

# 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** : Bio-informatique et génomique des plantes

Présentée et soutenue le 28/09/2022 par :

**Mr. Karim RABEH**

**Identification et caractérisation des gènes de tolérance aux stress abiotiques chez *Argania spinosa* L. : Approches bio-informatique, génomique et métabolomique**

**Devant le Jury**

Halima RCHID	PES, Université Chouab Doukkali.FP-Sidi Bennour	Présidente / Rapportrice
Abdelaziz SMOUNI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences-Rabat	Rapporteur / Examineur
Leila MEDRAOUI	PH, Université Mohammed V, Faculté des Sciences-Rabat	Rapportrice/ Examinatrice
Abdelkarim FILALI-MALTOUF	Expert, PES, Academie Hassan II des sciences et techniques-Rabat	Examineur
Abderrahmane AIT LHAJ	Expert, Centre national de l'ANDZOA-Agadir	Examineur
Fatima GABOUN	Expert, Docteur, Institut National de Recherche Agronomique-Rabat	Co-Directeur
Laila SBABOU	PH, Université Mohammed V, Faculté des Sciences-Rabat	Co-Directeur
Bouchra BELKADI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences-Rabat	Directeur

## Dédicaces

أَعُوذُ بِاللَّهِ مِنَ الشَّيْطَانِ الرَّجِيمِ  
 وَقَضَىٰ رَبُّكَ أَلَّا تَعْبُدُوا إِلَّا إِيَّاهُ وَبِالْوَالِدَيْنِ إِحْسَانًا إِمَّا يَبُلُغَنَّ  
 عِنْدَكَ الْكِبَرَ أَحَدُهُمَا أَوْ كِلَاهُمَا فَلَا تَقُلْ لَهُمَا قَوْلًا كَرِيمًا ﴿٢٣﴾

**À mes chers parents**

Sans vous, je n'aurais certainement pas réalisé des études longues. Vous êtes toujours ma source d'énergie et d'apaisement. C'est à travers vos encouragements et votre soutien que j'ai pu avancer et si j'en suis là aujourd'hui, ce n'est que le fruit de vos efforts et de vos sacrifices, en espérant pouvoir vous combler à mon tour et rester votre fierté. Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'infini amour, le profond respect et la reconnaissance éternelle que je vous porte.

**À mes grands-parents**

Ma grande-mère maternelle **Fatna** et ma grande-mère paternelle **Hajja Messouda**. Je n'oubliais jamais vos prières et vos bénédictions qui m'ont été d'un grand secours pour mener à bien ce long parcours. Que dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

**À mes chères sœurs**

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur de réussite et de sérénité.

**À mon cher frère**

Veillez trouver dans ce travail le témoignage de mes sentiments les plus sincères et les plus affectueux. Que dieu te donne la force et la persévérance dans tes futures études.

**À ma chère nièce INES**

Tu es notre douce étoile qui brille dans la nuit. Tu es notre petite étincelle accrochée au ciel. Que dieu te protège pour tes parents et t'accorde une vie pleine de joie et de bonheur.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce modeste travail.

Le 28/09/2022   
 RABEH Karim

## Avant-propos

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire a été réalisé au **laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (LMBM)** de la **Faculté des Sciences de Rabat (FSR)**, Université Mohammed V de Rabat, sous la direction du Madame **Bouchra BELKADI**, professeur à la Faculté des Sciences de Rabat et sous la co-direction du Madame **Leila SBABOU**, professeur à la Faculté des Sciences de Rabat et du Madame **Fatima GABOUN**, Docteur à l'Institut National de Recherche Agronomique .

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Monsieur **Hicham ELAROSSI**, directeur du Centre Algal Biotechnology, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'a permis d'enrichir mes résultats par l'approche métabolomique par le GC-MS.

Mes vives remerciements vont également à Monsieur **Abderrahim FERRADOUS**, Docteur au Centre de Recherche Forestière de Marrakech, pour son implication dans notre projet, son aide précieuse surtout sur le plan de préparation du matériel végétal. Un merci spécial à Madame **Salwa EL-ANTRY** et Monsieur **Mohamed EL OUJDI**, pour l'aide apportée pour la réalisation des expérimentations dans la serre et leurs accueils dans le Centre de Recherche Forestière.

Ce travail s'insère dans le cadre du projet ArganBioGen intitulé: « Caractérisation génétique et moléculaire et multiplication par microbouturage d'arganiers adaptés à des conditions éco-climatiques extrêmes », sous la direction du Monsieur **Abdelkarim FILALI-MALTOUF**, professeur de l'Enseignement Supérieur retraité à la Faculté des Sciences de Rabat. Ce projet a reçu le soutien financier de l'Académie Hassan II des Sciences et Techniques et du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Formation des Cadres.

J'exprime ma sincère gratitude à ma Directrice de thèse, Madame **Bouchra BELKADI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat, qui a cru à mes capacités dès mes premières années à la faculté et m'a mis sur les rails de la recherche depuis la licence. Je vous remercie Professeur de m'avoir donné l'occasion de rencontrer et connaître ce trésor national qu'est l'arganier. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée et la liberté dans le choix d'orientation et de réalisation de mes axes de recherche. Votre encadrement m'a énormément permis de progresser tant sur le plan scientifique que sur le

plan humain. Merci pour tous les efforts fournis pour m'avoir aider, orienter et encourager tout au long de cette aventure. Ce fut et ça reste un réel plaisir de travailler à vos côtés.

Je voudrais également remercier chaleureusement ma co-directrice, Madame **Laila SBABOU**, Professeur Habilité à la Faculté des Sciences de Rabat, pour la qualité de votre encadrement scientifique et vos conseils judicieux ainsi que pour votre écoute et vos encouragements. Votre optimisme, votre rigueur, et votre vivacité d'esprit ont joué un rôle prépondérant pour la bonne réussite de cette thèse. Je vous remercie pour votre précieuse contribution et soutien morale et pour le partage de vos larges connaissances et compétences, ainsi que de m'avoir guider sur le chemin de la bio-informatique. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude et de mon entier dévouement.

