est la première investigation des champignons endophytes du safran marocain. Tandis que dans le monde il n'existe que 3 études dans ce sens. Les études de Raj et al. (2013) et de Wani et al. (2016) ont déterminé que la structure de la communauté des endophytes fongiques associés au safran indien échantillonné dans 14 sites différents de culture du safran dans l'état de Jammu et du Cachemire est différente. Dans la première étude *Rhizoctonia sp* était le genre le plus abondant suivi de *Fusarium sp.* et *Phytophthora sp.*, tandis que *Phialophora mustea* et *Cadophora malorum* étaient dominant dans la seconde étude. Dans la troisième étude un seul champignon endophyte a été isolé du safran cultivé dans l'île de Changxing en Chine. Il a été identifié comme *Penicillium vinaceum* (Zheng et al. 2012). Selon nos résultats, les champignons endophytes dominants associés aux racines du safran dans la région de Taliouine-Maroc sont différents de ceux rapportés dans les

études précédentes. La différence dans la composition de la communauté peut s'expliquer par la différence d'environnement entre les zones étudiées qui pourraient abriter différentes populations des champignons endophytes associés à la plante. De plus, ces faits suggèrent que le degré de colonisation des endophytes pourrait refléter le degré d'adaptation de l'hôte aux conditions biotiques (mycobioties potentiels) et aux conditions abiotiques du site (climat...etc) (Hata and Futai 1996). Les champignons endophytes des plantes médicinales sont importants en raison de leur capacité à produire une variété de nouveaux composés bioactifs (Jain and Pundir 2015). Dans cette étude, deux activités biologiques ont été étudiées, l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne des métabolites secondaires extraits des champignons endophytes isolés des racines du safran. L'extraction a été effectuée par deux types de solvants organiques (l'acétate d'éthyle et le chloroforme). L'activité antibactérienne des extraits des trois champignons isolés du safran a été testée contre six bactéries (*Stenotrophomonas sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Pantoea sp.*, *Luteibacter sp.* et *Bacillus sp.*). Les résultats ont montré que toutes les bactéries présentaient une sensibilité élevée aux extraits des trois champignons endophytes testés. L'extrait de *Rhizopus oryzae* était le plus bactéricide, suivi par *Aspergillus fumigatiaffinis* et *Aspergillus niger*. Les composés bioactifs des champignons endophytes ont montré un effet antibactérien contre les espèces Gram-négatives malgré la structure complexe et l'arrangement de leur paroi cellulaire par rapport aux bactéries Gram positives (Lambert 2002). Cette activité inhibitrice peut-être due au grand nombre de composés bioactifs qui peuvent être trouvés dans les extraits de champignons comme les alcaloïdes (Chaetoglobosins A et C, Pyrrocidines A et B), les stéroïdes (ergostérol et 5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -épidioxyergostérol), les phénols (pestalachloride A et B), les quinones (3-O-méthylalternine et l'altersolanol A comme un accepteur d'électrons dans la membrane bactérienne et inhibe la croissance bactérienne) et des peptides (Leuesnostatine A, cryptocandine Cyclo (Pro-Thr) et cyclo (Pro-Tyr) (Yu et al. 2010 ; Bano et al. 2016). En plus de leur activité antimicrobienne, les champignons endophytes sont aussi de bonnes sources de nouveaux antioxydants comme la pestacine, l'isopestacine, l'hypéricine (2, 2'-diméthyl-4, 4', 5, 5', 7, 7'-hexahydroxy mesonaphthodianthrone) (Zhao et al. 2010;Bano et al. 2016). Les extraits de champignons endophytes isolés à partir des racines de *C. sativus* ont montré une activité antioxydante pour les deux méthodes utilisées. Les extraits d'*Aspergillus niger* présentent le pourcentage d'oxydation le plus élevé par rapport aux autres extraits quelle que soit la méthode utilisée mais restent inférieurs à ceux obtenus par Asc A et BHT (témoin positif) suivi par *Rhizopus oryzae* et *Aspergillus fumigatiaffinis*. Ceci indique que les composés phénoliques dans les champignons endophytes ont significativement contribué à leur activité antioxydante. Certains

composés antioxydants isolés de champignons endophytes comme la pestacine (Harper et al. 2003) et la graphislactone A (Song et al. 2005) présentaient de fortes activités de piégeage des radicaux libres et d'antioxydants en utilisant des tests *in vitro*. En même temps, les résultats obtenus à partir d'essais d'antioxydants ont montré que les extraits d'acétate d'éthyle présentaient l'activité antioxydante la plus élevée. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les composants actifs ne sont pas bien dissous dans les extraits obtenus en utilisant le chloroforme comme solvant ou bien l'extraction donne lieu à une très faible quantité de produit(s) actif(s), ce qui donne peu ou pas d'efficacité. Une autre possibilité est que les composants bioactifs aient une polarité mieux extraite par l'acétate d'éthyle (Ogundare et al. 2006). D'autre part, les résultats globaux de l'activité antioxydante montrent que cette activité varie en fonction du type de test utilisé. Selon Koleva et al. (2002), il n'y a pas d'association significative entre la méthode DPPH et la méthode BCBT car l'activité antioxydante a été attribuée à divers mécanismes et paramètres différents. Notons que la méthode DPPH est la plus connue pour l'évaluation de l'activité de piégeage des radicaux libres parce qu'elle est indépendante de la polarité de l'échantillon, très rapide, simple et reproductible (Kartal et al. 2007).

## Conclusion

En résumé, les racines de *C. sativus* collectées à Taliouine dans le sud du Maroc abritent au moins trois espèces de champignons endophytes *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus fumigatiiformis* et *Aspergillus niger*, qui possèdent non seulement une activité antibactérienne contre différentes bactéries testées, mais aussi une activité antioxydante. Les extraits d'acétate d'éthyle (EtOAc) et du chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) de *Rhizopus oryzae* ont montré une activité inhibitrice de la croissance des bactéries de type *Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas putida*, *Pantoea* sp., *Luteibacter* sp. Et *Escherichia coli*. Les extraits d'EtOAc d'*Aspergillus niger* et de *Rhizopus oryzae* ont montré une capacité antioxydante en utilisant respectivement les méthodes DPPH et BCBT. Nos résultats suggèrent que les endophytes fongiques de *C. sativus* pourraient constituer une source intéressante de métabolites secondaires bioactifs.

*Article 3*

**Isolation, identification and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria associated to roots of saffron (*Crocus sativus* L.)**

**Identification moléculaire et l'évaluation des activités biologiques des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) isolées de la rhizosphère du safran (*Crocus sativus* L.)**

CHAMKHI Imane, SBABOU Laila and AURAG Jamal

## Introduction - objectif

Le safran est l'une des cultures alternatives les plus intéressantes, en particulier pour l'environnement méditerranéen, où le climat chaud et sec de l'été qui empêche la propagation des maladies et des pathogènes (Gresta et al, 2008). La relance de la production de safran nécessite des études de recherche, une amélioration des connaissances et une action synergique entre les informations scientifiques et empiriques. L'intensification de l'utilisation des intrants chimiques comme les fertilisants chimiques et les pesticides provoquent une pollution massive de l'environnement et réduit la productivité du safran (Alidadi et al. 2013). La fertilisation biologique ou naturelle augmente considérablement les paramètres de rendement du safran (poids frais/sec du stigmate, poids frais des fleurs et longueur du stigmate) (Sharaf-Eldin et al., 2007; Amiri 2008). Parmi les fertilisants biologiques les plus en vogue se trouvent les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR), qui peuvent faciliter la croissance des plantes indirectement ou directement. Il existe plusieurs voies à travers lesquelles ces bactéries favorisent la croissance des plantes (Masciarelli et al. 2014). A cet effet une connaissance approfondie du sol, de sa microflore et de son fonctionnement s'avèrent nécessaires afin de mieux préserver cet environnement particulier et décider des meilleures approches d'intervention possibles. Ce niveau de connaissance est possible aujourd'hui avec le développement des techniques de séquençage massif et de métagénomique, qui permettent d'accéder à un niveau de connaissance très approfondi de la diversité taxonomique et fonctionnelle des populations microbiennes présentes dans le sol, de leur rôle dans le biofonctionnement de ce dernier (cycles biogéochimiques, pathogénicité, bioprotection, biostimulation,...) et de leurs interactions multiples (entre elles, avec les milieux physique et/ou vivant).

Il y a peu d'études sur les PGPR isolées de la rhizosphère du safran dans le monde et il n'y a pas d'étude au Maroc. Ce travail représente la première étude du safran marocain localisé dans la région de Taliouine-Taznakht, une zone connue pour la production du safran de qualité au Maroc. L'objectif du présent travail était l'isolement, l'identification et la caractérisation de ces bactéries qui n'ont jamais été étudiées à notre connaissance. Ce projet s'intéresse essentiellement aux bactéries de type PGPR qui peuvent avoir un effet positif sur la croissance et la qualité du safran (biostimulation et biofertilisation). Les caractères favorisant la croissance des plantes ont été évalués en déterminant la solubilisation du phosphate inorganique, la biosynthèse de l'auxine, la production de sidérophores et la fixation biologique de l'azote. Les

meilleurs isolats seront utilisés plus tard pour les applications sur le terrain comme inocula pour la fertilisation au safran.

Article 3

**Isolation, identification and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria associated to roots of saffron (*Crocus sativus* L.)**

CHAMKHI<sup>1</sup> Imane, SBABOU<sup>1</sup> Laila and AURAG<sup>1\*</sup> Jamal

<sup>1</sup>*Microbiology and Molecular Biology Team, Center of Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University of Rabat, Avenue Ibn Battouta, BP 1014, Rabat 10000, Morocco*

**Abstract**

The cultivation of *Crocus sativus* L. (saffron) is of particular interest in view of the sale of this spice on the world market. Indeed, it is a very popular product throughout the world, especially for its culinary and medicinal virtues. In order to maintain the quality of the product, the organic production method without chemical inputs must be maintained and strengthened by the application of organic fertilizers and biofertilizers based on beneficial micro-organisms capable of boosting the productivity of the plantations. In this context, a better knowledge of the microbial populations of the rhizosphere of saffron is needed. To do this, we first isolated, identified and characterized the putative beneficial rhizobacteria associated with saffron (PGPR). A collection of 89 bacteria were isolated on different media from rhizospheric soils sampled in saffron fields of the Taliouine-Taznakht region (Morocco). The evaluation of the plant growth promoting traits (PGP) of these isolates showed that most of them possessed one or more PGP activity, such as inorganic phosphate solubilization, auxin production, siderophore production and biological nitrogen fixation. Molecular identification of the isolates by 16S rDNA gene sequencing, revealed eight genera: *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Variovorax*, *Delftia*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Luteibacter* and *Pantoea*. *Pseudomonas* was the most abundant genus. The isolates with higher levels of PGP activities, will be used for the conception of bacterial biofertilizers that will be applied in saffron field inoculation trials.

**Keywords:** *Crocus sativus* L. (saffron), PGPR, PGP traits, molecular identification, biofertilizers.

## Introduction

The saffron is one of the rare and most expensive spices in the world, it consists in dehydrated stigmas of flowers of a bulbous plant named *Crocus sativus* L. (Crozet et al. 2012). Almost 180000 flowers are needed for 1kg of dry saffron (Mir et al. 2011). Saffron is recognized since antiquity for its beneficial medical effects. Recent studies showed the strong effect of the saffron against depression (Hausenblas et al. 2013), cancer (Samarghandian et al. 2013), in addition to immunological, antioxidizing, anti-tumoral activities (Bolhassani et al. 2014) and a potential therapy for Alzheimer's disease (Finley & Gao 2017). It contains a large number primary metabolites, such as carbohydrates, minerals, fats and vitamins (Sampathu et al. 1984) and large number of components belonging to different classes of secondary metabolites, such as carotenoids, monoterpenoids, flavonoids and anthocyanins (Dhar et al. 2017). The molecules of saffron related to the color (crocin), the flavor (picrocrocin) and the aroma (safranal) make saffron usable in cosmetics, perfume and textile manufacturing industries. These metabolites are the essential parameters used in the determination of the category of the saffron according to the standard ISO 3632.

*C. sativus* belongs to the *Iridaceae* family, it's a sterile geophyte plant, which can reproduce only by the vegetative multiplication of corms (Mir et al. 2010). It requires a particular combination of climatic, edaphic and hydric factors for flowering (Gresta et al. 2009). Saffron is a perennial crop culture adapted to the semi-arid and arid areas, in temperate climates and subtropical climates, however, the Mediterranean area is recognized all over the world as being the best region for the production of good quality saffron (Lage and Cantrell 2009). Traditional producers are mainly Spain, Iran, India, Pakistan, Turkey, Italy, Switzerland, Greece, Central Asia and Morocco (Gresta et al. 2008). The world production of saffron is estimated at approximately 300 tons a year and is dominated by Spain and Iran, with the later producing approximately 76 % of the total (Jalali-Heravi et al., 2010; Samarghandian et al., 2013).

An increase of saffron productivity is desirable, but must be sustainable and environmentally friendly. The use of chemical fertilizers at high rates is responsible of massive pollution of soils and reduces saffron productivity (Moghadam et al. 2013). Compared to chemical fertilizers, the organic matter such as composted cattle manure can have positive effects on saffron plants (Koocheki and Seyyedi 2015). In this context, fertilization with natural manure increases significantly yield parameters of saffron (flower fresh weight, stigma length, stigma fresh and dry weights) (Amiri 2008; Koocheki and Seyyedi 2015).



Use of microbial biofertilizers is another interesting alternative to chemical fertilizers. At this respect, the studies of Sharaf-Eldin et al., (2007) proved that *C. sativus* inoculation with the PGPR strain *Bacillus subtilis* FZB24 has the potential to improve saffron metabolites quality, boost the length of the leaves, the number of flowers, the biomass of stigmas and decrease significantly the time required for the seeding of corms. PGPR strains are known to colonize the rhizosphere, where they insure several functions that improve and stimulate plants growth and increase their yield. Generally they produce phytohormones: Auxin (*Indole-3-acetic acid* (IAA)), gibberellins (Kang et al. 2014), cytokinins (Timmusk et al. 1999) and/or abscissic acid (Porcel et al. 2014). Some PGPR strains can solubilize some insoluble elements in the soil such as phosphate and others produce siderophores for the chelation of insoluble iron (Kang et al. 2014). Some PGPR strains are implicated in plants protection by different mechanisms such as antibiosis, competition for the space and the nutrients, induction of plants resistance to a broad-spectrum of foliar and roots pathogens and other harmful microorganisms in the rhizosphere (Singh et al. 2011).

There are only few studies concerning PGPRs isolated from the rhizosphere of saffron and no one in Morocco, where high quality saffron is produced specially in the area of Taliouine-Taznakht. The objectives of the present work were the isolation, molecular identification and evaluation of the plant growth promoting activities of the rhizobacteria associated with saffron. The main PGP traits studied were inorganic phosphate solubilization, biosynthesis of auxin, siderophore production, and biological nitrogen fixation. The most performing isolates will be used later for field applications as inoculums for saffron biofertilization.

## **Material and Methods**

### **Sample collection and soil physicochemical analysis**

Saffron soil was collected from a field of saffron in “1.2.3 SAFRAN” farm in Taliouine-Talakhat area located in the South of the province of Taroudant, Souss-Massa region Morocco (N30°28'12.997"/W7°46'22.479"). Soil samples were sent for analyses to «Laboratoire des Moyens Analytiques de l'Institut de Recherche pour le Développement» (LAMA, IRD, Dakar, Senegal) for the physico-chemical analysis like pH, total organic carbon, total nitrogen, etc. Samples of saffron rhizospheric soil were kept at +4°C until they were used for isolation of rhizobacteria.

### **Isolation of rhizobacterial strains**

In order to increase the probability of obtaining rhizobacteria possessing the most important PGP traits we used three specific solid media for bacteria isolation. Phosphate solubilizing

bacteria were obtained on modified *Pikovskaya's medium (PVK)* (Pikovskaya 1948)(1 glucose, 0.02 g KCl, 0.01 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.002 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.002 g MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 4 ml bromophenol blue, 0.5 g natural phosphate, 0.01 g yeast extract, 15 g agar, with pH adjusted to 6.7). Siderophore producing bacteria were isolated on Modi medium (Berraho et al., 1997), while auxin producing isolates were obtained on Yeast Extract Mannitol medium (Vincent 1970) supplemented with tryptophan (YEM-Try) (5 g/l Mannitol, 1 g/l yeast extract, 0.46 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3H<sub>2</sub>O, 0.12 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g/l MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/l NaCl, 1 L distilled water and 0.5 mg/ml of tryptophan). *Rhizospheric soil samples* were processed and diluted serially in physiological water (Becerra-Castro et al. 2012). Petri dishes of each medium were spiked with 0.1 ml of each soil dilution and incubated at 28 °C for 48 hours. Colonies obtained were purified and stored at -80°C in 40 % glycerol.

### **Evaluation of PGP activities**

#### ***Auxin production***

Salkowski colorimetric method is the most used to quantify *in vitro* indolic acid biosynthetic capacity of the isolates. Liquid pre-cultures of isolates are inoculated to liquid YEM-tryptophan medium and then incubated at 28 °C for 24 hours. Two ml of each culture were centrifuged at 12000 rpm for 10 min, the supernatants were recuperated and filtered through a sterile nylon membrane of 0.2 µm (Millipore) following the method of Glickmann and Dessaux (1995).

#### ***Siderophore production***

To highlight siderophore production by saffron isolates, the method of Schwyn and Neilands (1987) was used. Fifty ml of liquid Modi medium was inoculated with fresh culture of the isolates (initial optical density equal 0.1), then incubated at 28 °C in the Shaker-Incubator at 180 rpm/min. After 7 days of incubation, 10 ml of culture were centrifuged at 10000 rpm for 20 min. The supernatants were filtered on a nylon membrane of 0.45 µm (Millipore) (Khan et al. 2006). Three ml of supernatant were added to 3ml of reagent CAS then were incubated in the dark between a minute until 24 h (Berraho et al., 1997). Siderophore production was indicated by the time when CAS reagent color changed from blue to orange. A semi-estimation of siderophores produced by the best isolates was estimated spectrophotometrically at 630 nm by calculating the ratio A/Ar (He et al. 2013).

#### ***Phosphate solubilization***

Qualitative test of phosphate solubilizing activity of the isolates was carried out on modified Pikovaskaya agar medium. Ten µl of each bacterial suspension were dispensed into the center of Petri dishes containing the medium, incubated for 3 days at 28 °C (Xie et al., 2009). The presence of a clearing zone around bacterial colonies (halo zone) is an indicator for positive

phosphate solubilization. Quantitative estimation of phosphate solubilization was studied in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of liquid PVK medium previously inoculated with fresh precultures of each strain. After incubation for 48h at 28 °C in the Shaker-Incubator at 185 rpm/min, 2 ml of the culture was centrifuged and the pH of the culture determined. Soluble phosphorus concentrations were measured using a spectrophotometer at 400 nm by the vanadate-molybdate method (Tandon et al. 1968).

### ***Screening for strains possessing multi-PGP traits***

Each strain isolated on a specific medium was cultivated on the other media in order to determine if it has the other beneficial traits. Similar protocols to those described before were used.

Atmospheric nitrogen fixation by saffron isolates was also studied by inoculating plates containing NFb medium with or without the addition of NH<sub>4</sub>Cl. Plates were incubated at 28 °C for 7 days (Zhou et al. 2013).

### **Molecular Identification**

#### ***DNA extraction and PCR amplification***

After the extraction of the genomic DNA (Moulin et al. 2004), the quality and quantity of DNA in the samples were checked on a 0.8% agarose gel and using Nanodrop spectrophotometer. PCR amplification of partial nucleotide sequences of 16S rRNA gene was performed by using the universal primers 1488 (CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC)/41F (GCTCAGATTGAACGCTGG CG) and MyTaq TM HSMix (Bioline, London, UK) in 25 µl final volume. The PCR program used was as follows: initial denaturation for 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 40 s, annealing at 64 °C for 45 s and extension at 72 °C for 1 min 30 s. Purified PCR products were then sequenced in both senses by using 1488 and 41F primers at Genoscreen compagny, Lille, France.

#### ***Construction of phylogenetic trees***

The sequences of sense 1488 were converted in inverse complement ([http:// www. Bioinformatics .org /sms /revcomp.html](http://www.Bioinformatics.org/sms/revcomp.html)), then aligned with the sequences of sense 41F by the online software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Sequence identities and similarities were determined using the BLAST program and the GenBank database on the NCBI. All sequences were deposited in GenBank under accession numbers. The phylogenetic tree was constructed from the ClustalX results and the Maximum Like-hood test with Kimura 2-parameter model by using a MEGA5 program. The bootstrap method was used as the phylogeny test. Reference sequences were added to optimize the comparison.

## **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed by XLSTAT program (version 2014.5.03). With a one-way ANOVA and compared by Fisher's Least Significant Difference (LSD) with a 5 % probability threshold to determine differences between means. The correspondence analysis (CA) as an exploratory data analysis technique was performed by XLSTAT software.

## **Results**

### **Physico-chemical soil characteristics**

The analyses revealed that the saffron soil studied is a sandy clay loam according to the USDA texture classification and a Luvisol according to the WRB soil classification. It's an alkaline soil with a low percentage of nitrogen (0.04%) and total carbon (0.89%), a high C/N ratio (22), and a very low amount of available phosphorus (18 mg/kg). All these parameters are indicators of low soil fertility (Table 1).

### **Isolation of bacterial strains**

A collection of 89 isolates was obtained from rhizospheric soil of saffron by using 3 selective media PVK, Modi and YEM-try. Among them 34 isolates were obtained on PVK medium (38.20 %), 22 isolates on Modi medium (24.71%) and 33 isolates on YEM-try medium (37.1%).

### **Evaluation for PGP activities**

#### **Auxin production**

The colorimetric method of Salkowsky demonstrated that the 33 YEM-try isolates tested produced different amounts of IAA ranging from 124.36 µg/ml to 8.27 µg/ml (Figure 1). The best auxin producing strains were S11A1a and S11A4 with respectively  $124.23 \pm 4.0$  µg/ml and  $86.92 \pm 8.2$  µg/ml.

#### **Siderophore production**

Production of siderophores by the bacteria in liquid Modi medium that does not contain iron was revealed by the chrome-azurol S reagent (CAS). Modi isolates can be categorized into 3 groups according to the time of CAS reagent color change from blue to orange (Table 2). Among the isolates tested 22 produced siderophores. The best ones are strains S12S1, S12S2, S12S3, S12S4, S12S5, S12S6, S13S1, S13S2, S13S3 and S13S4. The semi-quantitative method applied to the 9 best strains by calculating the ratio  $A/A_{ref}$  classified the four best strains in descending order of siderophore production as follows: S12S4, S12S1, S12S6, S13S1 and S12S5.

### Phosphate solubilization

The qualitative test of phosphate solubilization revealed that almost all the saffron rhizobacteria were surrounded by transparent halos on PVK solid medium which indicates the capacity of these bacteria to solubilize rock phosphate *in vitro*. The halo of phosphate solubilization is caused by the production of organic acids in the medium which turns the color of the bromophenol blue from mauve towards white/yellow. As a result, the strains S13P4 (19 mm), S12P9 (17 mm) and S13P11 (13 mm) have the biggest halo diameter size on Pikovskaya medium (Figure 2). The quantification of soluble phosphate released by 34 PVK isolates confirmed that all of the tested bacteria possessed the ability to solubilize inorganic phosphate (Figure 3). The measured concentrations were very close to each other for the majority of isolates, with the high amount of soluble phosphate released by strains S11P7 ( $42.2 \pm 0.85$  mg/l) and S11P1 ( $38.2 \pm 3.35$  mg/l). Production of soluble phosphate from rock phosphate was concomitant with a significant drop in the pH of the culture medium (Figure 3).

### Screening for strains possessing multi-PGP traits

Results shown in table 3 indicate that the production IAA was significantly different between the isolates of the whole collection. Globally 22.5% of the isolates produced high quantities of IAA, 27% of isolates produced medium amounts of IAA and 38% and 12.5% of isolates produced respectively low and very low amounts of IAA. As shown in table 3, the strains S11S2, S11A1a, S11P12, S13S3 and S13S2 were the best producers of IAA with concentrations ranging from  $125.28 \pm 5.4$  to  $96.75 \pm 5.8$ . Interestingly most of the best auxin producers were isolated on PVK and MODI media.

Among the whole bacterial collection 48% produced highly amounts of siderophores while 23% were moderate producers. Weak siderophore producers constitute 10% of the collection and only 19% of the isolates were unable to produce these chelators. The strains S11P12, S11A11b, S11A10a and S12S1 were the best siderophore producing isolates according to the ratio  $A/A_{ref}$ . Concerning phosphate solubilization, our results confirm the effectiveness of this PVK medium to select the P solubilizers. Effectively bacteria isolated on PVK medium were the best isolates solubilizing natural phosphate rock. En general and considering the whole bacterial collection, 32.58% solubilized rock phosphate strongly, 13.48% were moderate P solubilizers and 53.93% solubilized weakly rock phosphate.

Results obtained of the biological nitrogen fixation test showed that only 11% of the isolates had a high capacity of nitrogen fixation, 39% showed a medium capacity of nitrogen fixation, while 34% were low nitrogen fixers and 16% were unable to fix nitrogen (Table 3).

### Molecular identification

The 16S rRNA gene sequences obtained were analyzed using bioinformatic tools (Figure 4). Bacterial isolates belonged to 13 different bacterial species namely *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas sp.*, *Rahnella aquatilis*, *Variovorax paradoxus*, *Bacillus simplex*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium radiobacter*(*Agrobacterium tumefaciens*), *Rhizobium rhizogenes*, *Pantoea sp.*, *Luteibacter sp.*, *Delftia sp.*, and *Rhizobium sp.* GenBank accession numbers (KU569610-KU569698) are given in Table 3. Among the 8 genera identified, *Pseudomonas* is the predominant genus with 34.83%, followed by the genus *Rahnella* with 24.71%, *Variovorax* with 15.73% and *Delftia* with 11.23%. The other genera are weakly represented in the saffron rhizosphere.

### Correspondence analyses

The analyses showed a relationship between the biological activities and the genera of the isolated bacteria. At this respect genera *Luteibacter*, *Pantoea*, and *Rahnella* presented the ability of solubilizing inorganic phosphate (Figure 5A), while *Rahnella* and *Pantoea* were the best producers of auxin (Figure 5B). Five genera, *Variovorax*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Luteibacter*, and *Pantoea*, are siderophore producers (Figure 5C), while biological nitrogen fixers were found among two genera, *Rhizobium* and *Rahnella* (Figure 5D).

### Discussion

According to the soil physico-chemical analysis performed, saffron soil in Taliouine is very poor in organic matter and mineral elements including nitrogen and available phosphorus. At the opposite the C/N ratio is high, which indicate a low mineralization that can be a result of a reduced biological activity caused by a limited microbial population. Additionally, soil pH is alkaline, which can affect the availability of nutrient elements for plants, such as phosphorus and iron, especially regarding the high calcium content of the soil. These results indicate that this soil need diverse amendments to improve the microbial activity and consequently its fertility and requires also phosphate fertilization to ensure good growth and yields of plants. In this context beneficial microorganisms such as PGPR and arbuscular mycorrhizal fungi can have an important role in restoring soil fertility and bringing mineral nutrients to plants in order to enhance crops growth and yield.