Mes sincères remerciements vont aussi à ma co-directrice, Madame **Fatima GABOUN**, Docteur à l'Institut National de Recherche Agronomique de Rabat, pour son implication dans mes recherches doctorales. Je la remercie pour sa serviabilité, sa gentillesse et son précieux soutien. Ses remarques pertinentes, ses propositions et ses discussions enrichissantes m'ont aidé à mener à bien notre démarche scientifique lors de mes études de master et de thèse. Veuillez trouver dans ces mots toute ma reconnaissance et gratitude.

Mes remerciements s'adresse également à Madame **Halima RCHID**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des polydisciplinaire Sidi Bennour, University Chouab Doukkali, d'avoir présidé les membres de jury et en même d'accepter de lire et évaluer mon travail en tant que rapporteur.

Je souhaite également remercier Monsieur **Abdelaziz SMOUNI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat d'avoir accepté d'examiner et d'être le rapporteur de ce travail sans aucun à priori. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie Madame **Leila MEDRAOUI**, Professeur Habilité à la Faculté des Sciences de Rabat, pour le soutien que vous m'avez accordé tout au long de ma thèse. C'était une richesse et un grand plaisir de travailler à côté de vous dans le cadre de l'enseignement, et aujourd'hui je suis heureux que vous acceptiez d'examiner et de rapporter mon travail de thèse.

J'exprime mes gratitudes à mon parrain Monsieur, **Abdelkarim FILALI-MALTOUF**, Professeur de l'Enseignement Supérieur retraité à la Faculté des Sciences de Rabat, de

m'avoir accueilli au sein de son équipe, lorsqu'il était encore directeur du LMBM. Je vous remercie pour vos conseils prodigués, votre aide précieuse et votre disponibilité. Mes vifs reconnaissances pour m'avoir fait bénéficier de votre expérience et de votre rigueur scientifique et professionnelle. Merci pour les nombreuses discussions constructives autour de mon sujet de thèse qui m'ont été précieuses pour l'avancement de mon travail. Je vous remercie pour tous les efforts que vous avez fournis pour me permettre de réaliser ce travail dans les meilleurs conditions. Sans votre précieux apport, cette thèse n'aura jamais vu le jour.

Mes remerciements s'adresse aussi à Monsieur *Abderrahmane AIT LHAJ*, Docteur et coordinateur du programme d'Appui à la Recherche Scientifique sur l'Arganier à l'Agence Nationale pour le Développement des Zones Oasiennes et de l'Arganier à Agadir, d'avoir accepté notre invitation pour évaluer ce travail et enrichir la discussion.

---

## Résumé

---

L'arganier (*Argania spinosa* L.) a développé au cours de son évolution, des pouvoirs d'adaptation en modulant et ajustant divers mécanismes. Leur élucidation reste la clé pour la sauvegarde de cette espèce, sa préservation face aux changements climatiques et son amélioration *via* des programmes de sélection assistée par des marqueurs identifiés. La présente recherche a pour but d'évaluer la capacité d'adaptation d'écotypes d'arganier à travers l'étude de leur comportement physiologique, biochimique, métabolomique et génomique, sous l'effet de stress abiotique. Suite à une investigation *in silico*, différents marqueurs SSR adéquats associés aux gènes aquaporines ont été développés pour la sélection d'arganiers adaptés au changement climatique. Par-ailleurs, l'étude des gènes candidats par exploration du draft du génome d'arganier publié a porté sur deux membres de famille des gènes : Aquaporines et NHXs. Un total de 23 gènes putatifs codant pour l'aquaporine (AQPs) ont été identifiés et ils sont subdivisés en cinq sous-familles distinctes. Le nombre d'exon varie de 3 à 5 selon les membres d'AQPs. Tous les membres d'AQPs possèdent deux domaines conservés 'NPA' (Asparagine/Proline/Alanine) et dont la fonction est identifiée chez plusieurs espèces végétales. En ce qui concerne les antiporteurs NHX, 4 gènes ont été prédits et identifiés. La longueur de leur séquence protéique et leur masse moléculaire varient de 243 acides aminés (26.87 kD) à 721 (80.39 kD), respectivement pour les protéines AsNHX4 et AsNHX3. Les hélices transmembranaires varient de 5 à 11 hélices.

L'étude du comportement de l'arganier sous stress hydrique, des plantules d'arganier issues de quatre régions contrastées ont été soumises à trois traitements d'eau (100%, 50% et 25% de la capacité au champ) et un arrêt total de l'irrigation (0% CC) pendant 45 jours. Au niveau physiologique et biochimique, des différences significatives ont été observées pour chaque trait. En condition de stress hydrique (0% CC), nous avons enregistré une augmentation significative des osmolytes (sucre soluble et proline) et de la composition phénolique. Sur le plan métabolomique, le stress hydrique a induit des changements significatifs des métabolites lipidomiques notamment les acides gras. Ainsi, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide arachidique, l'acide linoléique et l'acide alpha-linolénique ont montré une accumulation significative principalement chez l'écotype 'Lkhssas', sous contrainte hydrique (0% CC). Sur le plan génomique, 9 gènes codant pour l'aquaporine ont été choisis en vue d'évaluer l'expression différentielle des transcrits en réponses au stress hydrique. Ces études sont en cours.

**Mots-clés :** *Argania spinosa* L., AQP, NHX, stress hydrique et salin, *In silico*, Génomique et Métabolomique.

---

## Abstract

---

The argan tree (*Argania spinosa* L.) has developed during its evolution, adaptation strategies by modulating and adjusting previous mechanisms. Their elucidation remains the key to the preservation and survival of argan trees in the face of climate change via selection programs assisted by identified markers. The goal of this study is to assess the adaptability of argan tree ecotypes by studying their physiological, biochemical, metabolomic, and genomic behavior under abiotic stress. Following an *in silico* investigation, various appropriate SSR markers associated with aquaporin genes have been developed for the selection of argan trees adapted to climate change. The study of candidate genes by exploring the draft of the published argan genome focused on two members gene family: aquaporins and NHXs. A total of 23 putative genes coding for aquaporin (AQPs) have been identified and they are subdivided into five distinct subfamilies. The number of exons varies from 3 to 5 depending on the members of AQPs. Two conserved "NPA" (Asparagin/Proline/Alanine) domains shared by all AQP members have been linked to specific functions in several plant species. Four genes have been predicted and identified in relation to NHX antiporters. The length of their protein sequence and their molecular mass vary from 243 amino acids (26.87 kD) to 721 (80.39 kD), respectively for AsNHX4 and AsNHX3 proteins. Transmembrane helices range from 5 to 11 helices.

Argan tree seedlings from four distinct areas were grown in four different conditions (100%, 50%, and 25% of the field capacity) and cease complete irrigation (0% FC) for 45 days in order to evaluate their behavior under drought stress. At physiological and biochemical level, significant differences were observed for each trait. Under water stress conditions (0% FC), we recorded a significant increase in osmolytes (soluble sugars and proline) and phenolic compounds. Water stress caused considerable alterations in lipidomic metabolites, particularly fatty acids, at the metabolomic level. Thus, under conditions of water stress (0% FC), large accumulations of palmitic acid, stearic acid, arachidic acid, linoleic acid, and alpha-linolenic acid were recorded, particularly in the 'Lkhssas' ecotype. To assess the differential transcript expression in response to hydric stress at the genome level, 9 genes encoding aquaporin were selected. These studies are ongoing.

**Key-words:** *Argania spinosa* L., AQP, NHX, drought and salt stress, *In silico*, Genomic and Metabolomic.

## Production scientifique

### a. Publications

- **Rabeh, K., Gaboun, F., Belkadi, B., & Filali-Maltouf, A.** (2018). *In Silico* development of new SSRs primer for aquaporin linked to drought tolerance in plants. *Plant signaling & behavior*, 13(11), e1536630.
- **Rabeh, K., Belkadi, B., Gaboun, F., Filali-Maltouf, A., & Sbabou L.** (2021). Plant NHX Antiporters: From Function to Biotechnological Application, with Case Study. *Current Protein and Peptide Science*, 22(1), 60-73.

#### *Article soumis pour publication*

**Rabeh K., Sbabou L., Rachidi F., Ferradouss A., Laghmari G., Aasfar A., El Arroussi H., Ouajdi M., El Antry S., Belkadi B. and Filali-Maltouf A.** (2022). Lipidomic profiling of *Argania spinosa* L. (Skeels) following drought stress. Soumis dans “Applied Biochemistry and Biotechnology”

#### *Article en cours de rédaction*

**Rabeh K., Sbabou L., Rachidi F., Ferradouss A., Ouajdi M., El Antry S., Belkadi B. and Filali-Maltouf A.** Genome-wide identification and analysis of the AQP gene family in Argan tree (*Argania spinosa* L.).

### b. Communications

- **Rabeh K., Sbabou L., Gaboun F., Ferradouss A., Filali-maltouf A., Belkadi B.** (2021). Arganier et stress abiotique : Comprendre les mécanismes moléculaires, physiologiques et métabolomiques. **Communication affichée** à la 1<sup>ère</sup> Journée Internationale de l'Arganier. 10 Mai 2021 à Rabat, Maroc.
- **Rabeh K., Belkadi B., Gaboun F., Filali-maltouf A., Sbabou L.** (2019). Bioinformatics approaches for identification of stress- adaptation genes in argan tree (*Argania spinosa* L.). **Communication affichée** à la 5<sup>ème</sup> édition du Congrès International de l'Arganier. 10 & 11 Décembre 2019 à Agadir, Maroc.
- **Rabeh K., Belkadi B., Gaboun F., Filali-maltouf A., Sbabou L.** (2018). Bioinformatics analysis of NHXs candidate gene implicated in salt stress from various plants. **Communication affichée** à la 1<sup>ère</sup> édition du Doctoriales du Centre BioBio. 25 & 26 Décembre 2018 à Rabat, Maroc
- **Rabeh K., Belkadi B., Gaboun F., Filali-maltouf A., Sbabou L.** (2018). Drought tolerance in *Argania spinosa* L. Skeels: ‘Candidate gene approach’ for aquaporin genes expression. **Communication orale** à la 15<sup>ème</sup> « International Phytotechnology Conference ». Du 1 au 5 Octobre 2018 à Novi Sad, Serbie.
- **Rabeh K., Belkadi B., Gaboun F., Filali-maltouf A., Sbabou L.** (2017). Développement d’amorces spécifiques à *Argania spinosa* L. reliées aux stress hydrique et salin par approche gène candidat. **Communication orale** à la 4<sup>ème</sup> édition du Congrès International de l'Arganier. Du 20 au 22 Novembre 2017 à Agadir, Maroc

**Liste des Figures**

Figure 1: Aire de répartition de l'arganier .....	6
Figure 2: Voie générale de la réponse des plantes aux stress abiotiques .....	23
Figure 3: Topologie d'une aquaporine.....	28
Figure 4: Localisation subcellulaire de la famille des protéines NHX .....	30
Figure 5: Modèle topologique de la structure de l'antiport vacuolaire AtNHX1.....	31
Figure 6: Approche de la biologie des systèmes des plantes .....	33
Figure 7: Approche métabolomique.....	37
Figure 8: Schéma des approches méthodologiques.....	40
Figure 9: Répartition géographique des écotypes étudiés .....	43
Figure 10: Dispositif expérimental schématisé .....	44
Figure 11: Plantules d' <i>Argania spinosa</i> L. des différents écotypes sous stress hydrique .....	47
Figure 12: Plantules d' <i>Argania spinosa</i> L. de différents écotypes sous stress hydrique.....	50