For this reason it was important to identify, for the first time in Morocco, the rhizospheric bacteria colonizing saffron rhizosphere in the main production area and evaluate their potential beneficial activities for plant growth. A collection of 89 isolates were obtained from the rhizosphere of saffron by using 3 selective media PVK, Modi and YEM-try and their potential plants growth beneficial activities were analyzed.

Biosynthesis of auxin is one of the most interesting properties of the PGPR, which influences the growth of plants at different levels (Vanneste and Friml 2009). All saffron isolates of the collection were able to produce auxin not only those isolated initially on YEM-try medium, but the amounts produced by the 89 strains varied significantly. The best auxin producers were S11S2, S11A1a and S11P12 and they produced significantly the same amount of auxin. Interestingly they were isolated on the three different media used, respectively Modi, YEM-try and PVK. At the level of the whole rhizobacterial collection it is interesting to highlight that the higher amounts of IAA were not produced specially by the bacteria isolated on YEM-try medium, which was used to favor the growth of isolates using tryptophan as a precursor of auxin. It is widely accepted that the *tryptophan-dependent* auxin biosynthesis pathway is the most important among the six metabolic routes known in bacteria (Cassán et al. 2014). In natural conditions tryptophan is an exometabolite supplied richly by root exudates stimulated by rhizobacteria (Kravchenko et al. 2004). In general our results are in accordance with those of Parray et al. (2013), who found that almost 83.33% of the strains isolated from the rhizosphere of saffron growing in India were able to synthesize auxin. Similar results were reported by Leinhos and Vacek (1994), who found additionally that approximately 80% of the phosphate-solubilizing bacteria strains they tested were able to synthesize auxin in a liquid culture medium, but not all of the isolates producing IAA were able to solubilize phosphate strongly. Similar results were found in the present study. Strains isolated on PVK medium are the best bacteria solubilizing natural phosphate and also produced important amounts of auxin. As found by many authors, the concentration of free phosphate measured increased proportionally with the decrease of the pH in the culture medium. This decrease is thought to be responsible of the dissolution of phosphate in the culture medium. It may be caused by the biosynthesis of different organic acids that have a relevant role in P solubilization, like oxalic, citric, gluconic acids and other organic acids that were commonly found in the media where phosphate solubilizing bacteria were grown (Rashid et al. 2004).

In addition to phosphate solubilization, the majority of isolated PGPR tested possess the ability to fix atmospheric nitrogen and part of them may be good nitrogen fixers (11.23%). Regarding the scarcity of nitrogen in the soils of Taliouine, diazotrophs may have an important role during cultivation of saffron plants because of their beneficial effect on the yield on flowers and quality of the saffron (Ünal and Çavuşoğlu, 2005).

Production of siderophores by isolated bacteria was evaluated on the strict minimal medium Modi. The majority of the isolates tested showed relatively low growth on this medium but overproduced siderophores. Induction of such activity may be assigned to the mannitol used as



carbon source that is metabolized via an aerobic pathway requiring iron-containing enzymes (Berraho et al., 1997). Many other metal ions found in natural environments can potentially affect siderophore production (Berraho et al., 1997). Among the whole rhizobacterial collection, strains isolated on the selective medium Modi were the most productive strains of siderophores. These bacteria may play an important role in the soils of Taliouine. In fact, in addition to their role in the iron nutrition of rhizobacteria and probably their associated plants, rhizobacterial siderophores may play an important role in the biocontrol of rhizospheric pathogens that can affect plants in general and saffron in particular (Kour et al. 2018).

The population of rhizospheric bacteria associated with saffron plants in Taliouine were identified by using 16S rDNA sequencing. There are very restricted number of studies dealing with this aspect in countries producing saffron, especially India (Parray et al., 2013; Ambardar and Vakhlu, 2013; Ambardar et al., 2014 ; Kour et al. 2018) and Iran (Al-Ahmadi et al. 2017), and this is the first one in Morocco. As found in India, the rhizosphere of Moroccan saffron is colonized predominantly by Gram-negative bacteria belonging to genera *Pseudomonas* and *Pantoea*. Moreover *Pseudomonads* are the most dominant genera in saffron rhizosphere. Rouatt and Katznelson, (1961) suggested that the preponderance of *Pseudomonads* in the root zone is due to at least three factors which may operate singly or together depending on environmental conditions: their rapid growth, their ability to produce acidic substances, and to elaborate fluorescent pigments that are siderophores giving a competitive advantage to this genera over the other rhizospheric microorganisms. Thus, due to their PGP properties these bacteria become the most important component of the microbial population surrounding the roots of young, healthy plants. Additionally interesting bacteria for the plants are chemically attracted to the root exudates and are selected over other microbes (Saharan & Nehra 2011).

*Rhizobium* and *Agrobacterium tumefaciens* were identified in the rhizosphere of saffron. Both genera belong to the *Rhizobiaceae* family the contains bacteria able to induce nodules in legumes as well as bacteria able to produce hairy roots or plant tumors, named *Rhizobium* and *Agrobacterium*, respectively (Velázquez et al. 2005). Classification of these bacteria is changing constantly. Young et al. (2001) proposed that *Agrobacterium tumefaciens* become *Rhizobium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes* become *Rhizobium rhizogenes*. Kanvinde & Sastry (1999) demonstrated that *Rhizobium radiobacter* is a diazotrophic bacterium that can fix nitrogen in free living conditions. In our study both genera were positive for growing in the BNF medium.

All the rhizobacteria isolated from the saffron demonstrated at least one plant growth property. However some strains had various PGP traits and even demonstrated high levels of activities

like some strains of *Pantoea* and *Rahnella*. They showed maximum production of auxin, siderophores, and soluble phosphate. *Pantoea* and *Rahnella* are known to induce increased growth of various crops through production of growth-regulating factors. They have no preference for crop plants or weeds, or for annual or perennial plants, and can be successfully applied to plants (Dobbelaere et al. 2001; del Amor et al., 2008; Vyas et al., 2010). Also, the genus *Variovorax* showed maximum siderophores production and biological nitrogen fixation which is confirming that it belongs to the PGPR group (Han et al., 2011). The genus *Luteibacter* was proposed as PGPR by Guglielmetti et al. (2013). Moreover they showed that *L. rhizovicinus* has the ability to produce molecules able to chelate ferric ions and solubilize monocalcium phosphate. The strains of *Luteibacter* isolated from saffron in our study show maximum siderophores production and phosphate solubilization.

In conclusion, this explorative study of the rhizosphere of Moroccan saffron has revealed the diversity of the rhizospheric bacteria associated with this plant at the genetic and functional levels. The promising results found allow us to consider the use of selected strains from this collection as biofertilizers in the field to improve saffron growth, yield and quality. They can be also used for other plants, which can lead to a sustainable agriculture that provides a way to replace, at least partially, the use of chemical fertilizers and pesticides known for their adverse effects on the environment and health.

## REFERENCES

- Al-Ahmadi MJ, Mohammadi A, Kohabadi ES. 2017. Characterization of Bacteria Isolated from the Saffron (*Crocus sativus* L.) Rhizosphere. *J Hortic Res.* 25:5–14.
- Ambardar S, Sangwan N, Manjula A, Rajendhran J, Gunasekaran P, Lal R, Vakhlu J. 2014. Identification of bacteria associated with underground parts of *Crocus sativus* by 16S rRNA gene targeted metagenomic approach. *World J Microbiol Biotechnol.* 30:2701–2709.
- Ambardar S, Vakhlu J. 2013. Plant growth promoting bacteria from *Crocus sativus* rhizosphere. *World J Microbiol Biotechnol.* 29:2271–2279.
- Amiri ME. 2008. Impact of animal manures and chemical fertilizers on yield components of saffron (*Crocus sativus* L.). *Am-Eurasian J Agric Environ Sci.* 4:274–279.
- Amor FM, Serrano-Martínez A, Fortea MI, Legua P, Núñez-Delicado E. 2008. The effect of plant-associative bacteria (*Azospirillum* and *Pantoea*) on the fruit quality of sweet pepper under limited nitrogen supply. *Sci Hortic.* 117:191–196.
- Becerra-Castro C, Monterroso C, Prieto-Fernández A, Rodríguez-Lamas L, Loureiro-Viñas M, Acea MJ, Kidd PS. 2012. Pseudometallophytes colonising Pb/Zn mine tailings: a

- description of the plant-microorganism-rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. *J Hazard Mater.* 217–218:350–359.
- Berraho E, Lesueur D, Diem HG, Sasson A. 1997. Iron requirement and siderophore production in *Rhizobium ciceri* during growth on an iron-deficient medium. *World J Microbiol Biotechnol.* 13:501–510.
- Bolhassani A, Khavari A, Bathaie SZ. 2014. Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* 1845:20–30.
- Cassán F, Vanderleyden J, Spaepen S. 2014. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *J Plant Growth Regul.* 33:440–459.
- Crozet A, Sus-Rousset H de, Durfort S-J de. 2012. *Crocus sativus* L. (*Iridaceae*), le safran (I). *Phytothérapie.* 10:121–125.
- Dhar MK, Sharma M, Bhat A, Chrungoo NK, Kaul S. 2017. Functional genomics of apocarotenoids in saffron: insights from chemistry, molecular biology and therapeutic applications. *Brief Funct Genomics* [Internet]. [cited 2017 May 21]. Available from: <https://academic.oup.com/bfg/article-abstract/doi/10.1093/bfgp/elx003/3091754/Functional-genomics-of-apocarotenoids-in-saffron>
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Funct Plant Biol* 28:871–879. doi: 10.1071/pp01074
- Finley JW, Gao S. 2017. A Perspective on *Crocus sativus* L. (Saffron) Constituent Crocin: A Potent Water-Soluble Antioxidant and Potential Therapy for Alzheimer’s Disease. *J Agric Food Chem.* 65:1005–1020.
- Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD (2004) Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol* 42:243–270. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455
- Glickmann E, Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 61:793–796.
- Gresta F, Avola G, Lombardo GM, Siracusa L, Ruberto G. 2009. Analysis of flowering, stigmas yield and qualitative traits of saffron (*Crocus sativus* L.) as affected by environmental conditions. *Sci Hortic.* 119:320–324.
- Gresta F, Lombardo GM, Siracusa L, Ruberto G. 2008. Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. A review. *Agron Sustain Dev.* 28:95–112.
- Guglielmetti S, Basilico R, Taverniti V, Arioli S, Piagnani C, Bernacchi A. 2013. *Luteibacter rhizovicinus*MIMR1 promotes root development in barley (*Hordeum vulgare* L.) under laboratory conditions. *World J Microbiol Biotechnol.* 29:2025–2032.

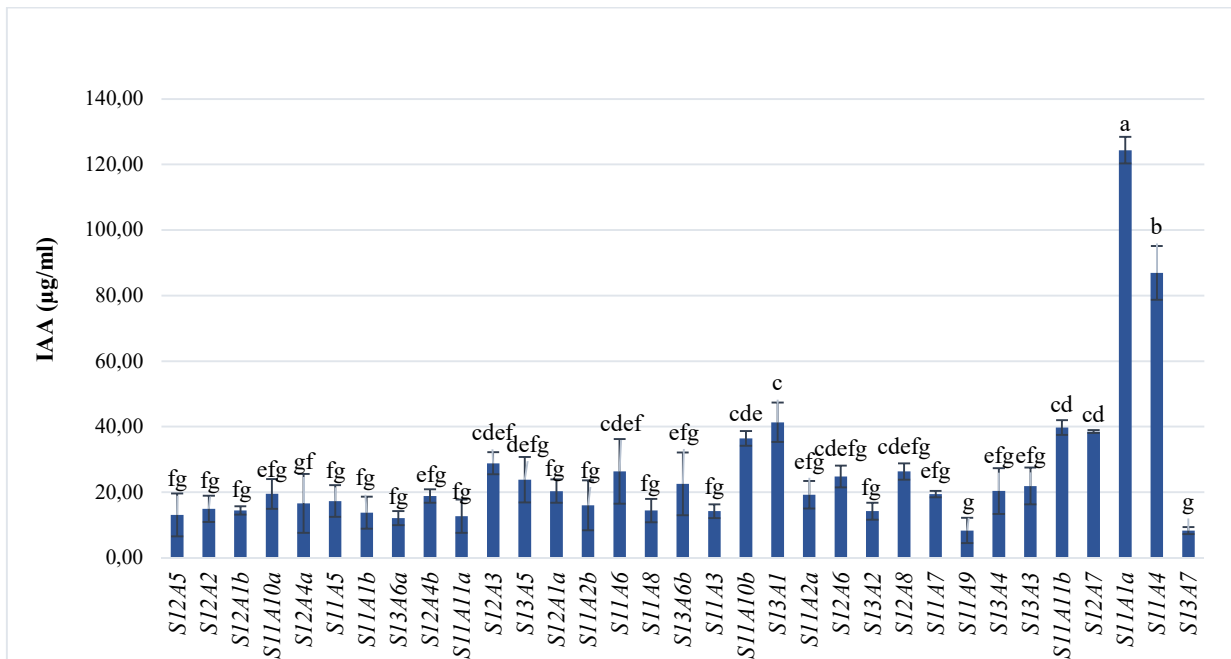
- Han JI, Choi HK, Lee SW, Orwin PM, Kim J, LaRoe SL, Kim T, O'Neil J, Leadbetter JR., Lee SY, Hur CG, Spain JC, Ovchinnikova G, Goodwin L, Han C. 2011. Complete Genome Sequence of the Metabolically Versatile Plant Growth-Promoting Endophyte *Variovorax paradoxus* S110. *J. Bacteriol.* 193, 1183–1190. <https://doi.org/10.1128/JB.00925-10>
- Hausenblas HA, Saha D, Dubyak PJ, Anton SD. 2013. Saffron (*Crocus sativus* L.) and major depressive disorder: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Integr Med.* 11:377–383.
- He H, Ye Z, Yang D, Yan J, Xiao L, Zhong T, Yuan M, Cai X, Fang Z, Jing Y. 2013. Characterization of endophytic *Rahnella* sp. JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. *Chemosphere.* 90:1960–1965.
- Jalali-Heravi M, Parastar H, Ebrahimi-Najafabadi H. 2010. Self-modeling curve resolution techniques applied to comparative analysis of volatile components of Iranian saffron from different regions. *Anal Chim Acta.* 662:143–154.
- Kang SM, Waqas M, Khan AL, Lee IJ. 2014. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria: Potential Candidates for Gibberellins Production and Crop Growth Promotion. In: Miransari M, editor. *Use Microbes Alleviation Soil Stress Vol 1* [Internet]. [place unknown]: Springer New York; [cited 2014 May 26]; p. 1–19. Available from: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-9466-9\\_1](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-9466-9_1)
- Kanvinde L, Sastry GRK. 1990. *Agrobacterium tumefaciens* is a diazotrophic bacterium. *Appl Env Microbiol.* 56:2087–2092.
- Khan A, Geetha R, Akolkar A, Pandya A, Archana G, Desai AJ. 2006. Differential cross-utilization of heterologous siderophores by nodule bacteria of *Cajanus cajan* and its possible role in growth under iron-limited conditions. *Appl Soil Ecol.* 34:19–26.
- Koocheki A, Seyyedi SM. 2015. Relationship between nitrogen and phosphorus use efficiency in saffron (*Crocus sativus* L.) as affected by mother corm size and fertilization. *Ind Crops Prod.* 71:128–137.
- Kour R, Ambardar S, Vakhlu J. 2018. Plant growth promoting bacteria associated with corm of *Crocus sativus* during three growth stages. *Lett Appl Microbiol.* 67:458–464.
- Kravchenko LV, Azarova TS, Makarova NM, Tikhonovich IA. 2004. The Effect of Tryptophan Present in Plant Root Exudates on the Phytostimulating Activity of Rhizobacteria. *Microbiology.* 73:156–158.
- Lage M, Cantrell CL. 2009. Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. *Sci Hortic.* 121:366–373.
- Leinhos V, Vacek O. 1994. Biosynthesis of auxins by phosphate-solubilizing rhizobacteria from wheat (*Triticum aestivum* and rye (*Secale cereale*). *Microbiol Res.* 149:31–35.

- Miller IS, Fox D, Saeed N, Borland PA, Miles CA, Sastry GRK. 1986. Enlarged map of *Agrobacterium tumefaciens* C58 and the location of chromosomal regions which affect tumorigenicity. *Mol Gen Genet MGG*. 205:153–159.
- Mir JI, Ahmed N, Wani SH, Rashid R, Mir H, Sheikh MA. 2011. In vitro development of microcorms and stigma like structures in saffron (*Crocus sativus* L.). *Physiol Mol Biol Plants*. 16:369–373.
- Moghadam GD, Sadeghi SM, Droodian H. 2013. Types of Cultivation Methods in Saffron (*Crocus sativus*) and observing the Principles of Fight against Pests and Weeds. *Persian Gulf Crop Prot*. 2:8–13.
- Moulin L, Béna G, Boivin-Masson C, Stepkowski T. 2004. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol Phylogenet Evol*. 30:720–732.
- My PT, Manucharova NA, Stepanov AL, Pozdnyakov LA, Selitskaya OV, Emtsev VT. 2015. *Agrobacterium tumefaciens* as associative nitrogen-fixing bacteria. *Mosc Univ Soil Sci Bull*. 70:133–138.
- Parray JA, Kamili AN, Reshi ZA, Hamid R, Qadri RA. 2013. Screening of beneficial properties of rhizobacteria isolated from Saffron (*Crocus sativus* L) rhizosphere. *Afr J Microbiol Res*. 7:2905–2910.
- Pikovskaya RI. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*. 17:e370.
- Porcel R, Zamarréño ÁM, García-Mina JM, Aroca R. 2014. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. *BMC Plant Biol*. 14:36.
- Rashid M, Khalil S, Ayub N, Alam S, Latif F. 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pak J Biol Sci*. 7:187–196.
- Rouatt JW, Katznelson H. 1961. A Study of the Bacteria on the Root Surface and in the Rhizosphere Soil of Crop Plants. *J Appl Bacteriol*. 24:164–171.
- Saharan BS, Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*. 21:30.
- Samarghandian S, Borji A, Farahmand SK, Afshari R, Davoodi S. 2013. *Crocus sativus* L. (Saffron) Stigma Aqueous Extract Induces Apoptosis in Alveolar Human Lung Cancer Cells through Caspase-Dependent Pathways Activation. *BioMed Res Int* [Internet]. [cited 2014 Jan 30]; 2013. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3830877/>
- Sampathu SR, Shivashankar S, Lewis YS, Wood AB. 1984. Saffron (*Crocus Sativus* Linn.) Cultivation, processing, chemistry and standardization. *C R C Crit Rev Food Sci Nutr*. 20:123–157.
- Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*. 160:47–56.

- Sharaf-Eldin M, Elkholy S, Fernández J, Junge H, Cheetham R, Guardiola J, Weathers P. 2007. The effect of *Bacillus subtilis* FZB24® on flowers quantity and quality of saffron (*Crocus sativus* L.). *Planta Med* [Internet]. [cited 2014 Jan 31]; 73. Available from: <https://www.thieme-connect.com/ejournals/abstract/10.1055/s-2007-987387>
- Shoushtari AN, Fuller D, Kanvinde L, Sastry GRK. 2010. *Agrobacterium tumefaciens* nitrogen fixation system expresses in *Sinorhizobium meliloti* (= *Rhizobium meliloti*). *Res J Agric Biol Sci*. 6:535–541.
- Singh JS, Pandey VC, Singh DP. 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agric Ecosyst Environ*. 140:339–353.
- Tandon HLS, Cescas MP, Tyner EH. 1968. An Acid-Free Vanadate-Molybdate Reagent for the Determination of Total Phosphorus in Soils<sup>1</sup>. *Soil Sci Soc Am J*. 32:48.
- Timmusk S, Nicander B, Granhall U, Tillberg E. 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem*. 31:1847–1852.
- Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, Netrusov AI. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol Res*. 162:69–76.
- Ünal M, Çavuşoğlu A. 2005. The effect of various nitrogen fertilizers on saffron (*Crocus sativus* L.) yield. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg*. 18:257–260.
- Vanneste S, Friml J. 2009. Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*. 136:1005–1016.
- Velázquez E, Peix A, Zurdo-Piñeiro JL, Palomo JL, Mateos PF, Rivas R, Muñoz-Adelantado E, Toro N, García-Benavides P, Martínez-Molina E. 2005. The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI*. 18:1325–1332.
- Vincent JM, others. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *Man Pract Study Root-Nodule Bact* [Internet]. [cited 2017 Mar 12]. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19710700726>
- Vyas P, Joshi R, Sharma K. C, Rahi P, Gulati A, Gulati A. 2010. Cold-Adapted and Rhizosphere-Competent Strain of *Rahnella* sp. with Broad-Spectrum Plant Growth-Promotion Potential. *J Microbiol Biotechnol*. 20:1724–1734.
- Xie J, Knight JD, Leggett ME. 2009. Comparison of media used to evaluate *Rhizobium leguminosarum* bivar *viciae* for phosphate-solubilizing ability. *Can J Microbiol*. 55:910–915.
- Young JM, Kuykendall LD, Martínez-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*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 51:89–103.

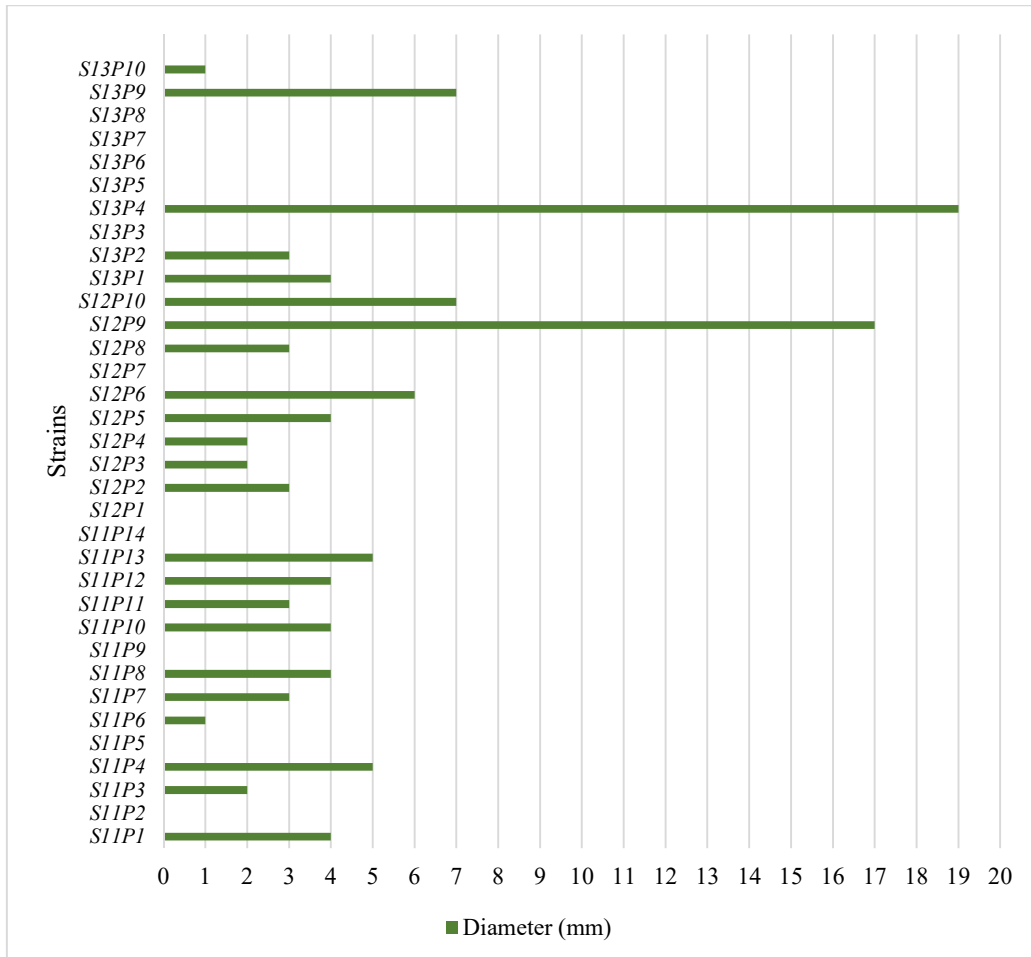
Zhou G-C, Wang Y, Zhai S, Ge F, Liu Z-H, Dai Y-J, Yuan S, Hou J-Y. 2013. Biodegradation of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam by the nitrogen-fixing and plant-growth-promoting *rhizobacterium* *Ensiferadhaerens* strain TMX-23. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:4065–4074.