## Liste des Abréviations

<b>ABA</b>	Acid abscissique	<b>KEGG</b>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
<b>ACP</b>	Analyse composant principale	<b>LC-MS</b>	Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse
<b>ADN</b>	Acid désoxyribonucléique	<b>LEA</b>	Late embryogenesis abundant
<b>AIA</b>	Acide -acétique	<b>MDA</b>	Malondialdéhyde
<b>APX</b>	Ascorbate peroxydase	<b>MIP</b>	Major intrinsic protein
<b>AQP</b>	Aquaporine	<b>MLDI-MS</b>	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time Of Flight
<b>ARN</b>	Acid ribonucléique	<b>MW</b>	Molecular weight
<b>BSA</b>	Albumine de Sérum Bovin	<b>NGS</b>	Séquençage de deuxième génération
<b>CAT</b>	Catalase	<b>NHE</b>	Sodium-proton exchanger
<b>CC</b>	Capacité au champ	<b>NHX</b>	Sodium-proton antiporteur
<b>CHIP-28</b>	CHannel-forming Integral Protein of 28 kDa	<b>NIP</b>	Nodulin Intrinsic Protein
<b>CK</b>	Cytokinines	<b>NPA</b>	Asparagine-Proline-Alanine
<b>CMA</b>	Champignons mycorhiziens à arbuscules	<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>CPA</b>	Cation proton antiporteur	<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>CTAB</b>	Bromure de cetyltriméthylammonium	<b>pI</b>	Isoelectric point
<b>DHN</b>	Déhydrine	<b>PIP</b>	Plasma Intrinsic Protein
<b>DREB</b>	Dehydration responsive element-binding	<b>PLS-DA</b>	Partial Least-Squares Discriminant Analysis
<b>EDTA</b>	Ethylène Diamine Tétra-Acétate	<b>POD</b>	Peroxidase
<b>EST</b>	Expressed sequence tag	<b>PPO</b>	Polyphenol oxidase
<b>FC</b>	Field Capacity	<b>PS II</b>	Phytosystème II
<b>GA</b>	Gibberellic acid	<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidone
<b>GB</b>	Gibbérélines	<b>RNM</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>GC-MS</b>	Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse	<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>GIP</b>	GlpF-Like Intrinsic Proteins	<b>RT-qPCR</b>	Reverse Transcriptase- quantitative - Polymerase Chain Reaction.
<b>GR</b>	Glutathione reductase	<b>SA</b>	Salisilique acide
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Eau oxygéné	<b>SAGE</b>	Serial Analysis of Gene Expression
<b>HIP</b>	Hybrid Intrinsic Proteins	<b>SIP</b>	Small Intrinsic Protein
<b>GPX</b>	Glutathione peroxidase	<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>GSDB</b>	Gene Structure Display Server	<b>SOS</b>	Salt overly sensitive
<b>HTM</b>	Hélices transmembranaires	<b>TIP</b>	Tonoplast Intrinsic Protein
<b>IT-MS</b>	Ion Trap–Mass Spectrometry	<b>VIP</b>	Variable Importance in the Projection
<b>ITS</b>	Internal transcribed spacer	<b>XIP</b>	Uncategorized x Intrinsic Proteins
<b>JA</b>	Jasmonic Acid		
<b>KEA</b>	K <sup>+</sup> efflux antiporteur		

## Liste des Annexes

Annexe 1: Numéros d'accessions des séquences des gènes candidats d'aquaporine .....	1
Annexe 2: Caractéristiques des amorces SSR du gène aquaporine .....	5
Annexe 3: Les séquences protéiques et nucléotidiques des gènes NHX prédits chez <i>A. spinosa</i> L.....	23
Annexe 4: Hélices transmembranaires des gènes NHX prédits chez <i>A. spinosa</i> L.....	24
Annexe 5:Diagrammes de Venn des métabolites communs et spécifiques accumulés.....	25
Annexe 6: Les principaux métabolites et leurs VIP, fold change et p value .....	26
Annexe 7: Les séquences protéiques et nucléotidiques des gènes d'AQP prédits chez <i>A. spinosa</i> L. .	28
Annexe 8: Matrice de similarité des séquence protéiques entre les gènes <i>AsAQP</i> .....	32
Annexe 9: Vérification de la qualité et la quantité d'ARN extrait .....	32

## Sommaire

<b>Dédicaces</b> .....	<b>i</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>ii</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>v</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vi</b>
<b>Production scientifique</b> .....	<b>vii</b>
a. Publications .....	vii
b. Communications .....	vii
<b>Liste des Figures</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des Abréviations</b> .....	<b>ix</b>
<b>Liste des Annexes</b> .....	<b>x</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
1. Contexte de l'étude .....	1
2. Objectifs.....	2
3. Organisation de la thèse .....	2
<b>Partie I : Revue bibliographique</b> .....	<b>5</b>
<b>I.1. L'arganier: <i>Argania spinosa</i> L. Skeels</b> .....	<b>5</b>
I.1.1. Présentation de l'espèce : origine, caryotype, aire de répartition et exigences écologiques .....	5
I.1.2. Description botanique.....	7
I.1.3. Intérêts et usages de l'arganier .....	8
I.1.4. État de situation des réponses de l'arganier face aux stress abiotiques.....	9
<b>I.2. Stress abiotiques chez les plantes</b> .....	<b>11</b>
I.2.1. Définition du stress.....	11
I.2.2. Stress salin .....	12
I.2.3. Stress hydrique .....	14
<b>I.3. Réponses des plantes aux stress abiotiques</b> .....	<b>16</b>
I.3.1. Réponses morphologiques.....	17
I.3.2. Réponses physiologiques et biochimiques .....	18
I.3.3. Réponses métaboliques.....	21
<b>I.4. Régulations moléculaires en réponse au stress</b> .....	<b>22</b>
I.4.1. Signalisation et perception du stress.....	23
I.4.2. Gènes et leurs produits induits en cas de stress .....	24
I.4.3. Régulation des flux d'eau par les aquaporines (AQPs).....	24
I.4.3.1. Aperçu sur les AQPs .....	24
I.4.3.2. Classes des AQPs .....	25
I.4.3.3. Structure et fonctions des AQPs.....	27
I.4.3.4. Réponses des AQPs au stress abiotique .....	28
<b>I.5. Régulation de compartimentation vacuolaire du sodium par les antiporteurs NHX</b> .....	<b>30</b>
I.5.1. Généralité sur les NHXs .....	30
I.5.2. Structure des NHXs .....	31
I.5.3. Fonction des NHXs .....	32
<b>I.6. Approches -Omiques et stress abiotiques des plantes</b> .....	<b>33</b>
I.6.1. Aperçu général sur les -omiques .....	33
I.6.2. Approches génomiques.....	34
I.6.3. Approches transcriptomiques .....	35
I.6.4. Approches protéomiques .....	35
I.6.5. Approches métabolomiques .....	36
I.6.6. Approches lipidomiques .....	38
I.6.7. Bio-informatique .....	39
<b>Partie II : Matériel et méthodes</b> .....	<b>40</b>
<b>II.1. Analyses bio-informatiques in silico</b> .....	<b>40</b>
II. 1.1. Recensement des membres de famille des gènes AQPs et NHXs.....	40
II. 1.2. Analyses In silico des séquences .....	41
II.1.2.1. Annotation des séquences .....	41
II.1.2.2. Alignement multiple et phylogénie .....	41

II.1.2.3.	Motifs et structures des familles des gènes .....	42
II.1.2.4.	Design d'amorces SSR et validation .....	42
<b>II.2.</b>	<b>Expérimentation sur l'Arganier (<i>Argania spinosa</i> L.).....</b>	<b>43</b>
II.2.1.	Matériel végétal .....	43
II.2.2.	Mise en place de l'expérimentation et l'application du stress .....	44
<b>II.3.</b>	<b>Mesure des traits biochimiques .....</b>	<b>45</b>
II.3.1.	Extraction d'enzymes et dosage d'activité enzymatique .....	45
II.3.2.	Teneur en proline .....	45
II.3.3.	Teneur en chlorophylle .....	45
II.3.4.	Dosage des sucres solubles .....	46
II.3.5.	Teneur en phénols totaux .....	46
<b>II.4.</b>	<b>Analyse d'expression des gènes candidats : Aquaporines .....</b>	<b>47</b>
II.4.1.	Extraction des ARN totaux .....	47
II.4.2.	Synthèse ADNc par Transcription Inverse .....	48
II.4.3.	Dessin de couples d'amorces .....	49
II.4.4.	PCR en temps réel (RT-qPCR) .....	49
<b>II.5.</b>	<b>Analyse métabolomique par GC-MS .....</b>	<b>50</b>
II.5.1.	Préparation des échantillons .....	50
II.5.2.	Analyses par GC-MS .....	51
II.5.3.	Traitement et analyse des données.....	51
<b>Partie III : Résultats et présentation des articles.....</b>		<b>52</b>
<b>III.1.</b>	<b>Recherche de bio-marqueurs fonctionnels de type SSR associés aux gènes de la famille de l'aquaporine chez l'arganier.....</b>	<b>52</b>
III.1.1.	Contexte .....	52
III.1.2.	Article 1: In Silico development of new SSRs primer for aquaporin linked to drought tolerance in plants .....	53
III.1.3.	Synthèse .....	61
<b>III.2.</b>	<b>Analyse in Silico de la famille de gène Antiporteur (NHX) sur la base du génome .....</b>	<b>63</b>
III.2.1.	Contexte .....	63
III.2.2.	Article 2: Plant NHX Antiporters: from function to biotechnological application, with case study .....	64
III.2.3.	Synthèse .....	78
<b>III.3.</b>	<b>Étude de l'expression des gènes Aquaporines impliqués dans la tolérance au stress hydrique chez <i>Argania spinosa</i> L.....</b>	<b>80</b>
III.3.1.	Contexte .....	80
III.3.2.	Article 3: en cours de préparation.....	81
III.3.3.	Abstract.....	81
III.3.4.	Introduction.....	82
III.3.5.	Materials and Methods.....	83
III.3.6.	Results.....	88
III.3.7.	Discussion .....	97
III.3.8.	Conclusion .....	101
III.3.9.	Synthèse .....	106
<b>III.4.</b>	<b>Profilage métabolique des écotypes d'arganiers sous conditions de stress hydrique.....</b>	<b>112</b>
III.4.1.	Contexte .....	112
III.4.2.	Article 3 : Soumis au journal "Applied Biochemistry and Biotechnology".....	113
III.4.3.	Abstract.....	113
III.4.4.	Introduction.....	114
III.4.5.	Materials And Methods .....	115
III.4.6.	Results.....	118
III.4.7.	Discussion .....	123
III.4.8.	Conclusion .....	128
III.4.9.	Synthèse .....	136
<b>IV.</b>	<b>Conclusion Générale et Perspectives .....</b>	<b>139</b>
<b>Références.....</b>	<b>.....</b>	<b>144</b>

# *Introduction générale*

## Introduction générale

### 1. Contexte de l'étude

Les changements climatiques sont devenus une préoccupation de plus en plus importante depuis ces dernières décennies. Partout dans le monde, de nombreux indices témoignant de changements ont déjà été observés (Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2018). Se trouvant dans une zone de transition entre un climat chaud et sec au Sud et un climat doux et humide au Nord, la région méditerranéenne est considérée comme la zone la plus affectée par les variations climatiques (IPCC, 2007).

Les changements climatiques sont susceptibles d'entraîner une augmentation de la température. Ils peuvent entraîner de graves menaces sur la pérennité et la durabilité de l'écosystème naturel, indépendamment ou en synergie avec les pressions anthropiques (surpâturage, déforestation...) (Martin, 2012). Les effets de ces changements sont remarquables dans les régions arides et semi arides où le manque d'eau et la salinité des sols sont parmi les principaux facteurs abiotiques. C'est le cas notamment de la région méditerranéenne dont le Maroc (McGregor *et al.*, 2009). Ce dernier est considéré comme l'un des pays les plus riches en biodiversité dans la région méditerranéenne, disposant d'une quarantaine de grands types d'écosystèmes (HCEFLCD, 2017).

Les arganeraies représentent l'une des principales formations forestières des zones arides et semi-arides marocaines qui se trouvent sous la menace des changements climatiques (Nouaim *et al.* 1991). Elles seront confrontées dans un futur proche à des sécheresses édaphiques plus intenses et plus fréquentes qu'elle ne le sont actuellement (Moukrim *et al.*, 2019). Elles fournissent des atouts dignes d'intérêt, non seulement sur le plan écologique, mais surtout sur le plan socioéconomique, constituant un rempart naturel au désert et un potentiel de séquestration de carbone. De plus, cette formation végétale de type méditerranéen aride est connue par son endémicité et son comportement adaptatif aux environnements arides. Cette adaptation entraîne des changements subtils dans les processus morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires (Deinlein *et al.*, 2014).