FIGURES

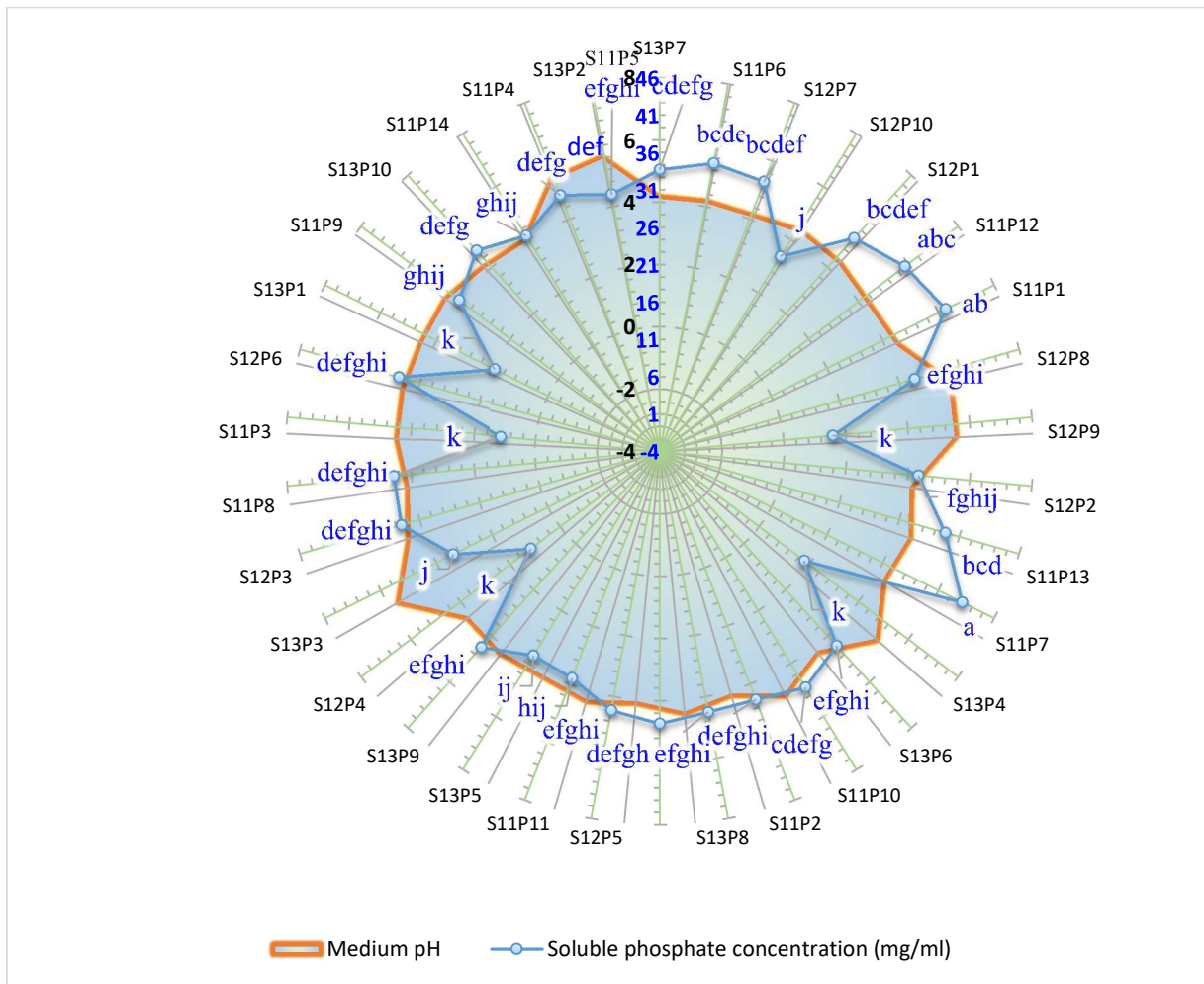


**Figure 1:** Concentration of auxin (IAA µg/ml) produced by saffron isolates. Data expressed as means ± standard deviation. Values with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

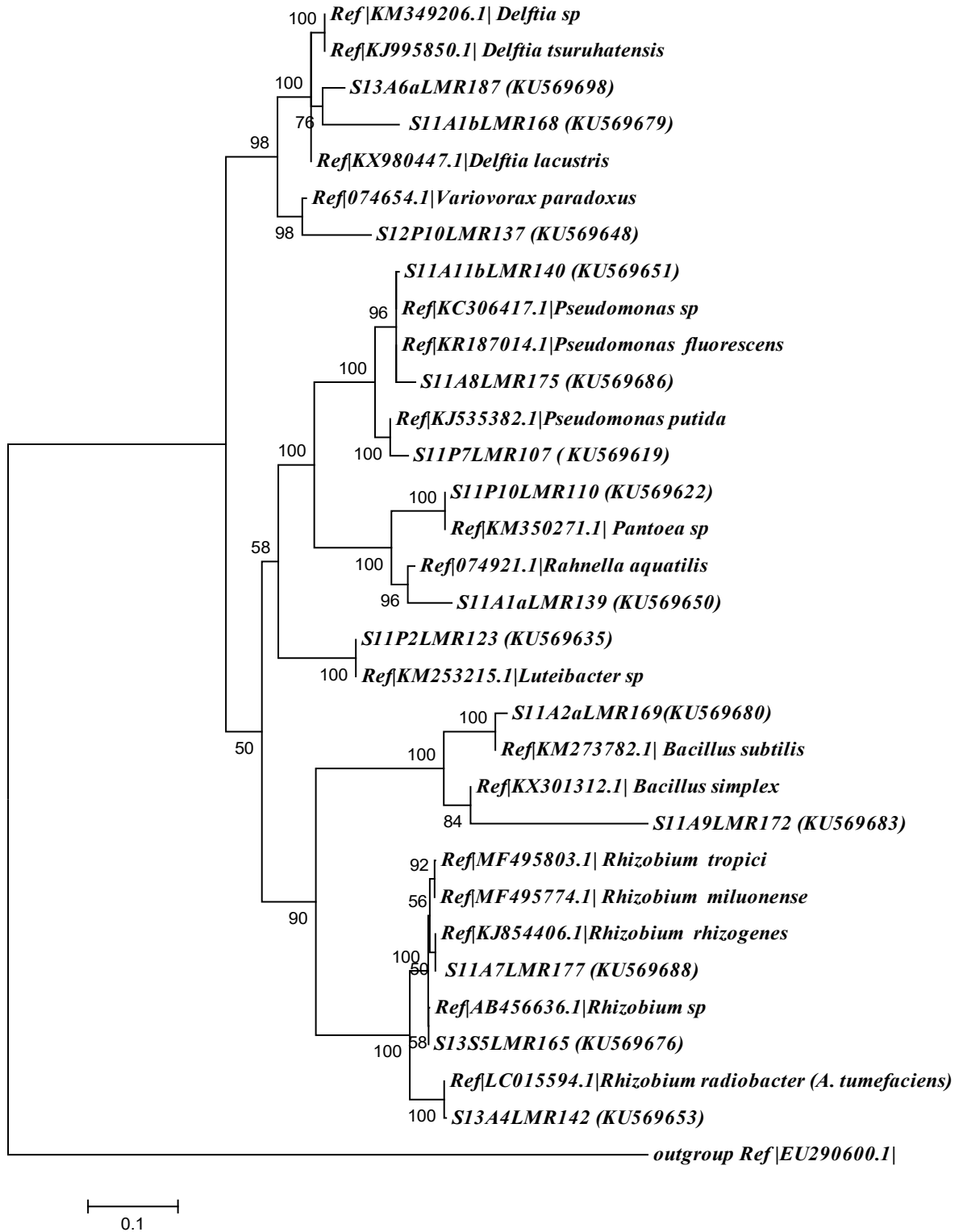




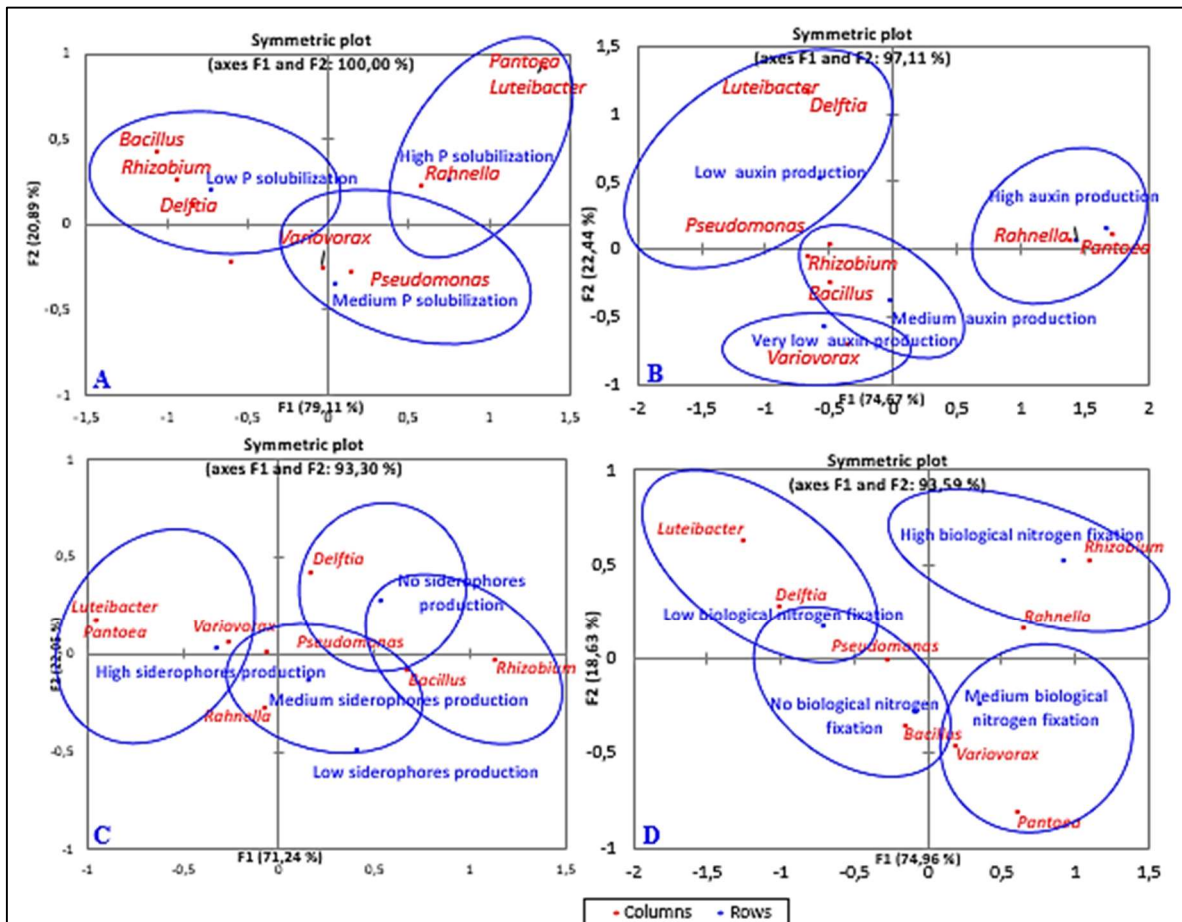
**Figure 2:** Qualitative test of phosphate solubilization of saffron isolates isolated on selective PVK medium.



**Figure 3:** Soluble phosphate released concentration and medium pH of saffron isolates selected on PVK medium. Data expressed as means  $\pm$  standard deviation. Values with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).



**Figure 4:** Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences on the both sense corresponding to saffron PGPR. The reference sequences are shown by species name followed by the GenBank accession number. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method based on the Tamura–Nei model with 1000 bootstrap replications. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The analysis involved 14 representative sequences. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.



**Figure 5:** Correspondence analyses (CA) of the relationship between the isolate's genera and the biological activities tested. (A) Phosphate solubilization; (B) Production of auxin; (C) Siderophores production and (D) Biological nitrogen fixation.

**TABLES**

**Table 1** Physico-chemical characteristics of saffron soils in Taliouine

Granulometry (%)		Chemical properties	
Clays	21.80	Total nitrogen%	0.04
Fine silt	11.90	Total carbon%	0.89
Coarse silt	11.20	C / N	22
Fine sands	43.20	Available P (mg/kg)	18
Coarse-grained	11.40	pH H <sub>2</sub> O	8.3
		pH KCl	7.6

**Table 2.** Recapitulative table of the PGP traits of the whole saffron rhizobacteria collection

Isolation medium	Strains	GenBank accession numbers	IAA production (µg/ml)	Phosphate solubilization		Siderophores production		Biological nitrogen fixation
				Free phosphate (mg/l)	pH	Evaluation test on liquid Modi medium	Estimation of siderophores production (A/A <sub>ref</sub> )	
YEM-try medium	S12A5	KU569693	13.08± 6.5 <sup>fg</sup>	24.71±1.3 <sup>klmn</sup>	5.29	+++	0.562	++
	S12A2	KU569690	14.81± 4.0 <sup>fg</sup>	10.74±0.01 <sup>jklm</sup>	6.48	-	ND	-
	S12A1b	KU569689	14.42± 1.3 <sup>fg</sup>	8.32±0.0 <sup>jklmn</sup>	6.13	+++	0.312	++
	S11A10a	KU569697	19.42± 4.5 <sup>efg</sup>	12.14±0.03 <sup>c</sup>	5.65	+++	0.071	+
	S12A4a	KU569691	16.56± 9.0 <sup>fg</sup>	7.11±0.01 <sup>klmno</sup>	5.25	++	0.13	+
	S11A5	KU569684	17.31± 4.9 <sup>fg</sup>	13.46±0.10 <sup>a</sup>	3.87	+++	0.251	-
	S11A1b	KU569679	13.65± 4.9 <sup>fg</sup>	11.74±0.02 <sup>defghi</sup>	5.33	-	ND	-
	S13A6a	KU569698	12.12± 2.2 <sup>fg</sup>	10.70±0.0 <sup>de</sup>	5.80	+++	0.174	-
	S12A4b	KU569692	19.04± 2.0 <sup>efg</sup>	7.77±0.01 <sup>jklmn</sup>	6.62	-	ND	+
	S11A11a	KU569685	12.69± 5.0 <sup>fg</sup>	12.23±0.0 <sup>efghijk</sup>	5.71	++	ND	+
	S12A3	KU569661	28.85±3.4 <sup>def</sup>	6.64±0.0 <sup>o</sup>	3.85	+++	0.19	++
	S13A5	KU569660	22.88±6.9 <sup>defg</sup>	10.92±0.01 <sup>def</sup>	5.67	+++	0.401	+
	S12A1a	KU569659	20.38± 3.6 <sup>fg</sup>	8.71±0.01 <sup>ijkl</sup>	6.15	-	ND	+
	S11A2b	KU569681	15.96± 7.6 <sup>fg</sup>	11.84±0.01 <sup>de</sup>	3.48	-	ND	++
	S11A6	KU569658	26.35±9.8 <sup>def</sup>	11.57±0.01 <sup>jklm</sup>	3.26	+++	0.198	+
	S11A8	KU569686	18.08± 3.6 <sup>fg</sup>	13.95±0.06 <sup>a</sup>	3.34	+++	0.377	+++
	S13A6b	KU569657	22.5± 9.5 <sup>efg</sup>	8.06±0.00 <sup>mn</sup>	5.55	+++	0.216	+
	S11A3	KU569682	18.08±2.1 <sup>fg</sup>	8.97±0.02 <sup>hijk</sup>	5.49	++	ND	+
	S11A10b	KU569663	37.31± 2.2 <sup>cde</sup>	12.03±0.08 <sup>cd</sup>	3.79	++	ND	-
	S13A1	KU569656	41.15± 6.0 <sup>c</sup>	11.08±0.03 <sup>hijkl</sup>	6.12	-	ND	-
	S11A2a	KU569680	19.23± 4.2 <sup>efg</sup>	10.19±0.001 <sup>klmno</sup>	4.06	-	ND	++
	S12A6	KU569655	24.81±3.3 <sup>cdefg</sup>	10.57±0.0 <sup>jklm</sup>	5.09	-	ND	-
	S13A2	KU569694	14.23±2.6 <sup>fg</sup>	9.61±0.02 <sup>ghijk</sup>	5.84	-	ND	+
	S12A8	KU569654	26.35±2.5 <sup>cdefg</sup>	6.45±0.08 <sup>ijklm</sup>	6.67	-	ND	+
	S11A7	KU569688	18.65± 1.0 <sup>efg</sup>	9.09±0.01 <sup>jklmn</sup>	3.97	-	ND	++
	S11A9	KU569683	8.27±3.8 <sup>g</sup>	9.40±0.02 <sup>mno</sup>	5.08	+	ND	-
	S13A4	KU569653	20.38±7.0 <sup>efg</sup>	6.95±1.1 <sup>no</sup>	5.84	+	ND	+++
	S13A3	KU569652	21.92± 5.6 <sup>efg</sup>	28.22±0.01 <sup>jklm</sup>	6.16	+	ND	-
	S11A11b	KU569651	39.62± 2.2 <sup>cd</sup>	8.96±0.01 <sup>defghi</sup>	4.58	+++	0.05	+++
	S12A7	KU569662	39.62±0.5 <sup>cd</sup>	15.10±0.02 <sup>a</sup>	2.59	+++	0.232	++

	<b>S11A1a</b>	KU569650	124.23± 4.0 <sup>a</sup>	11.41±0.01 <sup>defg</sup>	5.80	+	0.984	+++
	<b>S11A4</b>	KU569649	86.92± 8.2 <sup>b</sup>	13.95±0.12 <sup>b</sup>	3.22	+++	0.413	+
	<b>S13A7</b>	-----	8.27± 1.1 <sup>g</sup>	11.06±0.01 <sup>def</sup>	5.95	+++	0.166	+
<b>PVK medium</b>	<b>S13P7</b>	KU569645	8.29±4.6 <sup>g</sup>	33.72±0.74 <sup>cdefg</sup>	4.24	-	ND	+
	<b>S11P6</b>	KU569638	16.31±5.0 <sup>g</sup>	35.22±2.62 <sup>bcde</sup>	4.24	++	ND	-
	<b>S12P7</b>	KU569633	11.47±4.1 <sup>g</sup>	34.7±2.03 <sup>bcdef</sup>	4.22	-	ND	+
	<b>S12P10</b>	KU569648	1.23±0.2 <sup>g</sup>	26.7±4.53 <sup>l</sup>	4.48	++	ND	++
	<b>S12P1</b>	KU569642	12.06±0.9 <sup>g</sup>	34.61±1.51 <sup>bcdef</sup>	4.45	+++	0.193	++
	<b>S11P12</b>	KU569640	123.85±4.9 <sup>a</sup>	37.1±2.31 <sup>abc</sup>	4.3	+++	0.028	+++
	<b>S11P1</b>	KU569634	81.72±0.01 <sup>bc</sup>	38.73±3.35 <sup>ab</sup>	4.44	+	0.598	-
	<b>S12P8</b>	KU569695	45±2.1 <sup>ef</sup>	31.45±4.15 <sup>efghi</sup>	5.66	+++	0.208	++
	<b>S12P9</b>	KU569675	35.52±9.7 <sup>f</sup>	19.25±0.74 <sup>k</sup>	5.6	+++	0.397	++
	<b>S12P2</b>	KU569631	6.03±0.2 <sup>g</sup>	30.76±0.31 <sup>fghij</sup>	4.23	+++	0.144	++
	<b>S11P13</b>	KU569641	96.55±5.3 <sup>b</sup>	35.71±0.23 <sup>bcd</sup>	4.58	+++	0.255	++
	<b>S11P7</b>	KU569619	3.69±2.3 <sup>g</sup>	41.2±0.85 <sup>a</sup>	4.38	+++	0.439	++
	<b>S13P4</b>	KU569687	6.98±3.4 <sup>g</sup>	20.25±0.40 <sup>k</sup>	5.32	+++	0.278	-
	<b>S13P6</b>	KU569627	86.55±3.8 <sup>b</sup>	31.11±2.10 <sup>efghi</sup>	4.27	+++	0.239	+
	<b>S11P10</b>	KU569622	89.68±4.5 <sup>b</sup>	33.06±0.99 <sup>cdefg</sup>	4.87	+	ND	++
	<b>S11P2</b>	KU569635	16.71±1.2 <sup>g</sup>	31.59±1.16 <sup>defghi</sup>	4.22	+	ND	+
	<b>S13P8</b>	KU569646	8.21±3.5 <sup>g</sup>	31.41±1.94 <sup>efghi</sup>	4.51	-	ND	+
	<b>S12P5</b>	KU569632	1.43±1.3 <sup>g</sup>	32.41±1.11 <sup>defgh</sup>	4.17	+++	0.398	++
	<b>S11P11</b>	KU569620	96.31±4.2 <sup>b</sup>	31.2±4.22 <sup>efghi</sup>	4.42	++	0.323	+
	<b>S13P5</b>	KU569626	1.07±1.2 <sup>g</sup>	28.47±1.10 <sup>hij</sup>	4.21	+++	0.058	++
	<b>S13P9</b>	KU569629	0.43±1.4 <sup>g</sup>	28.08±1.10 <sup>ij</sup>	4.32	+++	0.088	++
	<b>S12P4</b>	KU569644	11.59±3.9 <sup>g</sup>	31.43±0.31 <sup>efghi</sup>	4.24	+++	0.358	++
	<b>S13P3</b>	KU569696	12.02±6.6 <sup>g</sup>	17.58±1.86 <sup>k</sup>	5.78	++	ND	+
	<b>S12P3</b>	KU569643	7.38±2.5 <sup>g</sup>	26.88±4.96 <sup>j</sup>	4.59	++	0.624	+
	<b>S11P8</b>	KU569621	8.53±3.2 <sup>g</sup>	31.92±1.41 <sup>defghi</sup>	4.24	++	0.442	++
	<b>S11P3</b>	KU569636	82.58±8.5 <sup>bc</sup>	31.7±1.07 <sup>defghi</sup>	4.52	+++	0.176	+++
	<b>S12P6</b>	KU569674	9.48±1.8 <sup>g</sup>	17.36±1.21 <sup>k</sup>	4.54	+++	0.324	++
	<b>S13P1</b>	KU569624	86.75±2.1 <sup>b</sup>	32.26±3.95 <sup>defghi</sup>	4.49	+++	0.204	+++
	<b>S11P9</b>	KU569639	2.94±1.0 <sup>g</sup>	20.64±2.76 <sup>k</sup>	4.53	-	ND	++
	<b>S13P10</b>	KU569630	80.2±7.7 <sup>bc</sup>	29.62±5.73 <sup>ghij</sup>	4.3	++	ND	+++
<b>S11P14</b>	KU569623	82.06±6.7 <sup>bc</sup>	32.38±2 <sup>defgh</sup>	4.26	-	ND	++	
<b>S11P4</b>	KU569637	68.37±4.7 <sup>cd</sup>	29.98±5.89 <sup>ghij</sup>	4.12	+	ND	-	
<b>S13P2</b>	KU569625	84.56±5.0 <sup>bc</sup>	32.75±0.92 <sup>defg</sup>	5.47	+++	0.152	++	
<b>S11P5</b>	KU569647	56.63±5.1 <sup>de</sup>	30.99±0.83 <sup>efghi</sup>	5.72	+++	0.166	++	
<b>Modi medium</b>	<b>S11S1</b>	KU569664	73.41±4.0 <sup>c</sup>	16.81±0.05 <sup>ef</sup>	3.49	++	ND	++
	<b>S11S2</b>	KU569665	125.28±5.4 <sup>a</sup>	11.17±0.03 <sup>ghi</sup>	4.66	++	ND	++
	<b>S11S3a</b>	KU569666	8.65±3.2 <sup>def</sup>	18.89±0.10 <sup>cd</sup>	3.33	++	ND	+
	<b>S11S3b</b>	KU569667	10.52±0.7 <sup>def</sup>	14.74±0.04 <sup>de</sup>	3.06	++	ND	-
	<b>S11S4</b>	KU569668	5.12±4.3 <sup>ef</sup>	14.52±0.04 <sup>de</sup>	3.15	++	ND	+
	<b>S11S5</b>	KU569669	10.32±6.5 <sup>def</sup>	18.51±0.05 <sup>a</sup>	3.12	++	ND	+
	<b>S11S6</b>	KU569670	93.41±5.2 <sup>b</sup>	14.64±0.11 <sup>de</sup>	3.99	++	ND	++
	<b>S11S7</b>	KU569671	91.55±3.3 <sup>b</sup>	13.94±0.02 <sup>de</sup>	3.65	+	ND	++
	<b>S11S8</b>	KU569672	5.52±5.5 <sup>ef</sup>	14.91±0.02 <sup>ef</sup>	4.27	++	ND	+
	<b>S12S1</b>	KU569610	6.83±3.7 <sup>ef</sup>	6.61±0.03 <sup>i</sup>	5.80	+++	0.083	+++
	<b>S12S2</b>	KU569611	10.16±3.5 <sup>def</sup>	18.20±0.05 <sup>bcd</sup>	3.33	+++	0.279	++
	<b>S12S3</b>	KU569612	2.58±2.2 <sup>g</sup>	14.79±11.5 <sup>bcd</sup>	5.47	+++	ND	+
	<b>S12S4</b>	KU569613	4.56±3.2 <sup>ef</sup>	8.54±0.01 <sup>hi</sup>	5.35	+++	0.020	+
	<b>S12S5</b>	KU569614	18.37±6.8 <sup>d</sup>	12.88±0.03 <sup>fg</sup>	5.36	+++	0.117	++
	<b>S12S6</b>	KU569615	1.35±0.1 <sup>f</sup>	9.06±0.03 <sup>hi</sup>	3.42	+++	0.108	++
	<b>S13S1</b>	KU569616	14.88±0.7 <sup>de</sup>	19.13±0.03 <sup>d</sup>	2.40	+++	0.108	++
	<b>S13S2</b>	KU569617	96.75±5.8 <sup>b</sup>	19.90±0.06 <sup>ab</sup>	2.67	+++	0.610	+
	<b>S13S3</b>	KU569673	98.25±5.2 <sup>b</sup>	18.04±0.06 <sup>de</sup>	3.29	+++	0.577	++
<b>S13S4</b>	KU569618	8.57±1.1 <sup>def</sup>	14.49±0.04 <sup>de</sup>	3.19	+++	0.338	++	

	<b>S13S5</b>	KU569676	6.87±1.1 <sup>ef</sup>	10.15±0.00 <sup>gh</sup>	5.16	++	ND	+++
	<b>S13S6a</b>	KU569677	10.16±9.1 <sup>def</sup>	15.33±0.03 <sup>abc</sup>	2.96	+	ND	+
	<b>S13S6b</b>	KU569678	4.25±2.2 <sup>def</sup>	8.62±0.00 <sup>i</sup>	5.16	++	ND	+

ND: not determined

For siderophore activity: +++: color change after 1 min. ++: color change after 1h. +: color change after 24h

**A**: absorbance at 630 nm

**A ref**: absorbance at 630 nm of the reference

Data expressed as means ± standard deviation. Values with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).



## Synthèse

Plusieurs enquêtes ont permis de mieux comprendre la diversité, la dynamique et l'importance des communautés microbiennes du sol et leurs rôles bénéfiques et coopératifs dans la productivité agricole. On s'intéresse de plus en plus à la gestion des communautés microbiennes du sol pour améliorer la croissance des plantes, vu l'importance de ces microorganismes dans l'acquisition de nutriments pour les plantes par différents mécanismes, surtout en mettant l'accent sur les pratiques agricoles respectueuses de l'environnement et la diminution de l'utilisation des engrais chimiques qui sont la cause de nombreuses maladies pour l'Homme et l'environnement (Singh et al. 2011).

Il existe de très nombreuses publications qui évoquent l'isolement, la caractérisation et les avantages potentiels des PGPR des plantes cultivées, mais aucune information sur l'étude et l'utilisation des PGPR pour le développement du safran ou l'identification des microorganismes trouvés dans la rhizosphère du safran n'est disponible au Maroc. A l'échelle mondiale et à notre connaissance, il n'y a que quelques travaux récents qui se sont penchés sur les rhizobactéries du safran et l'amélioration de la culture du safran par l'inoculation avec des PGPR.

L'objectif de ce volet est l'isolement, l'identification et la caractérisation des bactéries promotrices de la croissance à partir de la rhizosphère du safran localisé dans la zone de Taliouine-Maroc. Ce projet s'intéresse essentiellement aux bactéries de type PGPR qui peuvent avoir un effet positif sur la croissance et la qualité du safran (biostimulation et biofertilisation). L'isolement des bactéries PGPR a été réalisé en utilisant 3 milieux de culture sélectifs PVK, Modi et YEM-try. A partir desquels on a obtenu une collection de 89 isolats. Quatre activités biologiques intéressantes ont été évaluées: la synthèse d'auxine, la solubilisation du phosphate, la production de sidérophores et la fixation de l'azote atmosphérique, afin de tester et cribler les meilleures PGPR de cette communauté bactérienne de 89 isolats.