Bien que beaucoup de travaux se sont intéressés à la tolérance de l'arganier au stress abiotiques, la plupart se sont concentrés sur les aspects physiologiques et biochimiques, alors que l'étude métabolomique et l'expression des gènes impliqués dans la tolérance de l'arganier aux stress hydrique et salin n'ont jamais été étudiées. La détermination des composantes moléculaires sous-jacents à des mécanismes de tolérance par le biais des approches omics (génomique, transcriptomique, métabolomique) permet de mettre en évidence les voies

métaboliques et les gènes candidats clés impliqués non seulement dans la protection de la plante mais aussi dans sa réponse aux stress environnementaux.

Les récents progrès en génomique ont permis de mettre en évidence différentes approches pour étudier la tolérance des plantes aux stress. En effet, l'identification des gènes candidats induits en condition de stress semble, actuellement, retenir l'attention d'un grand nombre de chercheurs. Cette voie constitue une alternative intéressante pour sélectionner des génotypes tolérants aux stress abiotiques. Par ailleurs, l'étude de métabolome constitue ainsi un nouveau domaine analytique qui représente, via l'analyse de l'ensemble des métabolites présents et excrétés par un échantillon biologique, l'ultime réponse à un stress.

L'originalité de ce travail a reposé sur son approche pluridisciplinaire faisant intervenir une analyse génomique (approche gène candidats), transcriptomique (étude d'expression des gènes : cas de l'aquaporine) et du métabolomique (analyse des profils lipidomiques). L'élucidation de ces diverses approches reste la clé pour la sauvegarde de cette espèce, sa préservation face aux changements climatiques et son amélioration via des programmes de sélection assistée par des marqueurs identifiés.

## **2. Objectifs**

Ce présent travail a pour objectif principal d'évaluer la capacité d'adaptation d'écotypes d'arganier issus de différentes régions à travers l'étude de leur comportement physiologique, biochimique, métabolomique et génomique, sous l'effet de stress hydrique et salin.

Cet objectif global sera atteint à travers plusieurs objectifs spécifiques qui sont comme suit :

- Identifier *In silico* les gènes candidats impliqués dans la tolérance au stress abiotiques (hydrique et salin).
- Comprendre et élucider les voies de réponses physiologiques et biochimiques de l'arganier au stress hydrique.
- Explorer les caractéristiques métabolomiques et l'expression des gènes d'aquaporines sous différentes conditions de stress hydrique.

## **3. Organisation de la thèse**

Le manuscrit est organisé en trois grandes parties dont une est en anglais présentée sous forme d'articles. La première partie consacrée à une synthèse bibliographique est, à son tour, structurée en cinq parties :

- Le premier chapitre présente les caractéristiques botaniques, l'aire de répartition l'importance économique ainsi que l'état des lieux de l'*Argania spinosa* L.
- Le deuxième partie détaille les différents stress abiotiques (stress hydrique et salin), les effets néfastes et les mécanismes de tolérance des plantes aux stress abiotiques.
- Le troisième chapitre traite des réponses des plantes au stress. En décrivant les réponses morphologiques, physiologiques, métaboliques et moléculaires.
- Le quatrième chapitre passe en revue les gènes codant les aquaporines et les antiporteurs, leurs structures, leurs localisations et leurs rôles fonctionnels.
- Et le dernier chapitre traite les différentes approches omics et leur implication afin de comprendre les réponses des plantes aux stress abiotiques.

La deuxième partie s'intéresse aux principales méthodologies utilisées en commençant par l'analyse *In silico*, la description du matériel végétal, le dispositif expérimental ainsi que les méthodes d'analyses appliquées durant ce travail.

La troisième partie présente les résultats sous forme d'articles, dont deux publiés, un article soumis et un article en cours de préparation :

- Le premier article publié intitulé «**In Silico development of new SSRs primer for aquaporin linked to drought tolerance in plants**», est présenté sous forme d'un article scientifique qui s'intéresse au développement des bio-marqueurs SSR, via des outils bio-informatiques, potentiellement impliqués à la tolérance au stress hydrique chez l'arganier.
- Le deuxième article publié porte sur «**Plant NHX Antiporters: From Function to Biotechnological Application, with Case Study**», est une revue bibliographique présentée également sous forme d'un article. Cette revue porte sur l'étude très fine d'une famille de gènes codant des antiports  $N^+/H^+$  (NHXs). De plus, une analyse *In silico* a été adoptée afin de prédire et d'identifier les gènes antiporteurs (NHX) susceptibles d'être impliqués dans la tolérance au stress salin chez l'arganier.
- Le troisième article en cours de préparation intitulé «**Genome-wide identification and analysis of the AQP gene family in Argan tree (*Argania spinosa* L.)**» et qui a comme objectif d'évaluer les réponses physiologiques, biochimiques et moléculaires des plantules d'arganiers en relation avec l'expression de la famille des gènes codant des protéines membranaires 'les aquaporines' impliqués dans la tolérance au stress

hydrique, en réponse à différents traitements (quatre régimes d'eau) appliqués aux jeunes plants.

- Le quatrième un article soumis sous le titre « **Lipidomic profiling of *Argania spinosa* L. (Skeels) following drought stress** ». Il s'intéresse à l'étude du lipidome des quatre écotypes soumis à un stress hydrique (0% de la capacité au champ) comparativement aux écotypes témoins moyennant une analyse métabolomique via la méthode GC-MS.