L'évaluation de la synthèse de l'auxine a montré que tous les isolats du safran étaient capables de produire cette phytohormone avec des concentrations significativement élevées et variables d'une souche à une autre. Ces résultats concordent avec l'étude de Parray et al. (2013) qui a rapporté que près de 83,33% des souches isolées de la rhizosphère du safran en Inde étaient capables de synthétiser l'auxine. Selon Leinhos and Vacek (1994), la production d'auxines est courante chez les bactéries de la rhizosphère, et qu'environ 80% des souches de bactéries solubilisatrices du phosphate étaient capables de synthétiser des auxines dans un milieu de culture liquide. En effet, l'évaluation de l'activité de solubilisation du phosphate montre que les souches isolées sur le milieu PVK sont les meilleures bactéries solubilisatrices de la roche

phosphatée naturelle par rapport aux autres souches isolées sur les autres milieux sélectifs (YEM et Modi). Les bactéries solubilisatrices du phosphate sont capables d'assurer cette activité grâce à la biosynthèse des acides organiques qui jouent un rôle important dans la solubilisation du phosphate, comme les acides oxalique, citrique, gluconique et autres acides (Rashid et al. 2004). Par ailleurs l'isolement des bactéries sur le milieu minimal strict Modi cause une surproduction de sidérophores par toutes les souches, qui peut être attribuée au mannitol utilisé comme source de carbone, ce qui suggère que le mannitol était métabolisé par une voie aérobie nécessitant des enzymes contenant du fer (Berraho et al. 1997). Notamment, les isolats isolés sur le milieu sélectif Modi représentent les souches les plus productives de sidérophores. La dernière activité biologique étudiée était la fixation de l'azote atmosphérique libre, bien que 84,5% représente un pourcentage intéressant d'isolats fixant l'atmosphère libre, au contraire seulement 15,5% des isolats ne fixent pas l'azote atmosphérique surtout que la fixation de l'azote est une activité très intéressante pour la culture du safran car elle a un effet bénéfique sur le rendement des fleurs et la qualité du safran (Ünal and Çavuşoğlu 2005).

L'identification moléculaire par le gène ribosomique 16S de la collection bactérienne du safran a révélé une grande diversité avec différents genres bactériens identifiés : *Pseudomona sp* (34,83%), *Rahnella sp* (24,71%), *Variovorax sp* (15,73%), *Delftia sp* (11,23%), *Bacillus sp* (6,74%), *Agrobacterium sp* (2,24%), *Rhizobium sp* (2,24%), *Luteibacter sp* (1,12%) et *Pantoea sp* (1,12%). La communauté bactérienne associée au safran dans les sols de Talouine est différente de celle identifiée dans l'étude de Parray et al. (2013). Ces auteurs ont identifié 6 isolats représentatifs sur la base des réactions biochimiques à partir d'une collection de 23 isolats de la rhizosphère du safran de la région de Pampore en Inde comme appartenant aux espèces *Acinetobacter lwoffi*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp*, *Pantoea sp*. et *Klebsella sp*. Alors que dans l'étude de Ambardar and Vakhlu (2013), un total de 100 bactéries ont été sélectionnées comme bactéries PGPR à partir du sol du safran échantillonné dans la région de Wuyan en Inde. L'identification moléculaire de ces souches a révélé 4 genres différents, à savoir *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Chryseobacterium* et *Pseudomonas*, où le nombre et la diversité du genre *Pseudomonades* étaient les plus élevés. En comparant toutes ces études sur les PGPR du safran, on remarque la dominance des *Pseudomonas* dans la rhizosphère du safran ce qui est assez général chez les végétaux. Il semblerait que ses bactéries soient attirées chimiquement par les exsudats radiculaires et seraient ainsi sélectionnés par rapport à d'autres bactéries en raison de leurs propriétés PGP (Saharan 2011). En général la rhizosphère du safran est colonisée principalement par la communauté microbienne Gram négatives, ce qui suggère qu'elles sont stimulées par les rhizodépôts, tandis que les bactéries

Gram-positives seraient inhibées (Ambardar and Vakhlu 2013). D'autre part, Ambardar et al. (2014) ont identifié les bactéries associées aux parties souterraines (rhizosphère, cormosphère et en vrac) du safran par l'approche métagénomique ciblant le gène de l'ARNr 16S. Ils ont montré que les bactéries qui habitent la cormosphère, la rhizosphère et le sol en vrac du safran sont significativement différentes et comme prévu, la rhizosphère de safran est riche en *Pseudomonas* mais, étonnamment, aucun *Bacillus* n'a été identifié.

En général, toutes les rhizobactéries du safran ont démontré au moins une propriété intéressante pour la croissance des plantes. Certains genres comme *Pantoea* et *Rahnella* possèdent des niveaux d'activités élevés pour divers caractères PGP, avec une production maximale d'auxine et de sidérophores, et de solubilisation du phosphate. De plus, le genre *Variovorax* montre une production maximale de sidérophores et une fixation de l'azote atmosphérique qui confirment son appartenance au groupe PGPR (Han et al. 2011). En 2013, l'étude de Guglielmetti et al, était la première à montrer qu'un membre du genre *Luteibacter* est proposé comme PGPR. Notre étude le confirme avec une bonne production de sidérophores et une bonne capacité de solubiliser le phosphate naturel.

## Conclusion

L'exploration de la rhizosphère du safran marocain a révélé une diversité et de grandes potentialités des populations bactériennes qui s'y trouvent. Des résultats prometteurs qui permettent de penser que ces PGPR peuvent être utilisées comme des biofertilisants au champ pour améliorer la croissance, le rendement et la qualité du safran ou même l'utiliser pour d'autres plantes. Elles peuvent faire partie des solutions que l'on peut préconiser pour l'agriculture durable, et ainsi diminuer, au moins partiellement, l'utilisation d'engrais chimiques et de pesticides, vu leurs effets néfastes sur l'environnement et la santé.

*Article 4*

**Application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biological fertilizers for improving the growth, the yield and the secondary metabolites of saffron (*Crocus sativus* L.)**

**Application de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) comme engrais biologique pour améliorer la croissance, le rendement et les métabolites secondaires du safran (*Crocus sativus* L.)**

Imane Chamkhi<sup>1</sup>, Jamal Aurag<sup>1</sup> and Laila Sbabou<sup>1</sup>

## Introduction – objectif

Au cours des dernières années, de nombreux chercheurs et agriculteurs se sont intéressés à exploiter, étudier et améliorer la culture du safran. Par contre dans le passé, le safran était considéré comme une culture mineure négligée et utilisée uniquement pour la diversification agricole (Gresta et al. 2008). Néanmoins, Koocheki and Seyyedi (2015) ont révélé que la fertilisation de *C. sativus* L. par l'engrais organique présentait un bénéfice sur la taille des cormes mère et sur le rendement des fleurs, qui était plus prononcé et significativement plus élevé que l'utilisation d'engrais chimiques. D'autre part, l'étude de Sharaf-Eldin et al. (2007) suggère que l'application de la bactérie PGPR *Bacillus subtilis* présente un avantage intéressant pour les producteurs de safran en accélérant la croissance des cormes, en augmentant le rendement en biomasse et en augmentant les teneurs en composants chimiques (crocine, safranal, picrocrocine et crocétine). De plus, les PGPR peuvent également être utilisées comme un bio-fongicide pour les maladies de la pourriture des cormes chez *C. sativus* (Gupta and Vakhlu 2015). L'utilisation d'inoculum composé de bactéries PGPR en tant que biofertilisants représente un moyen potentiel de réduire les impacts environnementaux négatifs résultant de l'utilisation continue d'engrais chimiques (Pérez-Montaña et al. 2014), et peut faire partie de la solution pour une agriculture durable.

La pratique de l'inoculation avec des microorganismes bénéfiques est donc une approche intéressante à développer pour diminuer l'utilisation d'intrants chimiques et de produits pesticides, surtout lorsqu'on se place dans le cadre de la culture de produits du terroir et de l'agriculture biologique. C'est précisément le cas de la culture du safran dans la région de Talouine-Taznakht, où le souci d'améliorer la productivité de la culture devrait aller avec une meilleure valorisation du produit, safran du Maroc, comme produit Bio de qualité supérieure. Dans ce contexte général, le principal objectif de cette étude était de tester quantitativement et qualitativement les effets de l'inoculation par des bactéries PGPR sur la croissance de la plante du safran dans les conditions du champ. Trois bactéries et leur association ont été sélectionnées sur la base de leurs activités promotrices de la croissance (volet III) ont donc inoculées au safran cultivé *in situ* dans la plantation 1.2.3 SAFRAN à Taliouine.

## **Application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biological fertilizers for improving the growth, the yield and the secondary metabolites of saffron (*Crocus sativus* L.).**

***Imane Chamkhi<sup>1</sup>, Jamal Aurag<sup>1</sup> and Laila Sbabou<sup>1</sup>***

*<sup>1</sup>Center of Research Plants and microbial Biotechnologies, Biodiversity and Environment. Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Avenue Ibn Battouta, BP 1014, Rabat 10000, Morocco.*

***Address Correspondence to Laila Sbabou: [lailasbabou@gmail.com](mailto:lailasbabou@gmail.com). Tel: 00212661814001***  
*Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Avenue Ibn Battouta, BP 1014, Rabat 10000, Morocco.*

### **ABSTRACT**

The use of bioresources such as bio-fertilizers especially those using plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), may be a solution for sustainable agriculture that respects the environment and enhance plant growth by a wide variety of mechanisms. The objective of this study is to investigate the effects of some PGPR isolates on the growth, yield and quality of *Crocus sativus* L (saffron). A pilot experiment was conducted in a 1575 m<sup>2</sup> field area in Taliouine which is the main Moroccan region for saffron production. Four different inoculations treatments were set-up to assess the effect of three single bacterial inocula and their mixture. The results obtained after two years show the positives effects of the inoculation on the growth of the aerial and underground parts; the bulbils production and the quality of saffron pistil. These results augur the possibility of using these rhizobacteria as biofertilizers that might be beneficial for saffron culture.

### **Keywords**

*Crocus sativus* L.;PGPR;biofertilizers; yield; quality;Taliouine

### **INTRODUCTION**

*Crocus sativus* L. (saffron) "zaafrane" also called "red gold" is recognized to be the most expensive spice in the world. Because of its worth in, coloring, bitterness and aromatic power of its dried stigmas saffron is used in food, perfumes and cosmetics preparations (Gresta et al. 2008). Also, many important therapeutic properties have been credited to saffron (Sampathu et al. 1984).

In the last few years many researchers and farmers have been interested to exploit, study and improve saffron. While, in the past saffron was considered as minor crop and has been neglected and used only for agricultural diversification (Gresta et al. 2008). Some farmers, consider that the high application of chemical fertilizers, promote vegetative growth and increases the yield of saffron, while in contrary an over application of chemical fertilizers by farmers causes degradation of the lands and the environment. However, for a high saffron quality-level, the producers must adopt organic agriculture management techniques (no pesticide application or chemical fertilization). In this way saffron is considered as an alternative plant for low-input agriculture, able to offer good production in sustainable agro-ecosystems (Gresta et al. 2008). Nevertheless, Koocheki and Seyyedi (2015) revealed that organic fertilizer use on *C. sativus* L. showed a benefice on mother corms size and on flower yield that was more pronounced and significantly higher than the use of chemical fertilizer. On the other hand, the study of Sharaf-Eldin et al. (2008) suggests that the application of *Bacillus subtilis* provides interesting benefit to saffron growers by speeding corm growth, increasing stigma biomass yield, higher the levels of chemical constituents (crocin, crocetin, picrocrocine, and safranal) that prove the plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) usefulness in saffron agriculture. Moreover, PGPRs can also be used as a bio-fungicide for corm rot diseases in *C. sativus* (Gupta and Vakhlu 2015).

In recent years the use of microbial inoculants like PGPR as biofertilizers represents a potential way to decrease negative environmental impacts resulting from continued use of chemical fertilizers (Pérez-Montaña et al. 2014) or pesticides and represent a new dimension for sustainable agriculture and environmental development (Bhattacharyya and Jha 2011). The use of bioresources such as bio-fertilizers containing PGPR, may be part of the solution for sustainable agriculture. Indeed, PGPRs have been studied as possible inoculants for increasing plant productivity (Kloepper et al. 1991), even under different climates (Mengual et al. 2015) and for reducing chemical inputs in agriculture.

The rhizobacteria enhance plant growth by a panel of different direct or indirect mechanisms. Directly such as the synthesis of phytohormones and growth regulators (Castillo et al. 2015) like Auxin (*indole-3-acetic acid* (IAA)) (Khan et al. 2016), gibberellins (Kang et al. 2014), cytokinins (Timmusk et al. 1999) and the abscisic acid (Porcel et al. 2014). Some rhizobacteria enhance the bioavailability of the mineral elements (Okon et al. 2015), like phosphate solubilization and siderophore production (Kang et al. 2014) and others produce volatile compounds, vitamins and amino acids metabolites (Babalola 2010). PGPR that indirectly enhance plant growth include those that can suppress phytopathogens by a synthesis of anti-



fungal metabolites such as antibiotics, fungal cell wall lysing enzymes, or hydrogen cyanide, those that successfully compete with pathogens for nutrients or specific niches on the root and those able to induce systemic resistance (Singh, Pandey, and Singh 2011).

In this general context, the prime objective of this study was to ensure an *in situ* monitoring of the growth of *C. sativus* following an inoculation using saffron rhizobacteria strains that were previously isolated and selected. This study was started in 2013 and consisted of, a soil sampling from Taliouine (Morocco) and its physicochemical analyses, the isolation and screening of growth-promoting rhizobacteria (rhizospheric soil of saffron) and an *in situ* inoculation pilot experiment using three selected PGPR strains.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study zone**

Experiments were carried out in “1.2.3. SAFRAN” farm located in Talakhat-Taliouine (Morocco) (N30°28'12.997"/W7°46'22.479") which belongs to Taroudant province, Souss-Massa-Daraa region. The studied area is bordered in the North by the Province of El Haouz, in the West by Aoulouz (Taroudant Province), in the East by Taznakht (Ouarzazate Province) and in the South by Tata Province (Figure 1). The climate of this mountainous zone is steppe, according to the classification of Köppen-Geiger is the BSK climate type. July is the driest month of the year with less than 1mm of rain while November is the highest rainfall month with an average of 47 mm. The highest average temperature of hottest month of the year, August, is 26.4 °C. While, January is the coldest month of the year with an average temperature of 8.7 °C (source: CLIMATE-DATA.ORG, <http://fr.climatedata.org/location/37264/>) (Aziz and Sadok, 2015).

### **Assessment of the physicochemical properties of saffron soil of Taliouine**

The physicochemical analysis of saffron soils was conducted in 2013 by «Laboratoire des Moyens Analytiques de l'Institut de Recherche pour le Développement (LAMA, IRD), Dakar, Senegal». Soil physical characteristics were determined according to the method of Gee and Bauder (1986) and exchangeable cations following the method of Thomas (1982). The percentage of total carbon and nitrogen was quantified using the combustion system Thermo-Finnigan Flash EA 1112 (Thermo-Finnigan, France). The colorimetric determination of total and available phosphorus was performed according to the method of Dabin (1965). Soil pH values were measured in 2M KCl suspensions at a solid-liquid ratio of 1:2.5 (Ibou et al. 2015).

### **Experimental design**

The experimental device was a randomized complete block design with five treatments (T1, T2, T3, T4 and T5) and three replicates (3plots) by treatment. The surface area used is about 1575 m<sup>2</sup> with an elementary plot of about 8m x 7.5m (60m<sup>2</sup>). The saffron culture in the current experimental zone was done according to modern methods. Each plot of the 15 ones contained 9 ridges (50 cm of width) with 4 rows (7.5m of length) per ridge. Approximately 150 corms of saffron are planted per row with a density of 20 to 30 corms per square meter and at a distance of 5 to 6 cm between corms in a depth of 10cm. The spaces between the corms are necessary for their growth and multiplication in the further years of culture.

### **Inoculum conception**

The three PGPR bacteria used in this field inoculation trial were selected from a collection of 89 isolates, previously recovered from saffron rhizospheric soil, samples basing on their biological activities (phosphate solubilization, siderophore and auxin production) (data not published).

The strain S11P1 (T2) was isolated on the Pikovskaya (PVK) medium. Phosphate solubilization activity was indicated by transparent halos around the colonies on solid PVK medium containing rockphosphate (Xie, Knight, and Leggett 2009). This activity was confirmed by a quantitative test (Tandon, Cescas, and Tyner 1968) with a high release of phosphate in liquid medium (42.2 mg/ml  $\pm$  0.85). The strain S12S4 (T3) was isolated on the selective MODI medium devoided of iron. This strain showed the best Siderophores production activity as estimated by the CAS test (Berraho et al. 1997). This result was confirmed by the semi-quantitative test proposed by He et al. (2013) with a ratio A/AR of 0.020, which indicated that this strain can be considered as the most producing of iron-chelating molecules in our strains collection. The last strain used in the field inoculation trial (S11A1a) was selected as the best producer of auxin in YEM-Tryptophan medium. The colorimetric method of Salkowsky (Glickmann and Dessaux 1995) used for quantification of auxin production showed that this strain produced 124  $\mu$ g/ml  $\pm$  4.03 of auxin in the medium.

For the inoculum preparation, each of the three bacteria was grown in liquid YEM medium shaken at 180 rpm during 24h at 28°C. The microbial inoculum concentration was approximately 10<sup>8</sup>UFC/ml.

The treatment 5 (T5) was prepared by mixing equal amounts of the three strains S11P1, S12S4 and S11A1a. In order to avoid any competition or antagonistic effects between the three strains of the mixture, an antagonism test was performed by the double-agar layer technique described by Vidaver et al. (1972).

### **Bacterial inoculum molecular identification**

Strain identification was done using an amplification of 16S rDNA gene in the both senses using the universal primers 1488 and 41F by MyTaq™ HSMix (Bioline, London, UK) in 25 µl mix final volume. The PCR program was carried as follows: initial denaturation for 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 40s, annealing at 64 °C for 45s and extension at 72 °C for 1 min 30 s and a final extension at 72°C for 7 min. Purified PCR products were sequenced on the both senses (Genoscreen, Lille, France).

### **Saffron corms inoculation**

Field studies were conducted during 2013–2014 and 2014–2015 growing seasons. The corms used were selected to be in regular shape, medium consistency and also healthy and in good quality. In the inoculation, the corms are soaked in the corresponding inoculum for 25min which is the only modification of protocol of Sharaf-Eldin et al. (2008).

A first inoculation was done in September 2013 (early stage in the saffron growing cycle) and two reminders of inoculation were made in Mars 2014 (corms multiplication stage) and in September 2014 by spraying the bacterial inoculum on saffron culture.

### **Data collection and parameters measurements after the inoculation**

During the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> harvesting seasons of saffron (November: 2013, 2014 and 2015), we measured the quantity of flowers and stigmas. While in the 3<sup>rd</sup> harvesting season and in order to estimate the impact of PGPR inoculation on *C. sativus* plants development we measured the growth parameters related to leaves, corms and roots. These measurements were done within the 3<sup>rd</sup> and last growing season of this experiment corresponding to two complete cycles of saffron growth and by the end of corms multiplication (April 2015). Indeed, we pulled-out corms in a 0.5m×0.5m quadrat per plot and investigated the following parameters: Leaf Number (LN), Leaf Length (LL), Leaf Fresh Weight(LWW), Leaf Dry Weight(LDW), Mother corms Number (MN), Mother corms Fresh Weight(MWW), Mother corms Dry Weight (MDW), Daughter corms Number (DN), Daughter corms Fresh Weight (DWW), Daughter corms Dry Weight(DDW) and Root Length (RL).

### **Estimation of chlorophyll content**

The leaf concentration of chlorophyll was analyzed by estimating the content of chlorophyll a (Chla), chlorophyll b (Chlb) and total chlorophyll by spectrophotometry (645 nm and 663 nm) (Bassa et al. 2012).

### **Quality assessment of the saffron samples**

In order to evaluate the effect of inoculation on the quality of saffron, we performed a

spectrophotometric analysis of the secondary metabolites extracted from dried stigmas. The spectrophotometric analysis ultraviolet–visible was performed according to the ISO 3632-2010 standard. The absorbance of stigmas extract at 257 nm, 330 nm and 440 nm was measured to determine the rate of picrocrocin (bitterness), the rate of safranal (aromas) and the rate of crocin (coloring) respectively. Two stigmas drying techniques were used and compared to better the quality of saffron. A forced-air oven was used under a temperature of 64°C during 45-55 minutes, and a shade drying method was also done for one to two days, until we obtain a relative humidity of stigmas subordinate or equal to 12%. All analyses were carried out in triplicate.

### **Statistical analysis**

The various parameters estimated were statistically inspected using an analysis of variance (ANOVA) by the software XLSTAT. The comparison of the averages examined by the test of Fisher (LSD) with a 5 % probability threshold was run to estimate the effects of PGPR on the production, growth and the quality of saffron. Principal component analysis (PCA) was carried out using the software XLSTAT and correlation analysis by using the EXCEL program (2013).

## **RESULTS**

### **Physicochemical characteristics of saffron soil**

The physicochemical analyses of soil showed that the saffron soil in Taliouine is alkaline with a sandy clay loam texture (Clays: 21.80%, Fine silt: 11.90%, Coarse silt: 11.20%, Fine sands:43.20%, Coarse-grained:11.40%), with a low percentage of nitrogen (0.04%), Total carbon (0.89%) and an elevated C/N ration (22) and a weak content in mineralizable organic matter. The available phosphorus (18 mg/kg) in this soil is very low and the pH<sub>H2O</sub> was 8.3 while pH<sub>KCl</sub> was 7.6, which indicate a moderately alkaline soil.

### **The molecular identification of bacterial inoculum**

The three rhizobacterial strains used as saffron inocula were identified by sequencing the 16S rDNA gene. The S11P1 strain was identified as *Rahnella aquatilis* and the 16S rDNA sequence was deposited in NCBI under the accession number KU569634. The S12S4 strain was identified as *Variovorax paradoxus* and have KU569613 as Genbank accession number. The 3<sup>rd</sup> strain S11A1a is also identified as *Rahnella aquatilis* and have KU569650 as GenBank accession number.

### **Effects of PGPR on the flowers production of *C. sativus***

In order to determinate the effect of PGPR inoculation on saffron yield we quantified saffron flowers and their stigmas produced during two harvesting seasons following the year of first

inoculation. We found that the 5 treatments applied did not affect the saffron flowers production neither stigmas. No statistical significance was observed.

### **Effects of PGPR on the growth of the aerial part of *C. sativus***

For each treatment, leaves were collected separately from the three replicates plots quadrature. Approximately, 60 mother corms with their bulbils were pulled out and counted for each plot and treatment. Comparing to the control treatment without inoculation (T1) we note that the treatments T3, T4 and T5 showed a positive effect of the PGPR inoculation on leaves number while the T2 treatment negatively affected the leaves number compared to T1. The treatment 4 (corms inoculated by S11A1a) shows the highest effect on leaves number followed by T3 (corms inoculated by S12S4) and by T5 where corms were inoculated by a mix of the three strains (Figure 2).

The leaves collected were measured after the harvest for fresh weight and after the drying for dry weight. The comparison of the dry and fresh weigh gave similar results. Figure 3 shows that T3 affected significantly the foliar biomass compared to T1.

The PGPR inoculation impact on saffron growth assessed using chlorophyll estimation demonstrated that all the inocula tested (T2, T3, T4 and T5) compared to the control T1 displayed a positive effect on total chl, chla and chlb. Otherwise, a significant difference between T5 and T4 compared to T1 was observed. Indeed, the T5 showed a high content of total chl and also chlb and the T4 was the treatment that revealed a high content of chla (Figure 4).

Concerning leaf length no significant differences were detected between the different treatments and the control meaning that the inoculations did not influence the leaves length.

### **Effects of PGPR on the growth of the underground part of *C. sativus***

In order to estimate the impact of inoculation on corms multiplication and biomass we pulled out mother corms and bulbils (daughter corms). The multiplication and biomass parameters of corms were estimated by counting and weighting the mother corms and bulbils separately.

The mother corms production estimated by their amount was significantly increased in three inoculation treatments T5, T2 and T4 compared to the control (Figure 5). Within these three inoculation treatments, the mix inoculum T5 seems to have the highest positive influence on corms production followed by T2 and T4.

Moreover, the bulbils production which corresponds to mother corms multiplications was significantly increased in all the treatments comparing to the control. Thus, we found that T4, T3 and T5 showed respectively an increase of 1.91; 1.46 and 1.43 times more than T1.

The inoculated treatments revealed a significant negative effect on both fresh and dry mother corms biomass. T2, T4 and T5 were the most influencing ones comparing to T1. Hence the four inoculations treatments influenced differently the bulbils biomass (Figure 6). Indeed, a positive inoculation effect on dry and fresh biomass was observed for T3 and T4. While T2 treatment produced the lowest biomass that is less than the control one. The inoculation mix treatment had similar effect than the T1 treatment.

We measured the roots length of corms and noticed that it not influenced by the inoculations and that the data was similar to the control with no treatment.

### **Correlation analysis between the PGPR inoculation treatments and the measured parameters**

Generally, each bacterial inoculum tested affected differently the development of saffron plant. According to the principal component analysis (PCA) represented in the Figure 7. The inoculation with the strain S11P1 (T2) influences remarkably the growth of corms by increasing the mother corms numbers. While, the leaves and daughter corms biomass were influenced positively by the strain S12S4 (T3). We also noticed that, the content of chl<sub>a</sub>, daughter corms abundance and leaves number were increased by the inoculation with the rhizobacteria strain S11A1a (T4). In another hand, when the inoculation was performed with a bacterial mix (T5) composed by the three PGPR strains, three parameters (chl<sub>a</sub>, chl<sub>b</sub> and mother corms number) were increased.

### **Correlation analysis between the different parameters measured**

The correlation matrix between the 16 parameters measured showed that we have 31 positive correlations ( $r > 0.5$ ) and 44 negative correlations. The most interesting correlations that we observed are highlighted in table 1. Leaves number (LN) were positively correlated to the daughter corms (biomass and number) and roots length. Also, LN are highly correlated to leaves biomass (LWW and LDW) that are positively correlated to mother corms biomass which is also correlated to leaves length LL. Otherwise, mother corms biomass is negatively correlated to roots length RL and daughter corms biomass which is also negatively correlated to LL. We also noticed that RL are positively correlated to the LN, leaves biomass and daughter corms biomass.

### **Assessment of secondary metabolites contents of saffron samples**

The analysis of secondary metabolites: picrocrocin, safranal and crocin contents was performed using ultraviolet–visiblespectrometric method according to the international ISO standard 3632-2010. Some slight differences in the secondary metabolites contents were observed between the treatments either when saffron stigmas were dried in the oven or in the shade. We

noticed that T4 treatment gave results that were significantly higher than those of the control plants when saffron stigmas were dried in the oven. While, the T2 treatment showed a better result compared to T1 and to other treatments when saffron stigmas were dried on the shade.

## DISCUSSION

In the present study, we have studied the possible utilization of the *C. sativus* rhizobacteria as biofertilizers for saffron, one of the rarest and most expensive medicinal plants in the world. However, the production of saffron in Morocco, one of the producer countries, is still challenging and a crop improvement is well needed.

Soil analysis indicated that saffron is cultivated in a very poor alkaline sandy clay loam soil that needs to be supplemented with organic matter and mineral fertilizers to improve its fertility. From a collection of 89 rhizobacteria isolated from saffron rhizospheric soil, we selected three isolates based on their highest levels of biological activities (Phosphate solubilization, siderophores and auxin production). A field experiment was carried out in Taliouine (South of Morocco) and was conducted to test the impact of these PGP rhizobacterial strains on growth, yield and improvement of secondary metabolites contents of saffron stigmas.

The trial experiment (plantation and inoculation) was set up in September 2013 and within the harvesting season of the same year, a very low saffron flowering was observed due to acclimatization of corms in the soil and the environment (Koocheki and Seyyedi, 2015).