*Partie I :*  
*Revue bibliographique*

## Partie I : Revue bibliographique

### I.1. L'arganier: *Argania spinosa* L. Skeels

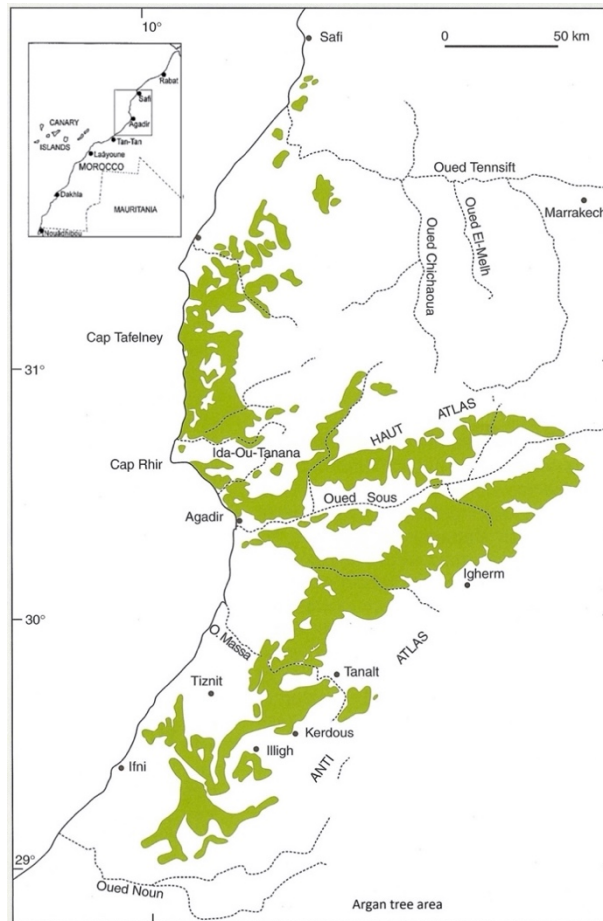
#### I.1.1. Présentation de l'espèce : origine, caryotype, aire de répartition et exigences écologiques

L'arganier fait partie de la famille tropicale des Sapotacées (ordre Ericales). La famille des Sapotacées comprend plus de 50 genres et 800 espèces d'arbres et d'arbustes avec une répartition presque mondiale et dont la plupart s'épanouissent dans les régions tropicales et subtropicales d'Asie et d'Amérique du Sud (Govaerts *et al.*, 2001 ; Pennington, 1991). Sideroxyleae est une sous-famille des Sapotacées d'environ 80 espèces d'arbres et comprend *Argania spinosa* L. comme l'unique espèce du genre mono-spécifique *Argania* (Pennington, 1991). Cependant, cette classification admise ne fait pas l'unanimité. En effet, dans une étude focalisée sur l'évolution des Sapotaceae et sur la base de séquences ndhF, Anderberg et Swenson (2003) ont proposé que le genre *Argania* doit être intégré avec le genre *Sideroxylon*. Plus tard, Stride *et al.*, (2014), dans leur étude sur le statut taxonomique de l'arganier reposant sur des marqueurs chloroplastiques (trnH-psbA) et nucléaires (ITS) de plusieurs espèces du genre *Sideroxylon*, ont trouvé une forte relation entre les espèces *Argania spinosa* L. et *Sideroxylon mascatense* et ont conclu que leur appartenance au genre *Sideroxylon* est indiscutable.

*Arganier spinosa* L. est une diploïde avec dix petites paires de chromosomes ( $2n=2x= 20$ ) et son caryotype prédit est représenté par six paires de chromosomes métacentriques (taille moyenne de 0,59 à 1,03  $\mu\text{m}$  ) et quatre paires de chromosomes sous-métacentriques (taille moyenne de 1,14 à 1,69  $\mu\text{m}$ ) (Majourhat *et al.*, 2007). Il endémique du Maroc et constitue l'un des arbres les plus remarquables d'Afrique du Nord (Médail et Quézel, 1999 ; Khallouki *et al.*, 2017).

L'arganeraie a été déclarée comme réserve de biosphère du Maroc par l'UNESCO en décembre 1998. Puis en 2010, l'Assemblée générale des Nations Unies a proclamé le 10 mai journée internationale de l'arganier. Elle occupe le deuxième peuplement forestier du pays avec une superficie avoisinante de 830.00 hectares (IFN, 2005). L'arganier est largement répandu depuis Safi au Nord jusqu'au fleuve Draa au Sud, et à la fois dans la plaine du Souss et le piémont du Haut et de l'Anti-Atlas (Peltier, 1982). Il est également présent en forme de populations isolées au Nord-Est du Maroc sur le versant méditerranéen du massif montagneux des Bni-Snassen près d'Oujda et dans la haute vallée de l'Oued Grou au Sud-Est de Rabat

(Msanda *et al.*, 2005) (Figure 1). Ces deux colonies isolées paraissent être issues d'une dispersion relative récente, probablement due à l'activité des pâturages des nomades (El Mousadik et Petit, 1996). En outre, des espèces d'arganiers ont été introduite comme espèce cultivée dans les déserts de Tunisie, d'Israël et d'Afrique du Sud, entre autres parties du monde (Khallouki *et al.*, 2017).



**Figure 1: Aire de répartition de l'arganier (Msanda *et al.*, 2003)**

L'arganier est un arbre qualifié souvent d'espèce thermophile et xérophile. Il pousse de façon sauvage et en abondance dans les bioclimats sem-aride, aride, voire saharien (Benabid, 2000; Msanda *et al.*, 2005; Nouaim *et al.*, 1991). La pluviosité dans l'aire de l'arganeraie est très contrastée d'une année à l'autre et est généralement comprise entre 150 et 400 mm. Dans les zones à caractère désertique, elle n'atteint pas 100 mm (Msanda *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'arganier admet un étagement altitudinal de grande amplitude. Sa forte plasticité lui permet de s'étendre sur une tranche altitudinale allant du niveau de la mer jusqu'à plus ou moins 1500 m d'altitude (TARRIER et Benziane, 2003). À l'échelle thermique, les températures dans les arganeraies se caractérisent par leur douceur avec une température moyenne de 20°C.

Néanmoins, les températures peuvent atteindre des valeurs dépassant 50°C, ou bien descendre nettement au-dessous de 0°C selon les années.

L'humidité relative est un caractère climatique majeur de l'aire géographique de l'arganier et semble être un facteur déterminant pour le développement de l'arganier. Cette humidité, qui dépasse fréquemment 90 % pour la plupart des mois de l'année, est accompagnée souvent des brouillards rosées, associés à des formations nuageuses basses, qui sont à l'origine de précipitations occultes importantes (Msanda *et al.*, 2005).

Doté d'une plasticité édaphique, l'arganier n'a aucune exigence en termes de la nature physico-chimique du sol. Il semble pousser sur tous les types de sol, sauf les sols à sable mobile et tolère une large gamme de pH allant de 4,6 à 7,5 (Nouaim *et al.*, 1991 ; Msanda *et al.*, 2005). La faculté d'adaptation de l'arganier lui permet de se développer aussi bien sur des schistes, des quartzites, que sur des roches calcaires ou sur des alluvions (Nouaim, 2005). Par conséquent, cet arbre peut se retrouver sur des sols pauvres et peu profonds grâce à son système racinaire profond.