While during the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> harvesting season, the different PGPR inoculations did not affect saffron flowers production. According to Gresta et al. (2008), the flowering is a critical parameter that can be influenced by several agronomic, biological and environmental factors. Indeed, during our experiment, Taliouine has faced several climatic changes: a temperature increase and the scarce rainfall that maybe have induced an increase in evapotranspiration causing the drying of saffron corms and affecting their reproduction (Aziz and Sadok 2015).

Noting that the flowers yield is a difficult parameter to predict in saffron because it depends on many agronomic, biological and environmental factors that are able to exercise a great influence on production (Gresta et al. 2008). Especially, these last two years, flowering time and the decrease of the yield of saffron were recorded, because the temperature is an important factor in the appearance and the induction of saffron flowering time with a particular combination of the temperature and the soilwater content (Gresta et al. 2009). Flower induction is a very complicated mechanism in saffron with a very little information available about that mechanism. Nevertheless, flowering seems to be mainly influenced by environmental factors (Gresta et al. 2008). Furthermore, the growth of saffron shows very important development



with PGPR inoculation. The statistical studies show a significant growth improvement in saffron when inoculated with the rhizobacterial strain S11P1 (T2) compared to the control, especially on the mother corms number able of giving bulbils in the next season, affect also positively but slightly the length of leaves, the concentrations of chl<sub>a</sub>, chl<sub>b</sub> and total chl and on the other growth parameters. The rhizobacteria S11P1 was characterized *in vitro* and expressed a high capacity of phosphate rock solubilization which suggests that *in vivo* the bacteria can quickly solubilize the inorganic adsorbed phosphate present in most soils. The 16S rDNA sequence revealed that the bacteria S11P1 belong the species *Rahnella aquatilis*, known as PGP rhizobacteria regarding the different biological activities that they exhibit like the production of biosurfactants/ biostimulants, ACC deaminase activity (Pacwa-Płociniczak et al. 2016) and the ability to accumulate heavy metals (Jebara et al. 2014).

*Variovorax paradoxus*, is the rhizobacterial strain S12S4 used as inoculum in T3 test, isolated from the rhizospheric soil of saffron on MODI medium devoided of iron. The CAS test and the semi-quantitative test of siderophores production revealed that the S12S4 is considered as the most producing of iron-chelating. Inoculation test by this bacterium shows a positive and significant effect on the biomass of the saffron plant, by increasing fresh and dry weight of leaves, fresh and dry weight of daughter corms. Also, inoculation with S12S4 bacterium revealed a slight positive effect on the other parameters of growth of saffron, demonstrated by a positive correlation between the weight of leaves and daughter corm weight ( $r > 0.90$ ), which suggested the beneficial and the important effect of inoculation on the aerial part especially the biomass of leaves (Table. 1). In general *Variovorax paradoxus* strain affects mainly saffron biomass, which might be explained probably by the strong production of siderophores that can facilitate iron acquisition (Ahemad and Kibret 2014), bio-absorption of zinc (Malkoc, Kaynak, and Guven 2015). Some *Variovorax paradoxus* strains exhibit also the 1-aminocyclo- propane-1-carboxylate deaminase activity, which can act for increasing plants growth under stress conditions (Gao et al. 2015). In a recent study Wang et al. (2016) have shown that effectively the inoculation with *Variovorax paradoxus* affects positively the biomass of *Pisum sativum* L. cv. *Alderman* plant under salt stress, enhances until 54 % the root system and the K<sup>+</sup>- absorption, helps in alleviating the effect of salt stress on the plant and increases the photosynthetic efficiency.

Strain S11A1a, the best producer of auxin in the collection of saffron isolates, was identified by 16S rDNA sequencing as a strain of *Rahnella aquatilis*. In the field experiment, this rhizobacterium affects positively and remarkably the content of chl<sub>a</sub>, the number of leaves and

the number of daughter corms. The increase of the number of leaves after the inoculation induced the high biomass in leaves mentioned by the strong positive correlation coefficient  $r > 0.90$  and the stimulation of the budding showed by the high number of bulbils number  $r > 0.70$ . The endogenous pool of plant IAA may be altered by the acquisition of IAA that has been secreted by soil bacteria and interfere with the physiological processes of plants by changing the plant auxin pool. Moreover, bacterial IAA increases the root surface area and length, and thereby provides the plant a greater access to soil nutrients. Also, rhizobacterial IAA loosens plant cell walls and as a result facilitates an increasing amount of root exudation that provides additional nutrients to support the growth of rhizosphere bacteria (Glick and Glick 2012).

The idea to test a bacterial mix is for gathering the properties of these three PGP rhizobacteria (S11P1, S12S4 and S11A1a) in only one inoculum T5. The results of the field experiment show that the inoculation with the mixture acts on the photosynthetic efficiency by increasing the content of chlorophyll b, total chlorophyll, and increase the mother corms number.

Generally, all the rhizobacteria influenced positively the photosynthetic capacity of saffron leaves compared to the control. According to Gresta et al. (2008) the photosynthetic activity of leaves allows the formation of replacement corms, which explains the correlation between the concentrations of chlorophyll and the multiplication of corms compared with reduces bulbils number of the control.

Both strains S11A1a used in T4 and S12S4 used in T2 were identified as belonging to the species *Rahnella aquatilis*. By comparing every treatment, we notice that the T2 treatment allowed an increase of mother corms number and lower bulbils number. On the contrary, the T4 treatment induced a low mother corms number and high bulbils number. A negative correlation was noticed between the mother corms number and daughter corms numbers. In fact, when the mother corms number increases the daughter corms decreases. From these results it can be deduced that the rhizobacterium strain S11A1a (T4) influences the stimulation of the budding what gives a high bulbils number which causes then the degeneration of the mother corms and consequently reduces mother corms number as seen in our results. On the other hand, treatment T2 (S12S4) showed a low bulbils number, which explains the higher mother corms number as a result of the absence of mother corms degeneration. However inoculated treatments gave better results in yield compared with the control non-inoculated, which proves that the inoculum positively influences the stimulation of the budding and enhances the multiplication of saffron corms and the most important the mother corms size. Indeed, mother corms size is related to the daughter corms number. According to Gresta et al. (2008), each mother corm

produces 1–3 medium-big daughter corms from April buds and several small corms from lateral buds, depending on the size of the mother corm and the average size of replacement corms is inversely related to their number. On the other hand and in addition to mother corm size, balanced nutrients availability, especially nitrogen and phosphorus, are one of the most important factors affecting daughter corms growth directly during the growing season (Koocheki and Seyyedi, 2015). Generally, the positive results we obtained with PGPR inoculation of saffron plants are in accordance with those of Sharaf-Eldin et al. (2008) who showed that the rhizobacteria *Bacillus subtilis* positively influences the growth and the quality of saffron by increasing the rate of the three key secondary molecules Crocin, Picrocrocin and Safranal. The content of these molecules in dried stigmas influences the quality of saffron because they impact the value of the spice in Market. In various regions of the world, saffron is dried different ways (shade, heating system, electric ovens, sunlight... etc) and drying practices are known to affect the final composition of saffron. Crocins and picrocrocin compounds are degraded naturally in the cells of stigmas during drying, and the degree of degradation depends on temperature, humidity, light irradiation and other factors (Lage and Cantrell 2009). We tried two drying techniques: in the shade and in the oven. The four inoculation treatments (T2-T3-T4 and T5) exhibited a positive effect on the quality of saffron dried in the shade or in the forced-air oven compared to the control. While T4 treatment showed the highest chemical constituents when stigma were dried in the oven and T2 when the stigma dried in the shade compared to the control. We can explain this results by the fact that the rhizosphere microbes are best known to act as biotic elicitors, which can induce the synthesis of secondary products in plants (Sekar and Kandavel 2010). Ajmalicine, serpentine, picrocrocin, crocetin, hyoscyamine and scopolamine, safranal compounds, and tanshinone are recorded as the important metabolites induced by PGPR species in eliciting the physiological and morphological responses in crop plants (Shrivastava, Egamberdieva, and Varma 2015). However, selecting and inoculating specific and efficient bacteria for a particular plant are essential for the cultivation of medicinal plants in order to obtain the high-quality secondary plant metabolites (Ghorbanpour et al. 2015).

## **CONCLUSION**

In conclusion, the results of this study suggest that inoculation with the PGPRs provide some benefit effect to saffron compared to the control. The PGPRs tested and their mix influence positively the growth of saffron plant by increasing the growth of the aerial part, on the multiplication, the corms biomass and the quality of saffron by the stimulation the production

of the secondary metabolite. Which suggests that the inoculation of PGPR is a sustainable technology to enhance the quantity and quality of this interesting medicinal plant.

## ACKNOWLEDGMENTS

Authors thanks Dr. Hafid BAROUDI (1.2.3 SAFRAN) for the financial support and the technical help in Taliouine (field and corms supplies).

## REFERENCES

- Ahemad, M., and M. Kibret. 2014. Mechanisms and Applications of Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Current Perspective. *Journal of King Saud University - Science* 26, no. 1 (January): 1–20.
- Aziz, L., and W. Sadok. 2015. Strategies Used by the Saffron Producers of Taliouine (Morocco) to Adapt to Climate Change. *Journal of Alpine Research | Revue de Géographie Alpineno*. 103–2 (September 7). <https://rga.revues.org/2902>.
- Babalola, O.O. 2010. Beneficial Bacteria of Agricultural Importance. *Biotechnology Letters* 32, no. 11 (November 1): 1559–1570.
- Bassa, C., I. Mila, M. Bouzayen, and C. Audran-Delalande. 2012. Phenotypes Associated with Down-Regulation of Sl-IAA27 Support Functional Diversity Among Aux/IAA Family Members in Tomato. *Plant and Cell Physiology* 53, no. 9 (January 9): 1583–1595.
- Berraho, E., D. Lesueur, H.G. Diem, and A. Sasson. 1997. Iron Requirement and Siderophore Production in *Rhizobium Ciceri* during Growth on an Iron-Deficient Medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13, no. 5 (September 1): 501–510.
- Bhattacharyya, P.N., and D.K. Jha. 2011. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, no. 4 (December 24): 1327–1350.
- Castillo, P., R. Molina, A. Andrade, A. Vigliocco, S. Alemano, and F.D. Cassán. 2015. Phytohormones and Other Plant Growth Regulators Produced by PGPR: The Genus *Azospirillum*. In *Handbook for Azospirillum*, ed. F.D. Cassán, Y. Okon, and C.M. Creus, 115–138. Springer International Publishing. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-06542-7\\_7](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-06542-7_7).
- Dabin, B. 1965. Dosage de l'azote Total Dans Les Sols Par La Methode de Kjeldahl. *Cahiers Office de La Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Serie Pedologie* 3: 338–48.

- Gao, J., M. Yuan, X. Wang, T. Qiu, J. Li, H. Liu, X. Li, J. Chen, and J. Sun. 2015. *Variovorax Guangxiensis* Sp. Nov., an Aerobic, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase Producing Bacterium Isolated from Banana Rhizosphere. *Antonie van Leeuwenhoek* 1, no. 107: 65–72.
- Gee, G.W., and J.W. Bauder. 1986. Particle-Size Analysis. *Methods of Soil Analysis: Part 1—Physical and Mineralogical Methods* sssabookseries, no. methodsofsoilan1 (January): 383–411.
- Ghorbanpour, M., M. Hatami, K. Kariman, and K. Khavazi. 2015. Enhanced Efficiency of Medicinal and Aromatic Plants by PGPRs. In *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants*, 43–70. Soil Biology. Springer, Cham. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-13401-7\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-13401-7_3).
- Glick, B.R., and B.R. Glick. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications, Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica, Scientifica* 2012, 2012 (October 11): e963401.
- Glickmann, E., and Y. Dessaux. 1995. A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61, no. 2 (February): 793–796.
- Gresta, F., G. Avola, G.M. Lombardo, L. Siracusa, and G. Ruberto. 2009. Analysis of Flowering, Stigmas Yield and Qualitative Traits of Saffron (*Crocus Sativus* L.) as Affected by Environmental Conditions. *Scientia Horticulturae* 119, no. 3 (February 3): 320–324.
- Gresta, F., G.M. Lombardo, L. Siracusa, and G. Ruberto. 2008. Saffron, an Alternative Crop for Sustainable Agricultural Systems. A Review. *Agronomy for Sustainable Development* 28, no. 1 (March): 95–112.
- Gupta, R., and J. Vakhlu. 2015. Native *Bacillus Amyloliquefaciens* W2 as a Potential Biocontrol for *Fusarium Oxysporum* R1 Causing Corm Rot of *Crocus Sativus*. *European Journal of Plant Pathology* 143, no. 1 (September 1): 123–131.
- He, H., Z. Ye, D. Yang, J. Yan, L. Xiao, T. Zhong, M. Yuan, X. Cai, Z. Fang, and Y. Jing. 2013. Characterization of Endophytic *Rahnella* Sp. JN6 from *Polygonum Pubescens* and Its Potential in Promoting Growth and Cd, Pb, Zn Uptake by *Brassica Napus*. *Chemosphere* 90, no. 6 (February): 1960–1965.
- Ibou, D., N. Fatou, K. Aboubacry, K.W. Tatiana, P. Alessandra, A.D.R. Francis, N. Kandioura, and P. Yves. 2015. Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) Communities Associated with

- Cowpea in Two Ecological Site Conditions in Senegal. *African Journal of Microbiology Research* 9, no. 21 (May 27): 1409–1418.
- Jebara, S.H., O. Saadani, I.C. Fatnassi, M. Chiboub, S. Abdelkrim, and M. Jebara. 2014. Inoculation of *Lens Culinaris* with Pb-Resistant Bacteria Shows Potential for Phytostabilization. *Environmental Science and Pollution Research* 22, no. 4 (September 4): 2537–2545.
- Kang, S.-M., M. Waqas, A.L. Khan, and I.-J. Lee. 2014. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria: Potential Candidates for Gibberellins Production and Crop Growth Promotion. In *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses, Volume 1*, 1–19. Springer, New York, NY. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-9466-9\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-9466-9_1).
- Khan, A.L., B.A. Halo, A. Elyassi, S. Ali, K. Al-Hosni, J. Hussain, A. Al-Harrasi, and I.-J. Lee. 2016. Indole Acetic Acid and ACC Deaminase from Endophytic Bacteria Improves the Growth of *Solanum Lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology* 21 (May): 58–64.
- Kloepper, J.W., R. Rodríguez-Kábana, J.A. McInroy, and D.J. Collins. 1991. Analysis of Populations and Physiological Characterization of Microorganisms in Rhizospheres of Plants with Antagonistic Properties to Phytopathogenic Nematodes. *Plant and Soil* 136, no. 1 (September): 95–102.
- Koocheki, A., and S.M. Seyyedi. 2015. Relationship between Nitrogen and Phosphorus Use Efficiency in Saffron (*Crocus Sativus* L.) as Affected by Mother Corm Size and Fertilization. *Industrial Crops and Products* 71 (September): 128–137.
- Lage, M., and C.L. Cantrell. 2009. Quantification of Saffron (*Crocus Sativus* L.) Metabolites Crocins, Picrocrocin and Safranal for Quality Determination of the Spice Grown under Different Environmental Moroccan Conditions. *Scientia Horticulturae* 121, no. 3 (July 2): 366–373.
- Malkoc, S., E. Kaynak, and K. Guven. 2015. Biosorption of Zinc(II) on Dead and Living Biomass of *Variovorax Paradoxus* and *Arthrobacter Viscosus*. *Desalination and Water Treatment* 0, no. 0 (July 27): 1–10.
- Mengual, C., M. Schoebitz, F. Caravaca, and A. Roldán. 2015. Assessment of the Potential Role of Streptomyces Strains in the Revegetation of Semiarid Sites: The Relative Incidence of Strain Origin and Plantation Site on Plant Performance and Soil Quality Indicators. *Biology and Fertility of Soils* 52, no. 1 (September 4): 53–64.

- Okon, Y., C. Labandera-Gonzales, M. Lage, and P. Lage. 2015. Agronomic Applications of *Azospirillum* and Other PGPR. In *Biological Nitrogen Fixation*, ed. F.J. de Bruijn, 925–936. John Wiley & Sons, Inc. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119053095.ch90/summary>.
- Pacwa-Płociniczak, M., T. Płociniczak, J. Iwan, M. Żarska, M. Chorążewski, M. Dzida, and Z. Piotrowska-Seget. 2016. Isolation of Hydrocarbon-Degrading and Biosurfactant-Producing Bacteria and Assessment Their Plant Growth-Promoting Traits. *Journal of Environmental Management* 168 (March 1): 175–184.
- Pérez-Montaña, F., C. Alías-Villegas, R.A. Bellogín, P. del Cerro, M.R. Espuny, I. Jiménez-Guerrero, F.J. López-Baena, F.J. Ollero, and T. Cubo. 2014. Plant Growth Promotion in Cereal and Leguminous Agricultural Important Plants: From Microorganism Capacities to Crop Production. *Microbiological Research* 169, no. 5 (May 1): 325–336.
- Porcel, R., Á.M. Zamarreño, J.M. García-Mina, and R. Aroca. 2014. Involvement of Plant Endogenous ABA in *Bacillus Megaterium* PGPR Activity in Tomato Plants. *BMC Plant Biology* 14, no. 1 (January 25): 36.
- Sampathu, S.R., S. Shivashankar, Y.S. Lewis, and A.B. Wood. 1984. Saffron (*Crocus Sativus* Linn.) — Cultivation, Processing, Chemistry and Standardization. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 20, no. 2 (January 1): 123–157.
- Sekar, S., and D. Kandavel. 2010. Interaction of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Endophytes with Medicinal Plants—new Avenues for Phytochemicals. *Journal of Phytology* 2, no. 7. <https://scienceflora.org/journals/index.php/jp/article/view/2164>.
- Sharaf-Eldin, M., S. Elkholy, J.-A. Fernández, H. Junge, R. Cheetham, J. Guardiola, and P. Weathers. 2008. *Bacillus Subtilis* FZB24® Affects Flower Quantity and Quality of Saffron (*Crocus Sativus*). *Planta Medica* 74, no. 10 (August): 1316–1320.
- Shrivastava, S., D. Egamberdieva, and A. Varma. 2015. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants: The State of the Art. In *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants*, 1–16. Soil Biology. Springer, Cham. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-13401-7\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-13401-7_1).
- Singh, J.S., V.C. Pandey, and D.P. Singh. 2011. Efficient Soil Microorganisms: A New Dimension for Sustainable Agriculture and Environmental Development. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 140, no. 3–4 (March): 339–353.
- Tandon, H.L.S., M.P. Cescas, and E.H. Tyner. 1968. An Acid-Free Vanadate-Molybdate Reagent for the Determination of Total Phosphorus in Soils. *Soil Science Society of America Journal* 32, no. 1: 48–51.



- Thomas, G.W. 1982. Exchangeable Cations. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties* agronomy monogra, no. methodsofsoilan2 (January): 159–165.
- Timmusk, S., B. Nicander, U. Granhall, and E. Tillberg. 1999. Cytokinin Production by *Paenibacillus Polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry* 31, no. 13 (November): 1847–1852.
- Vidaver, A.K., M.L. Mathys, M.E. Thomas, and M.L. Schuster. 1972. Bacteriocins of the Phytopathogens *Pseudomonas Syringae*, *P. Glycinea*, and *P. Phaseolicola*. *Canadian Journal of Microbiology* 18, no. 6 (June 1): 705–713.
- Xie, J., J.D. Knight, and M.E. Leggett. 2009. Comparison of Media Used to Evaluate *Rhizobium Leguminosarum Bivar Viciae* for Phosphate-Solubilizing Ability. *Canadian Journal of Microbiology* 55, no. 7 (July): 910–915.

**Tables**

**Table 1:** Correlation matrix of yield and growth parameter studies of saffron

	QF2014	QF2015	LN	LL	LWW	LDW	Chla	Chlb	Chl	MN	MWW	MDW	DN	DWW	DDW	RL
QF2014	1															
QF2015	0,545	1														
LN	-0,068	-0,139	1													
LL	0,419	0,582	-0,057	1												
LWW	0,043	0,147	0,830	0,432	1											
LDW	0,098	0,175	0,826	0,473	0,992	1										
Cha	-0,161	-0,227	-0,107	0,018	-0,108	-0,136	1									
Chb	0,145	0,363	-0,010	-0,108	-0,012	-0,040	0,145	1								
Cht	-0,051	0,010	-0,089	-0,042	-0,091	-0,127	0,859	0,631	1							
MN	-0,081	0,271	0,041	0,302	0,149	0,171	0,092	0,605	0,385	1						
MWW	0,229	0,611	0,109	0,897	0,575	0,594	0,046	-0,094	-0,012	0,235	1					
MDW	0,215	0,573	0,051	0,892	0,537	0,549	0,065	-0,118	-0,010	0,199	0,993	1				
DN	-0,060	-0,216	0,705	-0,356	0,433	0,401	0,045	0,436	0,261	0,293	-0,286	-0,321	1			
DWW	0,042	-0,097	0,942	0,134	0,906	0,912	-0,163	-0,101	-0,181	-0,045	0,249	0,201	0,554	1		
DDW	0,019	-0,079	0,947	0,152	0,925	0,927	-0,146	-0,083	-0,157	-0,010	0,275	0,227	0,577	0,996	1	
RL	-0,350	-0,051	0,575	-0,156	0,500	0,483	-0,311	-0,066	-0,277	-0,051	0,063	0,013	0,131	0,530	0,521	1

The parameters investigated: Quantity of flowers in the harvests 2014 (QF2014) and Quantity of flowers in the harvests 2015(QF2015). Leaf Number (LN), Leaf Length (LL), Leaf fresh Weight (LWW), Leaf Dry Weight (LDW), Mother corms Number (MN), Mother corms Fresh Weight (MWW), Mother corms Dry Weight (MDW), Daughter corms Number (DN), Daughter corms Fresh Weight (DWW), Daughter corms Dry Weight (DDW) and Root Length (RL).

Figures

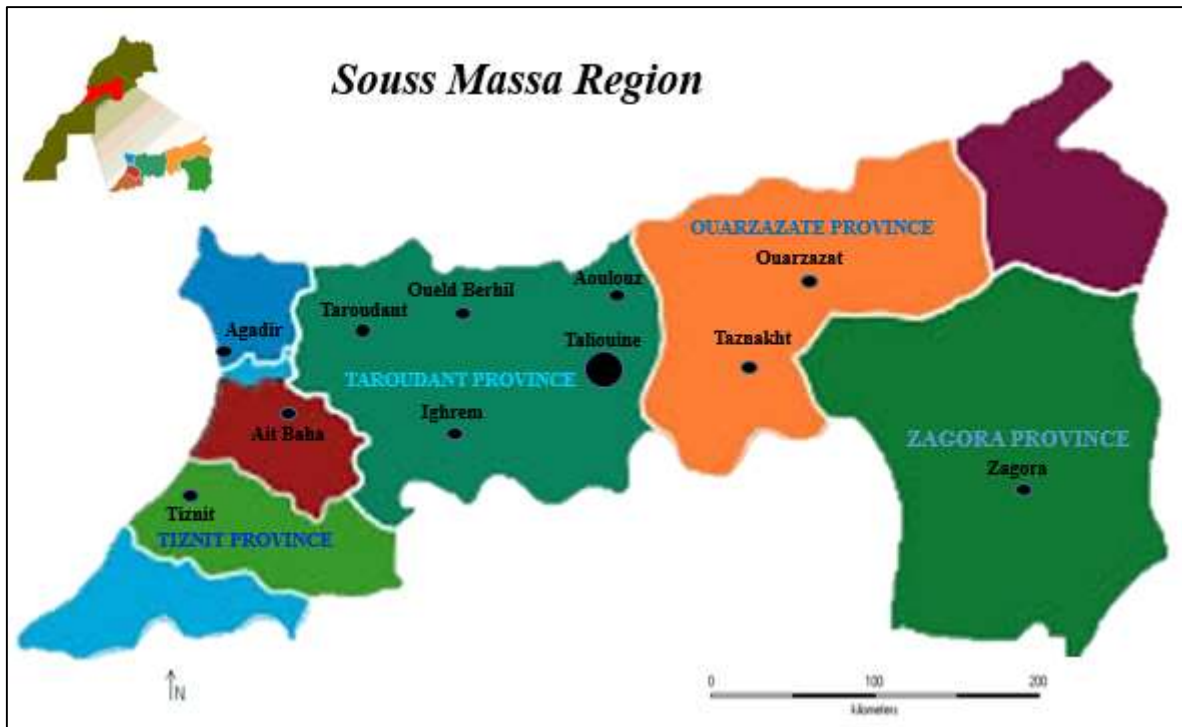
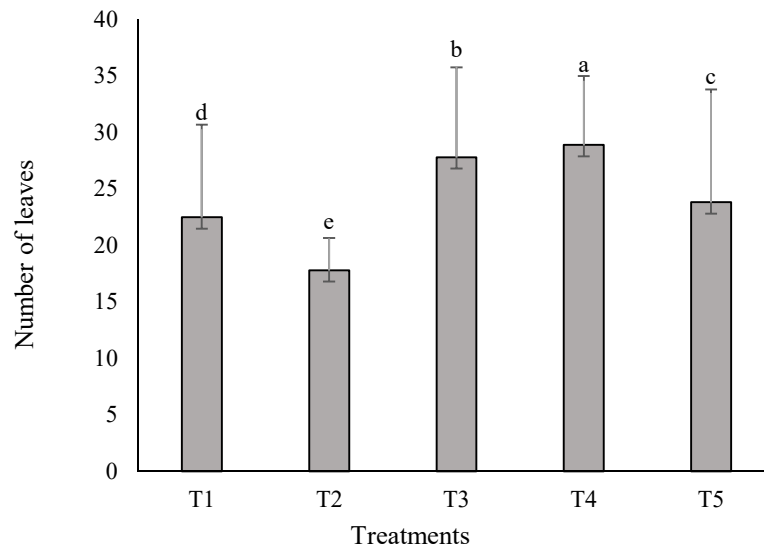
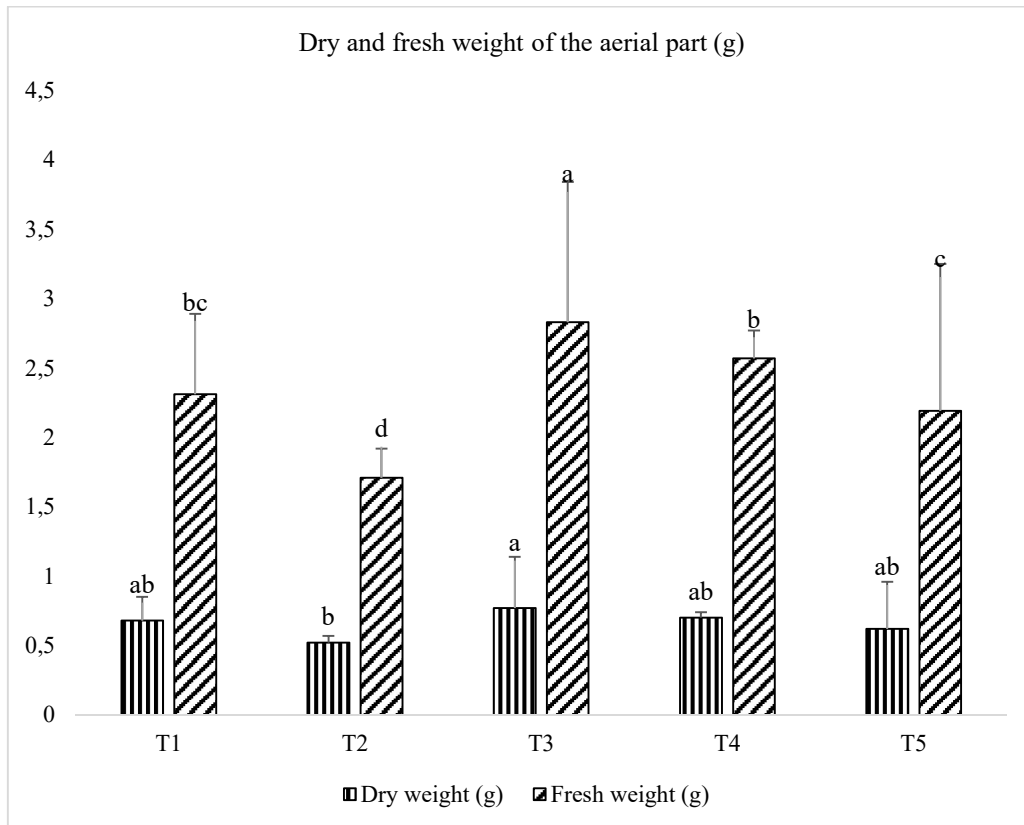


Figure 1: Location of the saffron production area in Morocco- Souss-Massa-Draa region.

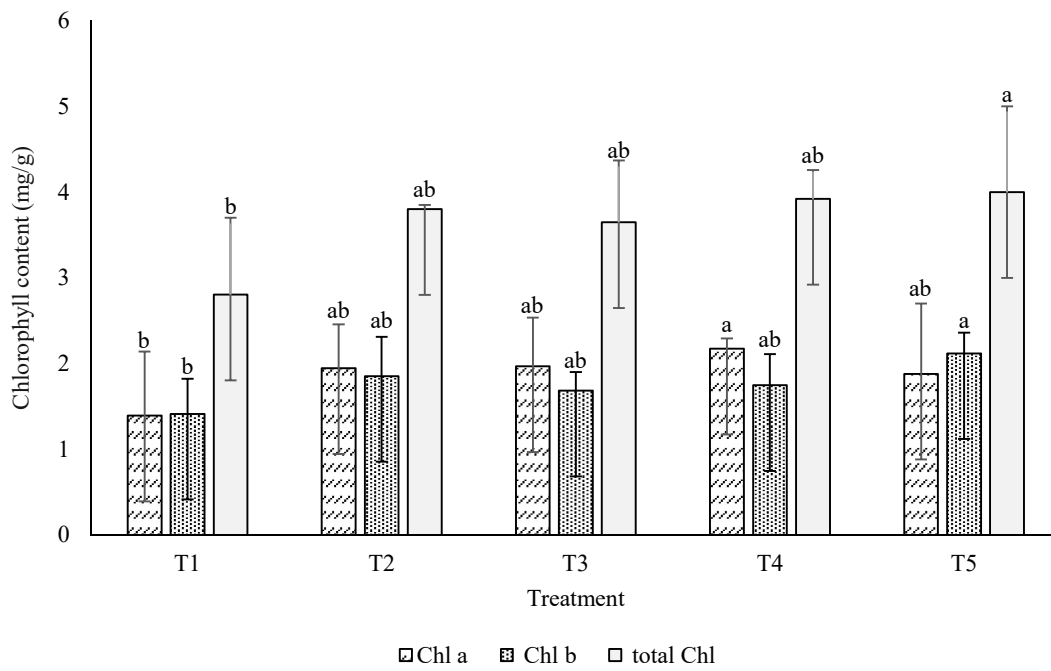


**Figure 2:** Effect of rhizobacterial strains inoculum on the number of leaves of *C.sativus* L.

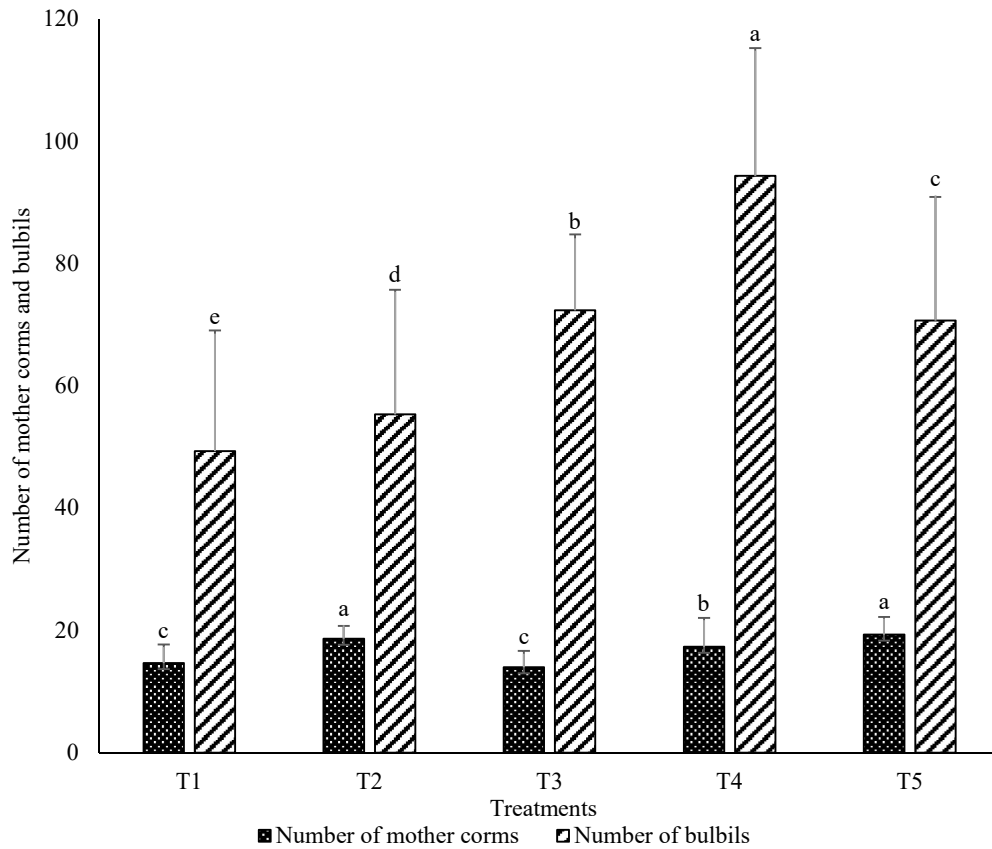
Different letters above the columns indicate significant differences at the  $P < 0.05$  level, according to the Fisher test. Error bars represent means  $\pm$  SE.



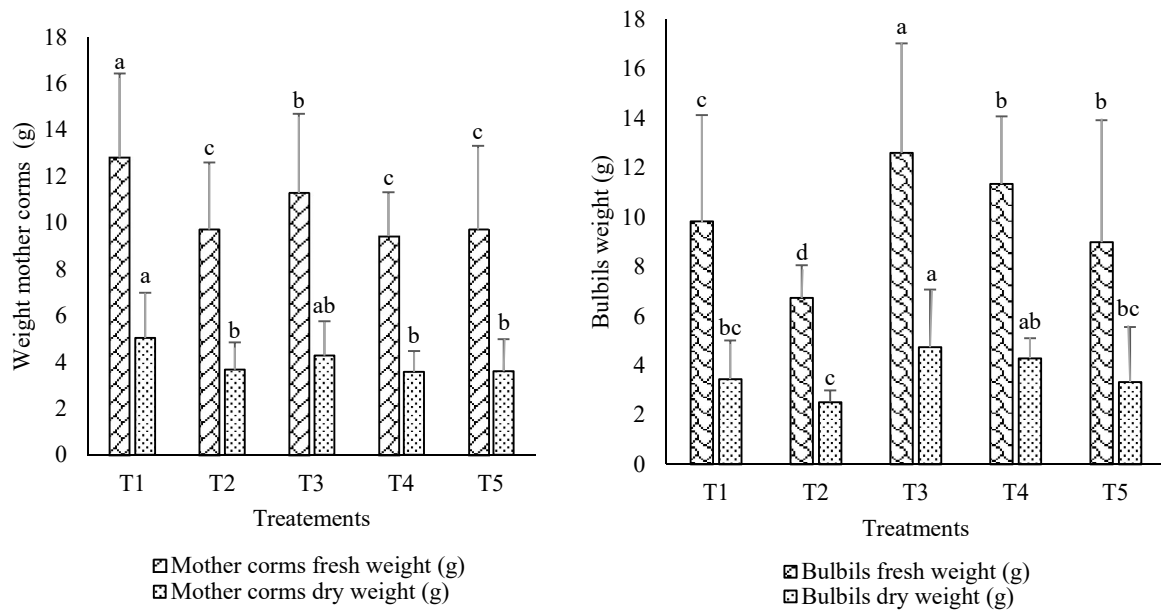
**Figure 3:** Effect of the inoculation by the PGPR on the biomass of aerial part of *C. sativus* L. Different letters above the columns indicate significant differences at the  $P < 0.05$  level, according to the Fisher test. Error bars represent means  $\pm$  SE.



**Figure 4:** Effect of the inoculation with PGPR on the chlorophyll content in leaves of *C. sativus* L. Different letters above the columns indicate significant differences at the  $P < 0.05$  level, according to the Fisher test. Error bars represent means  $\pm$  SE.

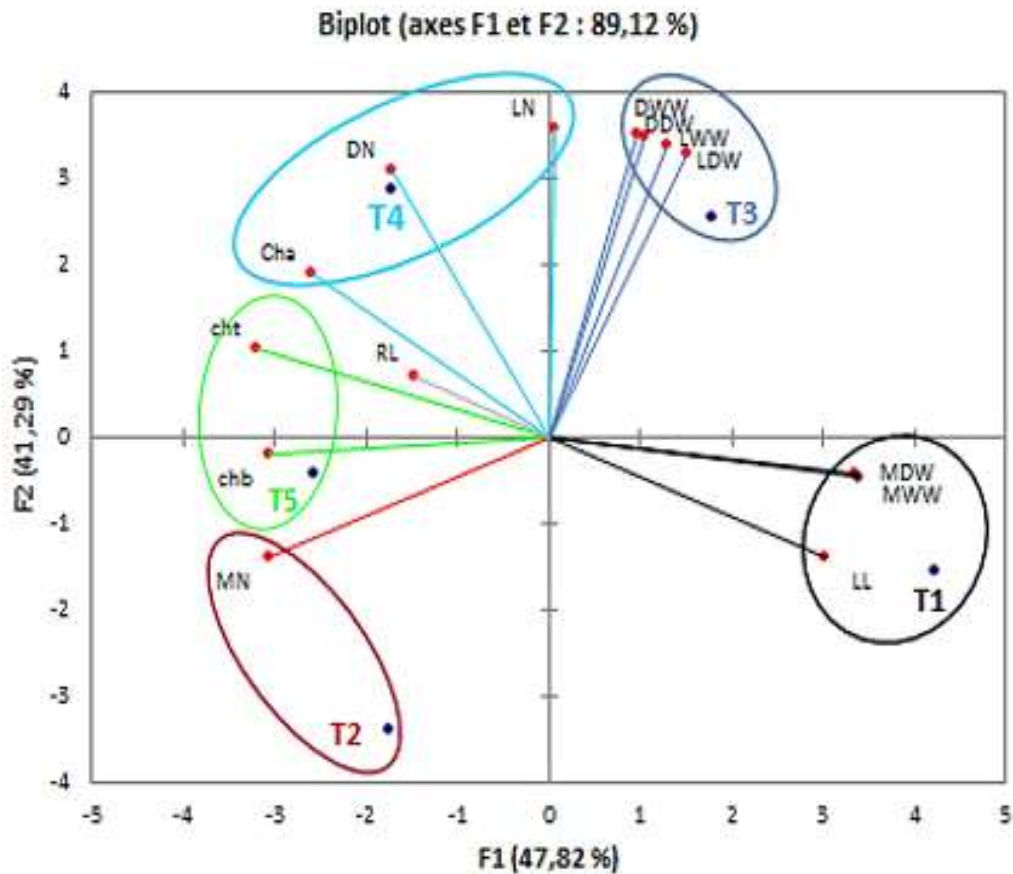


**Figure 5:** Effect of PGPR inoculation on the number of mother corms and bulbils of *C. sativus* L. Different letters above the columns indicate significant differences at the  $P < 0.05$  level, according to the Fisher test. Error bars represent means  $\pm$  SE.



**Figure 6:** Effect of the inoculation by the PGPR on the biomass of mother corms and bulbils. Different letters above the columns indicate significant differences at the  $P < 0.05$  level, according to the Fisher test. Error bars represent means  $\pm$  SE.





**Figure 7:** Principal component analysis (PCA) of different parameters measured and the inoculation treatments applied. The parameters investigated: Leaf Number (LN), Leaf Length (LL), Leaf fresh Weight(LWW), Leaf Dry Weight(LDW), Mother corms Number (MN), Mother corms fresh Weight(MWW), Mother corms Dry Weight (MDW), Daughter corms Number (DN), Daughter corms fresh Weight (DWW), Daughter corms Dry Weight(DDW) and Root Length (RL).

## Synthèse

La culture du safran au Maroc constitue l'un des principaux supports de l'économie de la région de Taliouine et fait la spécificité de cette région au niveau national. C'est la culture la plus rentable dans la zone puisqu'elle est l'épice la plus chère au monde (Aziz and Sadok 2015). Une augmentation de la productivité du safran est souhaitable, tout en étant durable biologique et écologique.

A l'échelle du Maroc, les études sur les aspects de fertilisation organique du safran sont manquantes. Pourtant, c'est l'un des aspects importants qui conditionne non seulement le maintien d'une bonne production mais aussi la préservation et la durabilité de la fertilité du sol. Donc une étude à ce niveau est nécessaire, en assurant à la fois une bonne production sur plusieurs années tout en maintenant la fertilité du sol pour assurer la durabilité de cette production.

Les engrais contenant de la matière organique peuvent avoir des effets positifs sur les plants de safran. Ainsi, la fertilisation avec du fumier naturel augmente considérablement les paramètres de rendement du safran (poids sec du stigmate, poids frais des fleurs, longueur du stigmate et poids frais du stigmate) (Amiri 2008). Il est de même pour le fumier de bovins compostés comparé aux engrais chimiques (Koocheki and Seyyedi 2015), mais il réduit le rendement du safran (Alidadi et al. 2013). A l'opposé des engrais, l'inoculation par les PGPR semble avoir des effets positifs sur plusieurs paramètres de la culture du safran. Ainsi l'étude de Sharaf-Eldin et al. (2007) a prouvé que l'inoculation de *C. sativus* par une souche de PGPR FZB24 *Bacillus subtilis* a le potentiel d'augmenter la longueur des feuilles, le nombre de fleurs, la biomasse des stigmates et diminuer significativement le temps nécessaire à la multiplication des cornes et surtout d'améliorer les métabolites de qualité du safran.

Notre objectif à ce niveau a été de tester au champ les bactéries PGPR isolées initialement des sols de Taliouine afin de vérifier leur efficacité comme inoculum du safran. L'analyse physicochimique a démontré que les sols de la région étudiée est très pauvre en azote et en phosphore disponible. Ces sols connaissent une faible minéralisation en raison d'une activité biologique réduite due à une population microbienne limitée. Ce qui signifie que ce sol a besoin de divers amendements pour améliorer l'activité microbienne et par conséquent sa fertilité et nécessite également la fertilisation en phosphate pour assurer de bons rendements des plantes. L'expérimentation au champ a été réalisée dans la ferme 1.2.3 SAFRAN à Taliouine sur une surface de 1575m<sup>2</sup>, selon des blocs aléatoires complets. Les trois meilleures PGPR de notre collection ont été utilisées comme inoculum (S11P1, S12S4 et S11A1a). La parcelle a été subdivisée en 15 parcelles élémentaires réparties sur cinq traitements (T1 : Traitement non

inoculé, T2 : inoculation par la souche solubilisatrice du phosphate naturel (S11P1); T3 : inoculation par la souche productrice de sidérophores chélateur de fer (S12S4) ; T4 : inoculation par la souche productrice de l'auxine (S11A1a) ; T5 : inoculation par un mélange des 3 rhizobactéries).

L'inoculation avec la souche rhizobactérienne S11P1 (T2) identifiée comme *Rahnella aquatilis* et sélectionnée comme la meilleure bactérie solubilisatrice du phosphate naturel *in vitro* montre statistiquement un effet sur la croissance du safran par rapport au témoin, notamment sur le nombre des cormes mères (cormes capables de donner des cormes-filles (bulbilles) lors de la saison suivante), affectent positivement mais légèrement la longueur des feuilles, les concentrations de la chl<sub>a</sub>, chl<sub>b</sub> et la chl totale et sur les autres paramètres de croissance. Ceci suggère que cette bactérie peut solubiliser le phosphate inorganique adsorbé présent dans la plupart des sols.

La deuxième bactérie PGPR testée comme inoculum est *Variovorax paradoxus* (S12S4), qui est la plus productrice de sidérophores parmi la collection testée. L'inoculation par cette bactérie montre un effet positif et significatif sur la biomasse de la plante du safran, avec augmentation du poids frais et sec des feuilles, du poids frais et sec des cormes filles. De plus, un léger effet positif sur les autres paramètres de croissance du safran, démontré par une corrélation positive entre le poids des feuilles et le poids de bulbilles ( $r > 0,90$ ), ce qui suggère l'effet bénéfique et important de l'inoculation sur la partie aérienne, en particulier la biomasse des feuilles.

La souche S11A1a, la meilleure souche productrice de l'auxine parmi les isolats du safran et qui appartient à l'espèce *Rahnella aquatilis*, affecte positivement et remarquablement le contenu de la chl a, le nombre de feuilles et le nombre de corne-filles. L'augmentation du nombre de feuilles après l'inoculation a induit une forte biomasse dans les feuilles confirmée par le fort coefficient de corrélation positif  $r > 0,90$  et la stimulation du bourgeonnement montrée par le nombre élevé de bulbilles  $r > 0,70$ .

Finalement l'inoculation par le mélange des 3 rhizobactéries (S11P1, S12S4 et S11A1a) agit sur l'efficacité de la photosynthèse en augmentant la teneur en chl b, en chl totale et en augmentant le nombre des cormes mères.

En général, toutes les rhizobactéries ont d'une part influencé positivement la quantité de safran en améliorant sa croissance et d'une autre part ont influencé la qualité du safran en augmentant le taux des trois molécules secondaires clés, Crocine, Picrocrocine et Safaranal, par rapport au témoin non inoculé. Les quatre traitements d'inoculation (T2-T3-T4 et T5) ont eu un effet positif sur la qualité du safran séché à l'ombre ou à l'étuve par rapport au contrôle. Alors que le

traitement T4 présentait les constituants chimiques les plus élevés lorsque le stigmate était séché à l'étuve et T2 lorsque le stigmate était séché à l'ombre par rapport au contrôle.

Ces résultats prometteurs rejoignent ceux des études de 2013, de Sharaf-eddine et de Ambardar and Vakhlu qui ont utilisé comme inoculum les bactéries PGPRs *Acetivibrio calcoaceticus*, *Pseudomonas tremulae*, *Pseudomonas kilonensis*, *Chryseobacterium elymi*, *Bacillus aryabhatai* et *Pseudomonas koreensis*. Ces auteurs ont noté d'une part une influence positive sur le nombre et la longueur des racines d'une autre part et d'autre part la diminution de l'apparition de maladies avec diminution du pourcentage de pourriture des cornes (40%) par rapport au contrôle non inoculé (60%). De même ils ont noté une augmentation significative de la production de cornes et du nombre de bulbilles par rapport aux témoins non inoculés. De la même manière Parray et al (2015) ont montré *in vitro* que les PGPRs: *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *B. subtilis*, *A. lwoffii*, *A. Haemolyticus* et *Pantoea sp.* pouvaient améliorer la croissance des bulbilles soit seuls, soit combiné avec l'amélioration du poids et du système racinaire par rapport au témoin non inoculé. La récente étude de Díez-Méndez and Rivas (2017) montre aussi que l'inoculation de safran avec la souche *Curtobacterium herbarum* sous serre améliore de manière significative le nombre de fleurs et augmente la longueur des filaments de safran.

Ces résultats très prometteurs soulèvent l'importance des PGPR qui sont de plus en plus utilisées en agriculture, vues leurs grandes potentialités comme alternative à certains fertilisants chimiques, pesticides, herbicides ...etc.

## Conclusion

En conclusion, les résultats de cette étude suggèrent que l'inoculation avec les PGPR procure un effet bénéfique sur le safran par rapport au témoin non inoculé. Les PGPR testées et leur mélange influencent positivement la croissance du safran en augmentant la croissance de la partie aérienne, la multiplication, la biomasse des cornes et la qualité du safran par la stimulation de la production de métabolites secondaires. Ceci suggère que l'inoculation avec les PGPR est une biotechnologie intéressante pour améliorer la quantité et la qualité de cette plante aromatique et médicinale intéressante.

**CONCLUSION GENERALE**  
**&**  
**PERSPECTIVES**

## Conclusion générale

Les microorganismes associés aux plantes remplissent des fonctions importantes pour la croissance et la santé des plantes. Divers mécanismes interviennent dans la promotion directe ou indirecte de la croissance des plantes par les micro-organismes. Sur la base de ces interactions bénéfiques plantes-microorganismes, il est possible de développer des inocula microbiens destinés à la biotechnologie agricole. En fonction de leur mode d'action et de leurs effets, ces produits peuvent être utilisés comme biofertilisants, bioprotectants, phytostimulateurs et biopesticides pour les plantes.

Ces derniers temps on constate une demande croissante pour des stratégies saines et compatibles sur le plan écologique en agriculture. L'utilisation des microorganismes et l'exploitation des interactions bénéfiques qu'ils entretiennent avec les plantes, offrent des stratégies prometteuses et respectueuses de l'environnement pour l'agriculture conventionnelle et biologique dans le monde entier.

L'objectif de ce travail de thèse a donc été de progresser dans la compréhension des interactions plantes microorganismes bénéfiques en particulier les microorganismes de la rhizosphère du safran du Maroc et particulièrement de la région de Taliouine.

Le safran a une importance économique majeure au Maroc et a acquis une réputation mondiale. En raison de la valeur élevée de ses stigmates, les plantations se développent mais elles doivent préserver leur caractère sain, en particulier dans les zones où la fertilité des sols est très faible. Il est donc nécessaire de rechercher de nouvelles pratiques culturales parfaitement adaptées à ces environnements.

L'objectif du volet I de cette étude a été, l'exploration des champignons vivant en symbiose avec la plante du safran. Dans cette partie, le développement des champignons MA, la densité des spores et leur diversité dans le sol, de même que la diversité de la communauté des champignons MA dans les racines du safran ont été étudiées sous l'effet de différentes pratiques de gestion agricole (type de fertilisation, âge et méthode de plantation). Une grande variété de spores mycorhiziennes arbusculaires a été identifiée dans la rhizosphère de cette plante par des investigations morpho-anatomiques, avec onze espèces de spores dominées par des espèces de *Glomus*. Les observations microscopiques des hyphes intraradiculaires indiquent un taux de colonisation élevé des racines de safran dépendant de la méthode de plantation utilisée. La diversité des champignons mycorhiziens à arbuscules colonisant les racines de safran a été évaluée par séquençage de la région du gène de l'ADNr LSU. Ceci a permis d'identifier cinq genres de CMA et a révélé trois groupes génomiques inconnus. Le calcul de l'indice de diversité

de Shannon a montré que la composition de la communauté de CMA a considérablement changé avec l'âge de la plantation et le type de fertilisation. Nos résultats contribuent à une meilleure connaissance des communautés indigènes des CMA associées au safran, constituent une base scientifique solide et une autre voie à suivre pour préserver et peut-être améliorer la qualité de la production du safran dans la région de Taliouine, et ouvrent de nouvelles perspectives pour une utilisation rationnelle des pratiques agricoles pour la production du safran biologique.

Le deuxième volet de cette thèse focalise sur l'isolement et la caractérisation moléculaire des champignons endophytes isolés des racines de la plante *C. sativus* L. de Taliouine-Maroc, et l'étude de l'activité antibactérienne et antioxydante des métabolites secondaires extraits des champignons isolés par deux solvants organiques (l'acétate d'éthyle et le chloroforme). Soixante isolats fongiques ont été récupérés et purifiés à partir des segments de racines de safran et identifiés en utilisant l'analyse de la séquence de l'espaceur transcrit interne (ITS) du gène de l'ARNr. Trois espèces de champignons endophytes différents ont ainsi été identifiés: *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus fumigatiaffinis* et *Aspergillus niger*. Les extraits de *Rhizopus oryzae* à base d'acétate d'éthyle et de chloroforme ont montré une activité antibactérienne élevée contre la plupart des bactéries testées, tandis que les extraits de *Rhizopus oryzae* et d'*Aspergillus niger* présentaient une capacité antioxydante par le test de blanchiment au  $\beta$ -carotène (BCBT) et le test DPPH respectivement. Nos résultats indiquent que les endophytes isolés des plantes de safran pourraient constituer une source potentielle de métabolites secondaires bioactifs d'origine fongique.

Le volet III de la présente étude a mené à l'isolement, à la caractérisation et à l'évaluation de la capacité PGP d'une collection de souches bactériennes isolées de la rhizosphère du safran. L'évaluation de 89 bactéries pour leur activité PGP, montre que la plupart des isolats étaient capables de montrer une ou plusieurs des activités biologiques étudiées : solubilisation des phosphates inorganiques, production d'auxine ou de sidérophores et fixation de l'azote atmosphérique. L'analyse moléculaire des isolats du safran par séquençage du gène de l'ADNr 16S a révélé une diversité dans la collection du safran PGPR avec neuf genres identifiés: *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Variovorax*, *Delftia*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Luteibacter* et *Pantoea*. Le genre *Pseudomonas* était le plus abondant. Les meilleurs isolats, montrant les niveaux d'activité biologique les plus élevés ont été sélectionnés et utilisés pour la conception de biofertilisants bactériens qui seront utilisés dans les essais d'inoculation au safran.

La conception de biofertilisants microbiens pour améliorer le rendement et la qualité du safran était l'objectif du dernier volet. L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets de l'inoculation

par quatre types d'inocula constitués de trois rhizobactéries potentiellement promotrices de la croissance sur la plante du safran en termes de rendement, croissance et qualité. Les rhizobactéries testées (S11P7, S12S4 et S11A1a) ont variablement impacté la croissance et la qualité de la plante du safran. La capacité photosynthétique a été améliorée ce qui a influencé positivement la croissance de la plante de *C. sativus*. De même la biomasse et la multiplication des cormes ont été positivement affectées par la stimulation du bourgeonnement, ce qui a donné naissance à un nombre élevé de bulbilles. Le dosage par spectrométrie UV-Vis selon la norme ISO 3632-2010 des stigmates du safran inoculé a montré une bonne qualité exprimée par des taux élevés des trois molécules clés du safran: la crocine, la picrocrocine et le safranal. Les effets bénéfiques de l'inoculation du safran avec les PGPR, tant au niveau quantitatif que qualitatif, augurent la possibilité d'utiliser ces rhizobactéries comme des engrais biologiques pour l'accroissement de la plus rare et chère épice au monde.



## **Perspectives**

L'ensemble des résultats obtenus au terme de ce travail de thèse sur les interactions bénéfiques entre les microorganismes du sol et le safran ouvrent des perspectives intéressantes pour l'amélioration de la culture du safran biologique. Il serait nécessaire de mener les études complémentaires suivantes :

- ✓ étudier les relations microorganismes-microorganismes ayant lieu au sein de la rhizosphère du safran,
- ✓ analyser finement les populations microbiennes associées au safran à travers l'étude de l'ADN directement extrait de la rhizosphère (pyroséquençage),
- ✓ compléter et suivre l'étude de l'inoculation bactérienne du safran sur une période supérieure à 4 ans, en parallèle avec le suivi de la survie des bactéries inoculées dans le sol,
- ✓ optimiser les essais d'inoculation avec les mycorhizes ou la double inoculation PGPR - champignons mycorhiziens.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## RÉFÉRENCE

- Abbas Y, Ducouso M, Abourouh M, et al (2006) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters woodlands in Morocco. *Ann For Sci* 63:7. doi: 10.1051/forest:2006007
- Abdullaev FI, Riverón-Negrete L, Caballero-Ortega H, et al (2003) Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA* 17:731–736
- Aboudrare A, Aw-Hassan A, Lybbert TJ (2014) Importance Socio-économique du Safran pour les Ménages des Zones de Montagne de la Région de Taliouine-Taznakht au Maroc. *Rev Marocaine Sci Agron Vét* 2:5–14
- Alidadi H, Saffari AR, Peiravi R (2013) Effects of Biofertilizers Effects of Compost, Vermicompost and Sulfur Compost on Yield of Saffron. *World Appl Sci J* 21:1386–90
- Alizadeh O (2011) Mycorrhizal symbiosis. *Adv Stud Biol* 3:273–281
- Aly A, Debbab A, Kjer J, Proksch P (2010) Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers* 41:1–16. doi: 10.1007/s13225-010-0034-4
- Aly AH, Edrada-Ebel R, Wray V, et al (2008) Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry* 69:1716–1725. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.02.013
- Ambardar S, Sangwan N, Manjula A, et al (2014) Identification of bacteria associated with underground parts of *Crocus sativus* by 16S rRNA gene targeted metagenomic approach. *World J Microbiol Biotechnol* 30:2701–2709. doi: 10.1007/s11274-014-1694-0
- Ambardar S, Vakhlu J (2013) Plant growth promoting bacteria from *Crocus sativus* rhizosphere. *World J Microbiol Biotechnol* 29:2271–2279. doi: 10.1007/s11274-013-1393-2
- Amiri ME (2008) Impact of animal manures and chemical fertilizers on yield components of saffron (*Crocus sativus* L.). *Am-Eurasian J Agric Environ Sci* 4:274–279
- Assigbetse K, Gueye M, Thioulouse J, Duponnois R (2005) Soil bacterial diversity responses to root colonization by an ectomycorrhizal fungus are not root-growth-dependent. *Microb Ecol* 50:350–359. doi: 10.1007/s00248-004-0229-x
- Aziz L, Sadok W (2015) Strategies used by the saffron producers of Taliouine (Morocco) to adapt to climate change. *J Alp Res Rev Géographie Alp*. doi: 10.4000/rga.2902
- Bâ A, Duponnois R, Diabaté M, Dreyfus B (2011) Les champignons ectomycorhiziens des arbres forestiers en Afrique de l’Ouest: méthodes d’étude, diversité, écologie, utilisation en foresterie et comestibilité. IRD Editions
- Bacon CW, White J (2000) *Microbial Endophytes*. CRC Press

- Bais HP, Weir TL, Perry LG, et al (2006) The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233–266. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
- Bano N, Rizvi IF, Sharma N, et al (2016) Production of Bioactive Secondary Metabolites from Endophytic fungi. *IRJET* 03:
- Barik BP, Tayung K, Jagadev PN, Dutta SK (2010) Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. *EJBS* 2:8–16
- Bassa C, Mila I, Bouzayen M, Audran-Delalande C (2012) Phenotypes Associated with Down-Regulation of Sl-IAA27 Support Functional Diversity Among Aux/IAA Family Members in Tomato. *Plant Cell Physiol* 53:1583–1595. doi: 10.1093/pcp/pcs101
- Becerra-Castro C, Monterroso C, Prieto-Fernández A, et al (2012) Pseudometallophytes colonising Pb/Zn mine tailings: a description of the plant-microorganism-rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. *J Hazard Mater* 217–218:350–359. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.03.039
- Bentabet N, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K (2014) Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie* 12:364–371. doi: 10.1007/s10298-014-0834-x
- Berg G (2009) Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:11–18. doi: 10.1007/s00253-009-2092-7
- Bergoin M (2005) Application du concept de raffinage végétal au safran du Quercy (*crocus sativus*) pour la valorisation intégrée des potentiels aromatiques et colorants. Toulouse, INPT
- Berraho E, Lesueur D, Diem HG, Sasson A (1997) Iron requirement and siderophore production in *Rhizobium ciceri* during growth on an iron-deficient medium. *World J Microbiol Biotechnol* 13:501–510. doi: 10.1023/A:1018553022960
- Birhane E, Gebremedihin KM, Tadesse T, et al (2017) Exclosures restored the density and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in Tigray, Northern Ethiopia. *Ecol Process* 6:33. doi: 10.1186/s13717-017-0101-9
- Birouk A, ABouDrArE A, Ait-ouBAhou A, et al (2011) Guide des Bonnes Pratiques de Production du Safran dans la Région de Taliouine-Tazenakht. Off Régionale Mise En Valeur Agric Ouarzazate Rapp FAO
- Błaszowski J, Kozłowska A, Niezgodna P, et al (2018) A new genus, *Oehlia* with *Oehlia diaphana* comb. nov. and an emended description of *Rhizoglosum vesiculiferum* comb. nov. in the Glomeromycotina. [https://www.ingentaconnect.com/content/schweiz/novh/pre-prints/content-nova\\_hedwigia\\_000\\_0\\_0\\_0000\\_0000\\_blaszkowski\\_0488\\_prepub](https://www.ingentaconnect.com/content/schweiz/novh/pre-prints/content-nova_hedwigia_000_0_0_0000_0000_blaszkowski_0488_prepub). Accessed 8 Jul 2018
- Bolan NS (1991) A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil* 134:189–207. doi: 10.1007/BF00012037

- Bolhassani A, Khavari A, Bathaie SZ (2014) Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 1845:20–30. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.11.001
- Bonfante P (2001) At the Interface Between Mycorrhizal Fungi and Plants: the Structural Organization of Cell Wall, Plasma Membrane and Cytoskeleton. In: Hock PDB (ed) *Fungal Associations*. Springer Berlin Heidelberg, pp 45–61
- Bonfante P, Anca I-A (2009) Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annu Rev Microbiol* 63:363–383. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073504
- Brandizzi F, Grilli Caiola M (1998) Flow cytometric analysis of nuclear DNA in *Crocus sativus* and allies (Iridaceae). *Plant Syst Evol* 211:149–154. doi: 10.1007/BF00985356
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 28:25–30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Brighton C (1977) Cytology of *Crocus sativus* and its allies (Iridaceae). *Plant Syst Evol* 128:137–157. doi: 10.1007/BF00984551
- Burni T, Hussain F, Sharief M (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi (amf) associated with the rhizosphere of *Mentha arvensis* L., and *M. longifolia* huds. *Pak J Bot* 43:3013–3019
- Cassán F, Vanderleyden J, Spaepen S (2014) Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *J Plant Growth Regul* 33:440–459. doi: 10.1007/s00344-013-9362-4
- Cesaro P, Tuinen D van, Copetta A, et al (2008) Preferential Colonization of *Solanum tuberosum* L. Roots by the Fungus *Glomus intraradices* in Arable Soil of a Potato Farming Area. *Appl Env Microbiol* 74:5776–5783. doi: 10.1128/AEM.00719-08
- Chun S-S, Vatter DA, Lin Y-T, Shetty K (2005) Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem* 40:809–816. doi: 10.1016/j.procbio.2004.02.018
- Claire Horner-Devine M, Leibold MA, Smith VH, Bohannon BJ (2003) Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol Lett* 6:613–622
- Crozet A, Sus-Rousset H de, Durfort S-J de (2012) *Crocus sativus* L. (Iridaceae), le safran (I). *Phytothérapie* 10:121–125. doi: 10.1007/s10298-012-0696-z
- Dabin B (1965) Dosage de l'azote total dans les sols par la methode de Kjeldahl. *Cah Off Rech Sci Tech O-m Ser Pedol* 3:338–48
- Dapkevicius A, Venskutonis R, van Beek TA, Linssen JP (1998) Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J Sci Food Agric* 77:140–146

- del Amor FM, Serrano-Martínez A, Fortea MI, et al (2008) The effect of plant-associative bacteria (*Azospirillum* and *Pantoea*) on the fruit quality of sweet pepper under limited nitrogen supply. *Sci Hortic* 117:191–196. doi: 10.1016/j.scienta.2008.04.006
- Dhar MK, Sharma M, Bhat A, et al (2017) Functional genomics of apocarotenoids in saffron: insights from chemistry, molecular biology and therapeutic applications. *Brief Funct Genomics*. doi: 10.1093/bfgp/elx003
- Díez-Méndez A, Rivas R (2017) Improvement of saffron production using *Curtobacterium herbarum* as a bioinoculant under greenhouse conditions. *Microbiol* 2017 Vol 3 Pages 354-364. doi: 10.3934/microbiol.2017.3.354
- Dimkpa C, Weinand T, Asch F (2009) Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ* 32:1682–1694. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x
- Dixon R, Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* 2:621–631. doi: 10.1038/nrmicro954
- Dubois A (2010) Analyse de la filière safran au Maroc: quelles perspectives pour la mise en place d’une Indication Géographique? CIHEAM-IAM Montpellier
- Duponnois R, Plenchette C (2003) A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza* 13:85–91. doi: 10.1007/s00572-002-0204-7
- Egamberdieva D, Shrivastava S, Varma A (2015) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants. Springer
- Eyberger AL, Dondapati R, Porter JR (2006) Endophyte Fungal Isolates from *Podophyllum peltatum* Produce Podophyllotoxin. *J Nat Prod* 69:1121–1124. doi: 10.1021/np060174f
- Fatehi M, Rashidabady T, Fatehi-Hassanabad Z (2003) Effects of *Crocus sativus* petals’ extract on rat blood pressure and on responses induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum. *J Ethnopharmacol* 84:199–203
- Di Pardo Fernández A, M. Chiochio V, Barrera V, et al (2015) Mycorrhizal fungi isolated from native terrestrial orchids of pristine regions in Córdoba (Argentina). *Rev Biol Trop* 63:275–283
- Finlay RD (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J Exp Bot* 59:1115–1126. doi: 10.1093/jxb/ern059
- Finley JW, Gao S (2017) A Perspective on *Crocus sativus* L. (Saffron) Constituent Crocin: A Potent Water-Soluble Antioxidant and Potential Therapy for Alzheimer’s Disease. *J Agric Food Chem* 65:1005–1020. doi: 10.1021/acs.jafc.6b04398
- Gadkar V, David-Schwartz R, Kunik T, Kapulnik Y (2001) Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. *Plant Physiol* 127:1493–1499

- Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD (2004) Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol* 42:243–270. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455
- Gee GW, Bauder JW (1986) Particle-size Analysis. *Methods Soil Anal Part 1—Physical Mineral Methods sssabookseries:383–411*. doi: 10.2136/sssabookser5.1.2ed.c15
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc* 46:235–244. doi: 10.1016/S0007-1536(63)80079-0
- Ghorbani M (2008) The efficiency of saffron’s marketing channel in Iran. *World Appl Sci J* 4:523–527
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet M-N, et al (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20:519–530. doi: 10.1007/s00572-010-0333-3
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109–117. doi: 10.1139/m95-015
- Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett* 251:1–7. doi: 10.1016/j.femsle.2005.07.030
- Glick BR, Todorovic B, Czarny J, et al (2007) Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. *Crit Rev Plant Sci* 26:227–242. doi: 10.1080/07352680701572966
- Glickmann E, Dessaux Y (1995) A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 61:793–796
- Gollotte A, Tuinen D van, Atkinson D (2003) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza* 14:111–117. doi: 10.1007/s00572-003-0244-7
- Goto BT, Silva GA, Assis DMA de, et al (2012) *Intraornatosporaceae* (*Gigasporales*), a new family with two new genera and two new species. *Mycotaxon* 119:117–132. doi: 10.5248/119.117
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, et al (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435:819–823. doi: 10.1038/nature03610
- Gresta F, Avola G, Lombardo GM, et al (2009) Analysis of flowering, stigmas yield and qualitative traits of saffron (*Crocus sativus*L.) as affected by environmental conditions. *Sci Hortic* 119:320–324. doi: 10.1016/j.scienta.2008.08.008
- Gresta F, Lombardo GM, Siracusa L, Ruberto G (2008) Saffron, An Alternative Crop for Sustainable Agricultural Systems: A Review. In: Lichtfouse E, Navarrete M, Debaeke P, et al. (eds) *Sustainable Agriculture*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 355–376
- Grilli Caiola M (2003) Saffron reproductive biology. In: I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology 650. pp 25–37

- Guglielmetti S, Basilico R, Taverniti V, et al (2013) *Luteibacter rhizovicinus* MIMR1 promotes root development in barley (*Hordeum vulgare* L.) under laboratory conditions. *World J Microbiol Biotechnol* 29:2025–2032. doi: 10.1007/s11274-013-1365-6
- Gunatilaka AAL (2006) Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J Nat Prod* 69:509–526. doi: 10.1021/np058128n
- Gupta R, Vakhlu J (2015) Native *Bacillus amyloliquefaciens* W2 as a potential biocontrol for *Fusarium oxysporum* R1 causing corm rot of *Crocus sativus*. *Eur J Plant Pathol* 143:123–131. doi: 10.1007/s10658-015-0670-3
- Hairston NG, Allan JD, Colwell RK, et al (1968) The Relationship between Species Diversity and Stability: An Experimental Approach with Protozoa and Bacteria. *Ecology* 49:1091–1101. doi: 10.2307/1934492
- Han J-I, Choi H-K, Lee S-W, et al (2011) Complete Genome Sequence of the Metabolically Versatile Plant Growth-Promoting Endophyte *Variovorax paradoxus* S110. *J Bacteriol* 193:1183–1190. doi: 10.1128/JB.00925-10
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, et al (2015) The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* MMBR 79:293–320. doi: 10.1128/MMBR.00050-14
- Harms H, Schlosser D, Wick LY (2011) Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol* 9:177–192. doi: 10.1038/nrmicro2519
- Harper JK, Arif AM, Ford EJ, et al (2003) Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron* 59:2471–2476. doi: 10.1016/S0040-4020(03)00255-2
- Hata K, Futai K (1996) Variation in fungal endophyte populations in needles of the genus *Pinus*. *Can J Bot* 74:103–114. doi: 10.1139/b96-015
- Hausenblas HA, Saha D, Dubyak PJ, Anton SD (2013) Saffron (*Crocus sativus* L.) and major depressive disorder: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Integr Med* 11:377–383. doi: 10.3736/jintegrmed2013056
- Hazalin NAMN, Ramasamy K, Lim SM, et al (2009) Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complement Altern Med* 9:46. doi: 10.1186/1472-6882-9-46
- He H, Ye Z, Yang D, et al (2013) Characterization of endophytic *Rahnella* sp. JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. *Chemosphere* 90:1960–1965. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.10.057
- Higgins KL, Arnold AE, Miadlikowska J, et al (2007) Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Mol Phylogenet Evol* 42:543–555. doi: 10.1016/j.ympev.2006.07.012



- Hosseinzadeh H, Ghenaati J (2006) Evaluation of the antitussive effect of stigma and petals of saffron (*Crocus sativus*) and its components, safranal and crocin in guinea pigs. *Fitoterapia* 77:446–448. doi: 10.1016/j.fitote.2006.04.012
- Hosseinzadeh H, Talebzadeh F (2005) Anticonvulsant evaluation of safranal and crocin from *Crocus sativus* in mice. *Fitoterapia* 76:722–724. doi: 10.1016/j.fitote.2005.07.008
- Hosseinzadeh H, Younesi HM (2002) Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol* 2:7. doi: 10.1186/1471-2210-2-7
- Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, et al (2008) Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants
- Ibou D, Fatou N, Aboubacry K, et al (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) communities associated with cowpea in two ecological site conditions in Senegal. *Afr J Microbiol Res* 9:1409–1418. doi: 10.5897/AJMR2015.7472
- Jain P, Pundir RK (2015) Diverse Endophytic Microflora of Medicinal Plants. In: Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants. Springer, Cham, pp 341–357
- Jalali-Heravi M, Parastar H, Ebrahimi-Najafabadi H (2010) Self-modeling curve resolution techniques applied to comparative analysis of volatile components of Iranian saffron from different regions. *Anal Chim Acta* 662:143–154. doi: 10.1016/j.aca.2010.01.013
- Jansa J, Erb A, Oberholzer H-R, et al (2014) Soil and geography are more important determinants of indigenous arbuscular mycorrhizal communities than management practices in Swiss agricultural soils. *Mol Ecol* 23:2118–2135. doi: 10.1111/mec.12706
- Kandavel SS and D (2010) Interaction of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Endophytes with Medicinal Plants – New Avenues for Phytochemicals. *J Phytol* 2:
- Kang S-M, Waqas M, Khan AL, Lee I-J (2014) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria: Potential Candidates for Gibberellins Production and Crop Growth Promotion. In: Miransari M (ed) Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses, Volume 1. Springer New York, pp 1–19
- Kartal N, Sokmen M, Tepe B, et al (2007) Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chem* 100:584–589. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.09.084
- Khan A, Geetha R, Akolkar A, et al (2006) Differential cross-utilization of heterologous siderophores by nodule bacteria of *Cajanus cajan* and its possible role in growth under iron-limited conditions. *Appl Soil Ecol* 34:19–26. doi: 10.1016/j.apsoil.2005.12.001
- Kharwar RN, Mishra A, Gond SK, et al (2011) Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Nat Prod Rep* 28:1208–1228. doi: 10.1039/C1NP00008J

- Kianmehr H (1981) Vesicular—Arbuscular Mycorrhizal Spore Population and Infectivity of Saffron (*Crocus sativus*) in Iran. *New Phytol* 88:79–82. doi: 10.1111/j.1469-8137.1981.tb04570.x
- Klironomos JN, McCune J, Hart M, Neville J (2000) The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecol Lett* 3:137–141. doi: 10.1046/j.1461-0248.2000.00131.x
- Koleva II, van Beek TA, Linssen JPH, et al (2002) Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochem Anal* 13:8–17. doi: 10.1002/pca.611
- Koocheki A, Seyyedi SM (2015) Relationship between nitrogen and phosphorus use efficiency in saffron (*Crocus sativus* L.) as affected by mother corm size and fertilization. *Ind Crops Prod* 71:128–137. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.03.085
- Kravchenko LV, Azarova TS, Makarova NM, Tikhonovich IA (2004) The Effect of Tryptophan Present in Plant Root Exudates on the Phytostimulating Activity of Rhizobacteria. *Microbiology* 73:156–158. doi: 10.1023/B:MICI.0000023982.76684.9d
- Krüger M, Krüger C, Walker C, et al (2012) Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol* 193:970–984. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x
- Kusari S, Lamshöft M, Spiteller M (2009) *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. *Horstmann* as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *J Appl Microbiol* 107:1019–1030. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04285.x
- Kusari S, Verma VC, Lamshoeft M, Spiteller M (2011) An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. *Juss.* that produces azadirachtin. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1287–1294. doi: 10.1007/s11274-011-0876-2
- Lage M, Cantrell CL (2009) Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. *Sci Hortic* 121:366–373. doi: 10.1016/j.scienta.2009.02.017
- Lambert PA (2002) Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol* 92 Suppl:46S-54S
- Lambrecht M, Okon Y, Broek AV, Vanderleyden J (2000) Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. *Trends Microbiol* 8:298–300. doi: 10.1016/S0966-842X(00)01732-7
- Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakidis DA (2002) *Crocus sativus* biological active constituents. In: Atta-ur-Rahman (ed) *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, pp 293–312
- Leinhos V, Vacek O (1994) Biosynthesis of auxins by phosphate-solubilizing rhizobacteria from wheat (*Triticum aestivum*) and rye (*Secale cereale*). *Microbiol Res* 149:31–35. doi: 10.1016/S0944-5013(11)80132-1

- Le Tacon FL, Jung G, Mugnier J, et al (1985) Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. *Can J Bot* 63:1664–1668. doi: 10.1139/b85-229
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, et al (2007a) Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J* 50:529–544. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03069.x
- Liu X, Dong M, Chen X, et al (2007b) Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chem* 105:548–554. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.008
- Lone R, Shuab R, Koul KK (2016a) AMF association and their effect on metabolite mobilization, mineral nutrition and nitrogen assimilating enzymes in saffron (*Crocus sativus*) plant. *J Plant Nutr* 39:1852–1862. doi: 10.1080/01904167.2016.1170850
- Lone R, Shuab R, Malla NA, et al (2016b) Beneficial Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Underground Modified Stem Propagule Plants. *J New Biol Rep* 5:41–51
- Loper JE, Henkels MD (1999) Utilization of Heterologous Siderophores Enhances Levels of Iron Available to *Pseudomonas putida* in the Rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 65:5357–5363
- Lubchenco J, Olson AM, Brubaker LB, et al (1991) The Sustainable Biosphere Initiative: An Ecological Research Agenda: A Report from the Ecological Society of America. *Ecology* 72:371–412. doi: 10.2307/2937183
- Lynch JM, Whipps JM (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129:1–10. doi: 10.1007/BF00011685
- Masciarelli O, Llanes A, Luna V (2014) A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiol Res* 169:609–615. doi: 10.1016/j.micres.2013.10.001
- Merzaeva OV, Shirokikh IG (2010) The production of auxins by the endophytic bacteria of winter rye. *Appl Biochem Microbiol* 46:44–50. doi: 10.1134/S0003683810010072
- Mir JI, Ahmed N, Wani SH, et al (2011) In vitro development of microcorms and stigma like structures in saffron (*Crocus sativus* L.). *Physiol Mol Biol Plants* 16:369–373. doi: 10.1007/s12298-010-0044-4
- Moghadam GD, Sadeghi SM, Droodian H, others (2013) Types of Cultivation Methods in Saffron (*Crocus sativus*) and observing the Principles of Fight against Pests and Weeds. *Persian Gulf Crop Prot* 2:8–13
- Mohanta J, Tayung K, Mohapatra UB (2008) Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three ethno-medicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *Internet J Microbiol* 5:

- Mohebi-Anabat M, Riahi H, Zanganeh S, Sadeghnezhad E (2015) Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on the growth, photosynthetic pigments and soluble sugar of *Crocus sativus* (saffron) in autoclaved soil
- Mollafilabi A (2004) experimental findings of production and echo physiological aspects of saffron (*Crocus sativus* l.). Acta Hortic 195–200. doi: 10.17660/ActaHortic.2004.650.20
- Monroy L. HJ, Salamanca S. CR, Cano C, et al (2013) Influencia de las coberturas en cultivos de cítricos sobre los hongos formadores de micorrizas arbusculares en Oxisoles del piedemonte llanero colombiano. Corpoica Cienc Tecnol Agropecu 14:53–65
- Moulin L, Béna G, Boivin-Masson C, Stepkowski T (2004) Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. Mol Phylogenet Evol 30:720–732. doi: 10.1016/S1055-7903(03)00255-0
- Mummey DL, Rillig MC (2007) Evaluation of LSU rRNA-gene PCR primers for analysis of arbuscular mycorrhizal fungal communities via terminal restriction fragment length polymorphism analysis. J Microbiol Methods 70:200–204. doi: 10.1016/j.mimet.2007.04.002
- Neilands JB (1995) Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. J Biol Chem 270:26723–26726. doi: 10.1074/jbc.270.45.26723
- Nihorimbere V, Ongena M, Smargiassi M, Thonart P (2011) Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. Biotechnol Agron Société Environ
- Oehl F, Silva GA da, Sánchez-Castro I, et al (2011) Revision of Glomeromycetes with entrophosporoid and glomoid spore formation with three new genera. <https://www.ingentaconnect.com/content/mtax/mt/2011/00000117/00000001/art00030> . Accessed 12 Jul 2018
- Ogundare AO, Adetuyi FC, Akinyosoye FA (2006) Antimicrobial activities of *Vernonia tenoreana*. Afr J Biotechnol 5:
- Okon Y, Labandera-Gonzales C, Lage M, et al (2015) Agronomic applications of *Azospirillum* and other PGPR. Biol Nitrogen Fixat 921–933
- Pande M, Tarafdar JC (2004) Arbuscular mycorrhizal fungal diversity in neem-based agroforestry systems in Rajasthan. Appl Soil Ecol 26:233–241
- Panhwar QA, Jusop S, Naher UA, et al (2013) Application of Potential Phosphate-Solubilizing Bacteria and Organic Acids on Phosphate Solubilization from Phosphate Rock in Aerobic Rice. In: Sci. World J. <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/272409/abs/>. Accessed 9 Aug 2018
- Parray JA, Kamili AN, Reshi ZA, et al (2015) Interaction of rhizobacterial strains for growth improvement of *Crocus sativus* L. under tissue culture conditions. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC 121:325–334. doi: 10.1007/s11240-014-0703-1

- Parray JA, Kamili AN, Reshi ZA, et al (2013) Screening of beneficial properties of rhizobacteria isolated from Saffron (*Crocus sativus* L) rhizosphere. *Afr J Microbiol Res* 7:2905–2910. doi: 10.5897/AJMR12.2194
- Pavithra N, Sathish L, Ananda K (2012) Antimicrobial and enzyme activity of endophytic fungi isolated from Tulsi. *J Pharm Biomed Sci JPBMS* 16:2014
- Pérez A, Botero C, Cepero M (2012) Diversidad de micorrizas arbusculares en pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus de fincas ganaderas del municipio de Corozal-Sucre. *Rev MVZ Córdoba* 17:3024–3032
- Pérez A, Peroza V (2013) Micorrizas arbusculares asociadas al pasto angleton (*Dichanthium aristatum Benth*) en fincas ganaderas del municipio de Tolú, Sucre-Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 18:3362–3369
- Pérez-Montaña F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, et al (2014) Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res* 169:325–336. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.011
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:158-IN18. doi: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- Pikovskaya RI (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17:e370
- Pitsikas N, Bouladakis A, Georgiadou G, et al (2008) Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in an animal model of anxiety. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* 15:1135–1139. doi: 10.1016/j.phymed.2008.06.005
- Porcel R, Zamarréño ÁM, García-Mina JM, Aroca R (2014) Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. *BMC Plant Biol* 14:36. doi: 10.1186/1471-2229-14-36
- Porrás-Alfaro A, Herrera J, Sinsabaugh RL, et al (2008) Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Appl Environ Microbiol* 74:2805–2813. doi: 10.1128/AEM.02769-07
- Priti V, Ramesha BT, Singh S, et al (2009) How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites. *Curr Sci* 97:477–478
- Raj P, Khan SS, Modak M, et al (2013) Biodiversity of endophytic fungi in saffron (*Crocus sativus*) and antimicrobial activity of their crude extract. *Indo Am J Pharm Res* 3:3702–3713
- Rajeshkumar PP, Thomas GV, Gupta A, Gopal M (2015) Diversity, richness and degree of colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in coconut cultivated along with intercrops in high productive zone of Kerala, India. *Symbiosis* 65:125–141. doi: 10.1007/s13199-015-0326-2

- Rashid M, Khalil S, Ayub N, et al (2004) Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pak J Biol Sci* 7:187–196
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD (2000) Molecular Phylogeny of the Arbuscular Mycorrhizal Fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*. *Mycologia* 92:282–285. doi: 10.2307/3761561
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, et al (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23:515–531. doi: 10.1007/s00572-013-0486-y
- Renau-Morata B, Nebauer SG, Sánchez M, Molina RV (2012) Effect of corm size, water stress and cultivation conditions on photosynthesis and biomass partitioning during the vegetative growth of saffron (*Crocus sativus* L.). *Ind Crops Prod* 39:40–46. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.02.009
- Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol* 182:314–330. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
- Rodríguez-Morelos VH, Soto-Estrada A, Pérez-Moreno J, et al (2014) Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the rhizosphere of seedlings and mature trees of *Swietenia macrophylla* (*Magnoliophyta: Meliaceae*) in Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. *Rev Chil Hist Nat* 87:9. doi: 10.1186/s40693-014-0009-z
- Rouatt JW, Katznelson H (1961) A Study of the Bacteria on the Root Surface and in the Rhizosphere Soil of Crop Plants. *J Appl Bacteriol* 24:164–171. doi: 10.1111/j.1365-2672.1961.tb00248.x
- Ruiz-Lozano JM (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13:309–317. doi: 10.1007/s00572-003-0237-6
- Saharan BS, Nehra V (2011) Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res* 21:30
- Samarghandian S, Borji A, Farahmand SK, et al (2013) *Crocus sativus* L. (Saffron) Stigma Aqueous Extract Induces Apoptosis in Alveolar Human Lung Cancer Cells through Caspase-Dependent Pathways Activation. *BioMed Res Int* 2013:. doi: 10.1155/2013/417928
- Sampathu SR, Shivashankar S, Lewis YS, Wood AB (1984) Saffron (*Crocus Sativus* Linn.) — Cultivation, processing, chemistry and standardization. *C R C Crit Rev Food Sci Nutr* 20:123–157. doi: 10.1080/10408398409527386
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* 76:270–276. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9
- Saxena RB (2010) Botany, Taxonomy and Cytology of *Crocus sativus* series. *Ayu* 31:374–381. doi: 10.4103/0974-8520.77153

- Sbrana C, Avio L, Giovannetti M (2014) Beneficial mycorrhizal symbionts affecting the production of health-promoting phytochemicals. *ELECTROPHORESIS* 35:1535–1546. doi: 10.1002/elps.201300568
- Schardl CL, Leuchtman A, Spiering MJ (2004) Symbioses of Grasses with Seedborne Fungal Endophytes. *Annu Rev Plant Biol* 55:315–340. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141735
- Schüßler A (2002) Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 244:75–83. doi: 10.1023/A:1020238728910
- Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47–56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9
- Sharaf-Eldin M, Elkholy S, Fernández J, et al (2007) The effect of *Bacillus subtilis* FZB24® on flowers quantity and quality of saffron (*Crocus sativus* L.). *Planta Med* 73:. doi: 10.1055/s-2007-987387
- Shrivastava S, Egamberdieva D, Varma A (2015) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants: The State of the Art. In: Egamberdieva D, Shrivastava S, Varma A (eds) *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants*. Springer International Publishing, pp 1–16
- Singh JS, Pandey VC, Singh DP (2011) Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agric Ecosyst Environ* 140:339–353. doi: 10.1016/j.agee.2011.01.017
- Solaiman ZM, Anawar HM (2015) Rhizosphere microbes interactions in medicinal plants. In: *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants*. Springer, pp 19–41
- Song YC, Huang WY, Sun C, et al (2005) Characterization of Graphis lactone A as the Antioxidant and Free Radical-Scavenging Substance from the Culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an Endophytic Fungus in *Trachelospermum jasminoides*. *Biol Pharm Bull* 28:506–509. doi: 10.1248/bpb.28.506
- Srivastava R, Ahmed H, Dixit RK, et al (2010) *Crocus sativus* L.: A comprehensive review. *Pharmacogn Rev* 4:200–208. doi: 10.4103/0973-7847.70919
- Stockinger H, Krüger M, Schüssler A (2010) DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 187:461–474. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x
- Strack D, Fester T, Hause B, et al (2003) Review Paper: Arbuscular Mycorrhiza: Biological, Chemical, and Molecular Aspects. *J Chem Ecol* 29:1955–1979. doi: 10.1023/A:1025695032113
- Strobel G, Daisy B (2003) Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:491–502. doi: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003

- Strobel GA (2002) Rainforest Endophytes and Bioactive Products. *Crit Rev Biotechnol* 22:315–333. doi: 10.1080/07388550290789531
- Sugiura M, Saito H, Abe K, Shoyama Y (1995) Ethanol extract of *Crocus sativus* L. Antagonizes the inhibitory action of ethanol on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Phytother Res* 9:100–104. doi: 10.1002/ptr.2650090204
- Sung G-H, Hywel-Jones NL, Sung J-M, et al (2007) Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol* 57:5–59. doi: 10.3114/sim.2007.57.01
- Symanczik S, Courty P-E, Boller T, et al (2015) Impact of water regimes on an experimental community of four desert arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) species, as affected by the introduction of a non-native AMF species. *Mycorrhiza* 25:639–647. doi: 10.1007/s00572-015-0638-3
- Tandon HLS, Cescas MP, Tyner EH (1968) An Acid-Free Vanadate-Molybdate Reagent for the Determination of Total Phosphorus in Soils. *Soil Sci Soc Am J* 32:48–51. doi: 10.2136/sssaj1968.03615995003200010012x
- Timmusk S, Nicander B, Granhall U, Tillberg E (1999) Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem* 31:1847–1852. doi: 10.1016/S0038-0717(99)00113-3
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Physiol Genet Asp Mycorrhizae Asp Physiol Genet Mycorrhizes Proc 1st Eur Symp Mycorrhizae Dijon 1-5 July 1985*
- Trouvelot S, Tuinen D van, Hijri M, Gianinazzi-Pearson V (1999) Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* 8:203–206. doi: 10.1007/s005720050235
- Tsaftaris AS, Polidoros AN, Pasentsis K, Kalivas A (2007) Cloning, Structural Characterization, and Phylogenetic Analysis of Flower MADS-Box Genes from *Crocus sativus* L.). *Sci World J* 7:1047–1062. doi: 10.1100/tsw.2007.175
- Ünal M, Çavuşoğlu A (2005) The effect of various nitrogen fertilizers on saffron (*Crocus sativus* L.) yield. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg* 18:257–260
- Vanneste S, Friml J (2009) Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell* 136:1005–1016. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.001
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571–586. doi: 10.1023/A:1026037216893
- Vidaver AK, Mathys ML, Thomas ME, Schuster ML (1972) Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea*, and *P. phaseolicola*. *Can J Microbiol* 18:705–713. doi: 10.1139/m72-113
- Vincent JM, others (1970) A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *Man Pract Study Root-Nodule Bact*



- Vyas V, Joshi R, Robin R, Sharma KC (2010) Cold-Adapted and Rhizosphere-Competent Strain of *Rahnella* sp. with Broad-Spectrum Plant Growth-Promotion Potential. *J Microbiol Biotechnol* 20:1724–1734
- Walker C, Vestberg M, Demircik F, et al (2007) Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., *Ambisporaceae* fam. nov., and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycol Res* 111:137–153. doi: 10.1016/j.mycres.2006.11.008
- WANG L, QIU P, LONG X-F, et al (2016) Comparative analysis of chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activities of ethylacetate extracts of *Polygonum cuspidatum* and its endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. A0916. *Chin J Nat Med* 14:117–123. doi: 10.1016/S1875-5364(16)60004-3
- Wani ZA, Mirza DN, Arora P, Riyaz-Ul-Hassan S (2016) Molecular phylogeny, diversity, community structure, and plant growth promoting properties of fungal endophytes associated with the corms of saffron plant: An insight into the microbiome of *Crocus sativus* Linn. *Fungal Biol.* doi: 10.1016/j.funbio.2016.07.011
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Shinsky J, White T (eds) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, pp 315–322
- Wyeth P, Malik N (2008) A strategy for promoting Afghan saffron exports. Report. Afghanistan: ICARDA and Washington State University. [http://www.icarda.org/RALFweb/FinalReports/G\\_Marketing\\_Afghan\\_Saffron\\_Strategy\\_RALF02-02.pdf](http://www.icarda.org/RALFweb/FinalReports/G_Marketing_Afghan_Saffron_Strategy_RALF02-02.pdf)
- Xie J, Knight JD, Leggett ME (2009) Comparison of media used to evaluate *Rhizobium leguminosarum* bivar viciae for phosphate-solubilizing ability. *Can J Microbiol* 55:910–915. doi: 10.1139/w09-034
- Xuan B, Zhou YH, Li N, et al (1999) Effects of crocin analogs on ocular blood flow and retinal function. *J Ocul Pharmacol Ther Off J Assoc Ocul Pharmacol Ther* 15:143–152. doi: 10.1089/jop.1999.15.143
- Yang C, Hamel C, Schellenberg MP, et al (2010) Diversity and Functionality of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Three Plant Communities in Semiarid Grasslands National Park, Canada. *Microb Ecol* 59:724–733. doi: 10.1007/s00248-009-9629-2
- Yu H, Zhang L, Li L, et al (2010) Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol Res* 165:437–449. doi: 10.1016/j.micres.2009.11.009
- Yu TE, Egger KN, Peterson LR. 2001. Ectendomycorrhizal associations – characteristics and functions. *Mycorrhiza*. 11:167–177.
- Zhao J, Zhou L, Wang J, et al (2010) Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Curr Res Technol Educ Trop Appl Microbiol Microb Biotechnol* 1:567–576

- Zheng C-J, Li L, Zou J, et al (2012) Identification of a quinazoline alkaloid produced by *Penicillium vinaceum*, an endophytic fungus from *Crocus sativus*. *Pharm Biol* 50:129–133. doi: 10.3109/13880209.2011.569726
- Zhou G-C, Wang Y, Zhai S, et al (2013) Biodegradation of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam by the nitrogen-fixing and plant-growth-promoting *rhizobacterium* *Ensifer adhaerens* strain TMX-23. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4065–4074. doi: 10.1007/s00253-012-4638-3

# **ANNEXES**

**Annexe 1 : LES MILIEUX****→ Milieu YEM**

Mannitol	5g/l
Extrait de levure	1g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0,46g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,12g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2g/l
NaCl	0,1g/l
Eau distillée	1l

**YEM solide**, ajouter 15g d'agar par litre+Rouge Congo à une concentration finale de 0,0025 %.

**→ Milieu PVK**

Glucose	1g/l
KCl	0,02g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,01g/l
Fe SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Traces
Mn SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Traces
P naturel	0,5g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,05g/l
Extrait de levure	0,01g/l

**→ Milieu MODI**

Mannitol	10g
Sodium glutamate	1g
NaCl	0,1g
Mg SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1g
Eau distillée	1litre

**→ Milieu Nitrogen-free base NFB solide**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,80 g
Glucose	5,0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,20g
NaCl	0,20 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,02 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,002 g
Eau distillée	1l (pH 7.0).

2.0 mL de solution de métaux (0,40 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O ; 0,30 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,04 g CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O; 0,10 g KI; 0,20 g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0.40 gMnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0,20 g NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O; and 10.0 mL concentratedHCl dans 1.0 L l'eau distillée).

**→ Milieu Luria-Bertani (LB)**

Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	10g
Eau distillée	1l

LB solide ajouter 15g d'agar par litre

**→ Milieu Luria-Bertani (LB) sélectif ajouté au milieu LB stérile :**

Ampicilline (1ml/l d'une solution 50mg/ml)  
X-Gal (200mg/ml de Di MéthylFormamide)  
1ml/l de solution IPTG (100mM)

**→ Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)**

Pomme de terre épluchées et coupées	200g
Glucose	20g
Agar	15g
Eau distillée	1l

**→ PDB (Potato Dextrose Broth)**

Pomme de terre épluchées et coupées	200g
Glucose	20g
Eau distillée	1l

**→ Milieu TY**

Tryptone	5g
Extrait de levure	3g
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,8g

TY solide ajouter 15g d'agar par litre

## Annexe2 : LES REACTIFS

### → Réactif Salkowsky

FeCl <sub>3</sub>	20g
Acide Sulfurique	421.9 ml
Eau distillée	1l

### Préparation :

Dans un erlenmeyer placé dans un bain d'eau froide :

- Verser 2g de FeCl<sub>3</sub> dans 50 ml d'eau stérile, puis mélanger
- Après dissolution complète du chlorure ferrique, verser lentement 42.19 ml d'acide sulfurique concentré en agitant constamment avec une baguette de verre.
- Laisser reposer jusqu'à ce que le mélange soit froid, puis ajouter 50ml d'eau distillée.

### → Réactif Vanadate molybdate

Le réactif est préparé selon la méthode suivante :

Solution A:

(NH <sub>4</sub> )Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	25g
Eau distillée	400ml

Solution B:

NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	1.25g
Eau distillée	300ml

Dans un bêcher, on chauffe de l'eau distillée jusqu'à ébullition, puis on rajoute du NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> et on laisse le bêcher en ébullition.

Après refroidissement de cette solution, on ajoute sous l'hôte chimique 250 ml d'acide nitrique concentré (60%) et on complète l'ensemble des deux solutions (A+B) jusqu'à 1 litre.

### → Réactif de CAS

Solution 1

HDTMA (hexa-decyl tri-methyl ammonium bromide) à 10mM (« 36.4mg/10ml d'eau distillée).

Solution 2

FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O à 1mM à préparer dans l'HCl à 10mM (27mg de FeCl<sub>3</sub> + 0.083ml HCl à 37%) dans 100ml d'eau.

Solution 3

CAS (chrome azurol S) à 2mM.

Solution 4

Pipérasine neutralisée (4.307g de pipérasine anhydre dans 20 ml d'eau + 6.25ml de HCl 12N ou 7.4 ml de HCl à 37%).

Procédure

Dans une fiole de 100 ml, ajouter dans l'ordre :

- 40ml d'eau distillée + 6ml de la solution 1
- Agiter doucement
- Ajouter goutte à goutte du mélange contenant 1.5ml de la solution 2 et 7.5ml de la solution 3
- Ajouter la solution 4 puis compléter à 100ml avec l'eau distillée

Le réactif CAS doit être conservé à l'obscurité.

### Annexe 3: LES PROTOCOLES DES KITS

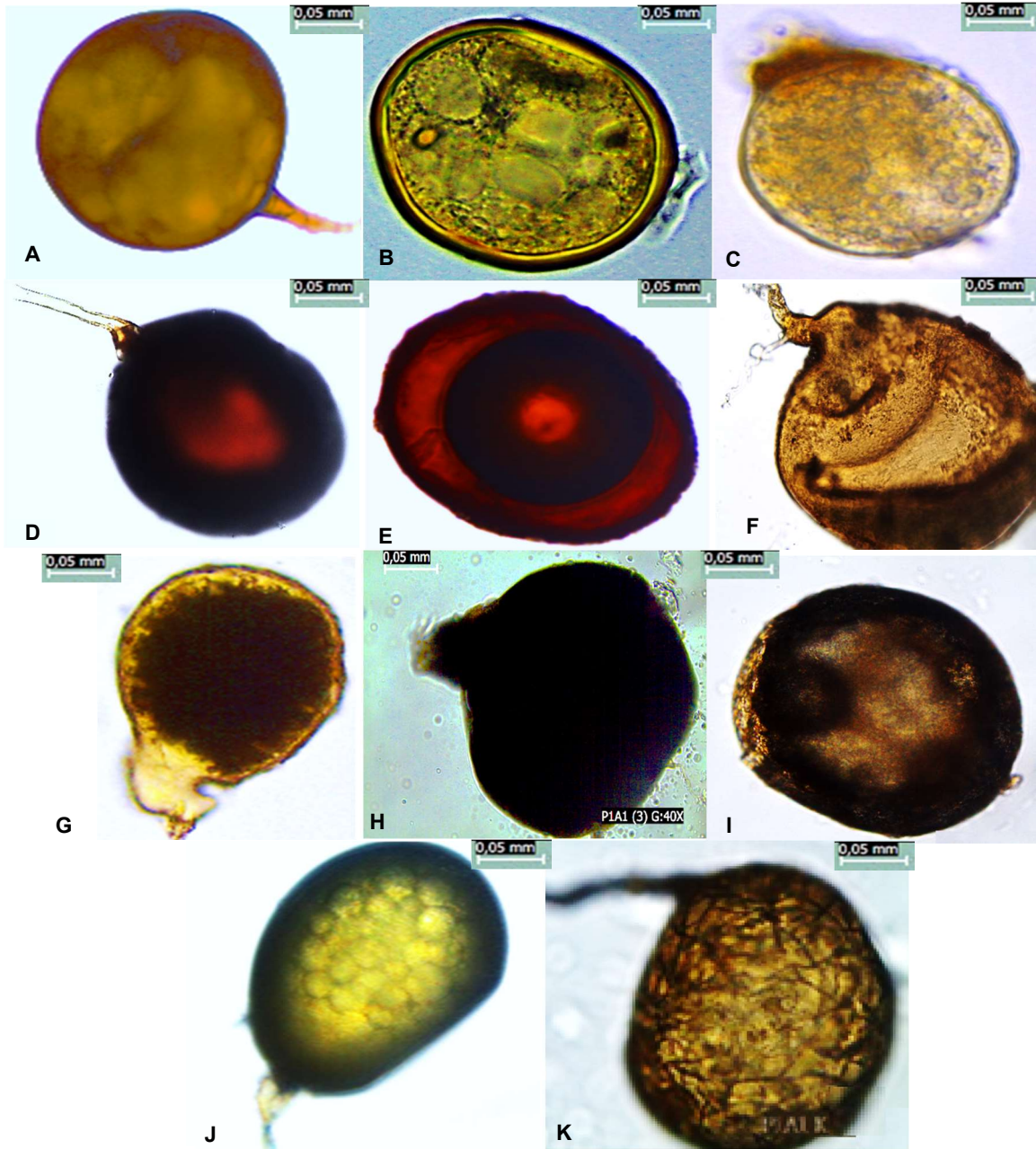
#### → DNeasy® (QIAGEN Inc)

- Ajouter dans chaque tube 400µl de tampon de lyse (AP1), puis homogénéiser.
- Mettre 4µl d'ARNase puis incubé au bain marie à 65°C pendant 10 min. Agiter 2 à 3 fois les tubes pendant les 10 minutes.
- Ajouter 130µl de tampon de déprotéinisation (AP2) afin d'éliminer les protéines, les polysaccharides et les solvants de l'extrait.
- Agiter au vortex, puis mettre dans la glace pendant 5 min et centrifuger 5 min à 14000trs/min.
- Verser le lysat dans la colonne de filtration « QUIAshredder » et centrifuger 2 min à 14000 trs/min.
- Récupérer le surnageant dans les tubes Eppendorf stériles et y ajouter 1,5 volume de tampon AP3/éthanol pour 1 volume de surnageant soit environ 750µl de tampon AP3/éthanol (préparation d'une solution de 30 ml de AP3 dans 60 ml éthanol).
- Prélever 650 µl et les placer dans une colonne Dneasy et centrifuger 1min à 8000trs/min. l'ADN est retenu dans la colonne.
- Jeter le filtrat et renouveler l'opération avec ce qui reste du lysat pour utiliser la totalité du surnageant.
- Transférer dans de nouveaux tubes (collection tube) de 2ml et ajouter 500µl de tampon de lavage (AW) dans la colonne et centrifuger 1min à 8000trs/min.
- Jeter le filtrat et ajouter encore 500µl de tampon de lavage (AW) dans la colonne et centrifuger 2min à 1400trs/min.
- Jeter le filtrat et centrifuger 2min à 6000trs/min pour sécher la colonne.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube eppendorf, ajouter au centre de la colonne 50µl de tampon d'élution AE préchauffer à 65°C, laisser incubé 5min à température ambiante et centrifuger 1min à 8000trs/min.
- Répéter l'opération en ajoutant encore 50µl de tampon d'élution AE et en centrifugeant 1min à 8000trs/min.
- Jeter la colonne et conserver l'ADN dans le tube eppendorf à -20°C jusqu'à l'utilisation.

#### → Purification d'ADN génomique Promega™ Wizard™

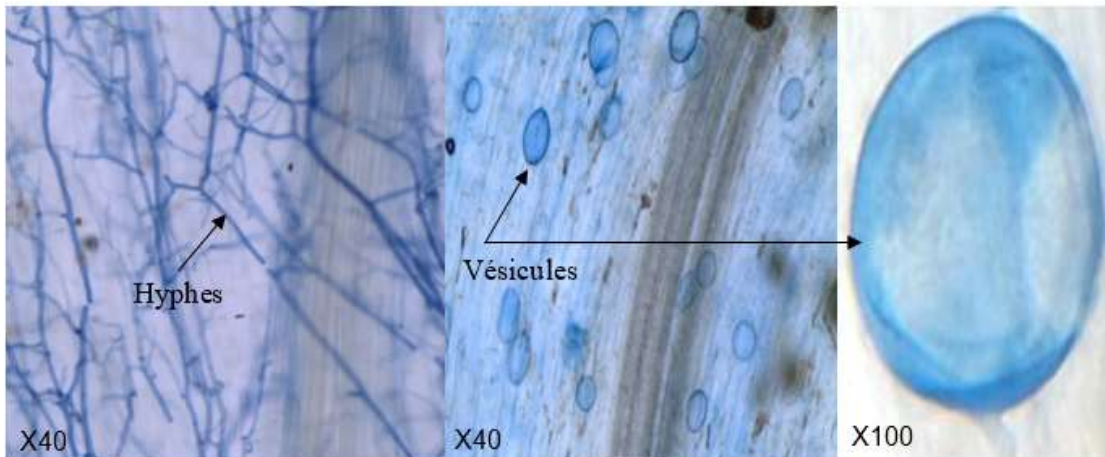
- Le broyat du champignon a été additionné de 300 µl de tampon (celllysis).
- Le produit de la lyse est mélangé par vortex et incubé à -80°C pendant 3min jusqu'à congélation. Ensuite, les tubes sont incubés avec immersion dans un bain marie à 95°C pendant 1 min pour faire éclater les cellules.
- Après avoir mixé pendant 30 secondes on a ajouté 1,5 µl d'ARNase, puis les tubes sont incubés à 37 °C pendant 30 min. Dans le but de précipiter les protéines on a mis dans les tubes 100 µl de « Protein Precipitation Solution» puis on a mixé pendant 30 secondes.
- Prélevé le surnageant après avoir centrifugé à 13000tr pendant 3 min.
- Dans les tubes contenant le surnageant on a ajouté 300 µl d'isopropanol et on a mixé, puis on a éliminé le surnageant après centrifugation 13000tr pendant 10 min.
- Le lavage on a utilisé 500 µl d'éthanol 70%. Dans une dernière étape on a ajouté 40 µl « DNA Rehydration Solution » et les échantillons ont été incubés 1h à 65 °C.

## Annexe 4 : LISTE DES PHOTOS (photos personnelles)



**Photo 1:** Micromorphologie des morphotypes des CMA associés à la rhizosphère de *Crocus sativus* L. (40×). **A:** *Funneliformis mosseae*; **B:** *Rhizoglosum intraradices*; **C:** *Enterophospora infrequens*; **D:** *Glomus tenebrosum*; **E:** *Sclerocystis taiwanensis*; **F:** *Rhizoglosum aggregatum*; **G:** *Acaulospora* sp.; **H:** *Funneliformis coronatus*; **I:** *Glomus reticulatum* **J:** *Septoglosum deserticola*; **K:** *Funneliformis* sp.





**Photo 2:** Observations microscopiques des hyphes et les vésicules des CM associés aux racines de *Crocus sativus* L. Liquide de Montage : le glycérol. (Hyphes: X40 et Vésicule: X100).

### **RESUME**

Le safran (*Crocus sativus* L.) est un produit de terroir à forte valeur ajoutée qui fait partie des produits les plus prisés au niveau mondial et qui figure parmi les priorités nationales inscrites au niveau du Plan Maroc Vert.

L'objectif de cette thèse est la caractérisation et la valorisation de la diversité des populations de microorganismes rhizosphériques associées au safran dans la région de Taliouine.

L'identification moléculaire a permis, pour la première fois au Maroc, de révéler une grande diversité taxonomique de ces microorganismes, avec huit genres de champignons mycorrhiziens arbusculaires (CMA) ; trois espèces de champignons endophytes (CE) et neuf genres de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR).

De plus, les méthodes classiques d'identification morpho-anatomique des CMA ont montré l'existence de 11 morphotypes de spores de CMA dans la rhizosphère du safran et ont mis en exergue la corrélation existant entre les pratiques culturales du safran et la diversité des spores de CMA et leur colonisation des racines. Par ailleurs, l'étude des métabolites secondaires des CE a montré une activité antibactérienne des extraits de *Rhizopus oryzae* et une activité antioxydante chez *Aspergillus niger* et *Rhizopus oryzae*. Le dernier volet de cette thèse a été consacré à la validation dans un essai au champ du potentiel biofertilisant des trois meilleures souches PGPR sélectionnées *in vitro* sur la culture du safran à Taliouine.

**Mots-clés :** *Crocus sativus* L. (safran) ; Taliouine; mycorhizes ; PGPR ; biofertilisation ; champignons endophytes.

### **ABSTRACT**

Saffron (*Crocus sativus* L.) is a local product with a high added value which is within the most worldwide popular product and which is among the national priorities included in the Green Morocco Plan.

The objective of this thesis is the characterization and the valorization of the diversity of the rhizosphere microorganisms populations associated with saffron in the region of Taliouine.

Molecular identification has allowed, for the first time in Morocco, to reveal a large taxonomic diversity of these microorganisms, with eight genera of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF); three species of endophytic fungi (EF) and nine genera of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In addition, classical morpho-anatomical identification methods for AMFs have shown the existence of 11 AMF spore morphotypes in the saffron rhizosphere and have highlighted the correlation between cultivation practices of saffron and AMF spore diversity and their colonization of the roots.

In addition, the study of EF secondary metabolites displayed an antibacterial activity of *Rhizopus oryzae* extracts and antioxidant activities in *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. The last part of this thesis was devoted to the validation through a field trial of the biofertilizing potential of the three best PGPR strains selected *in vitro* on saffron culture in Taliouine.

**Keywords:** *Crocus sativus* L. (saffron); Taliouine; mycorrhizae; PGPR; biofertilization; endophytic fungi.

Année Universitaire : 2018/2019