### **I.1.2. Description botanique**

*Argania spinosa* L. est une espèce arborescente, avec ou sans épines et présente une forte variabilité phénotypique (Ferradous *et al.*, 1997). Son port peut être dressé, étalé ou plus rarement pleureur ; sa taille moyenne va de 2,5 à 4,5 m (Zunzunegui *et al.*, 2010), et peut atteindre les 11 m (Ait Aabd *et al.*, 2010). Il possède une couronne largement étendue avec un tronc court, tortueux et souvent formé de plusieurs tiges entrelacées. La ramification est souvent épineuse à son extrémité, très dense, variable et commence à environ un mètre du sol. Le bois de l'arganier, nommé bois de fer, est un bois très dur et lourd à grain fin et de couleur jaunâtre. Quant à l'écorce, elle est grise, rugueuse et fissurée (Benabid, 2000; Grieve, 1917).

Les feuilles sont sub-persistentes, alternes ou fasciculées, simples ou regroupées sous forme de rosettes et variables en termes de forme (ovalées à lancéolées) (Bani-Aameur, 2004). La taille des feuilles varie entre 1,5 et 5 cm (Zahidi *et al.*, 2013a) et possèdent une couleur verte foncée à la face supérieure et plus claire en dessous (M'hirit, 1989; Perrot, 1907).

Les fleurs, hermaphrodites, sont minuscules (1 à 4 mm), monoïques, pentamères, et sont de couleur jaune-verdâtre et parfois blanche. Elles sont souvent réunies en glomérules situées au niveau des entrenœuds ; et on peut compter jusqu'à 15 fleurs par glomérule (Ferradous *et al.*, 1996 ; Bani- Aameur, 2000).

Le fruit de l'arganier est variable en termes de phénotype (Bani-Aameur *et al.*, 1999 ; Bani-Aameur and Ferradous, 2001; Ait Aabd *et al.*, 2011, 2012; Zhar *et al.*, 2016). Il s'agit d'une fausse drupe (Rammal *et al.*, 2009) de taille variable allant de l'olive jusqu'à la noix avec différents morphotypes (ovale, arrondi, fusiforme). Cette drupe est composée généralement d'un péricarpe charnu couvrant un noyau très dur qui renferme une à trois amandes oléagineuses. La production fruitière atteint son maximum lorsque l'arbre a 60 ans et le rendement moyen en fruits est estimé à 8 Kg/an/arbre (Zrira, 2017). Cette production est fortement influencée par les aléas environnementaux et le phénomène d'alternance (Aithammou *et al.*, 2019). La longévité de l'arganier peut être estimée approximativement en mesurant la circonférence. Généralement, un arbre de 35 à 45 cm de diamètre aurait 125 à 150 ans (Nouaim, 2005).

### **I.1.3. Intérêts et usages de l'arganier**

Les forêts de l'arganier sont reconnues comme un patrimoine naturel emblématique du pays, ayant une grande importance et couvrant plusieurs secteurs représentés principalement dans les composantes écologique, économique et sociale.

L'arganier est un arbre symbolique qui se distingue par un large éventail d'utilisations et présente un intérêt socio-économique majeur dans la subsistance des populations rurales du sud-ouest marocain. En effet, 2,2 millions de ces populations dépendent directement de l'exploitation de la forêt d'arganiers (Laaribya *et al.*, 2017). Cet arbre fournit un excellent combustible, son bois dur, lourd et résistant est une ressource tant pour le charbonnage que pour la fabrication des outils agricoles ou la charpenterie (Nouaim, 2005). Son feuillage persistant constitue un véritable pâturage suspendu pour les chèvres, tandis que le tourteau et la pulpe sont destinés à l'alimentation du bétail et sont parfois utilisés comme engrais. Par ailleurs, la réelle valeur de cet arbre repose principalement sur ses amandes d'où est extraite son huile très prisée. L'huile d'argan est renommée à l'échelle internationale pour ses vertus cosmétiques et alimentaires et également utilisée pour des fins thérapeutiques.

Outre ses intérêts socio-économiques, l'arganier joue un rôle central dans l'équilibre écologique. Grâce à ses profondes et puissantes racines, l'arganier assure la protection du sol contre les érosions éoliennes et constitue une barrière vivante contre l'avancée du désert. De plus, il constitue un potentiel de séquestration de carbone et participe à la formation du sol et son enrichissement par ses apports (feuilles et racines mortes) et par la végétation qui pousse sous son ombre. Cette ombre fournie par l'arbre favorise également un microclimat pour le

développement de nombreux organismes vivants, ce qui augmente considérablement la biodiversité des zones naturelles (Nouaim, 2005).

#### **I.1.4. État de situation des réponses de l'arganier face aux stress abiotiques**

Les plantes sont confrontées en permanence à des stress environnementaux tels que la sécheresse et la salinité se traduisant par des perturbations (changements) dans leur état normal physiologique, biochimique et moléculaire. Au cours de leur évolution, les plantes ont su développer diverses stratégies leur permettant de faire face à ces perturbations environnementales. L'intérêt que portent les chercheurs aux aspects physiologiques, biochimiques et moléculaires de la réponse des plantes au stress est grandement justifiable. De nombreux travaux dans ce domaine ont été développés, couvrant divers aspects, avec comme principal objectif, l'aptitude des plantes à croître et à survivre en conditions limitantes.

La plupart des études publiées jusqu'à présent sur les mécanismes de tolérance aux stress abiotiques chez l'arganier ont été fondées sur des réponses morphologiques, physiologiques et biochimiques. La compréhension du comportement écophysologique de l'arganier vis-à-vis de la disponibilité en eau a été élucidée par les travaux de El Aboudi *et al.* (1991) et Peltier *et al.* (1992). Les résultats montrent une tolérance du potentiel hydrique foliaire très bas sans fermeture des stomates, une transpiration pendant toute la période estivale et une capacité d'extraire de l'eau à de grandes profondeurs grâce à son système racinaire très développé. De plus, Peltier *et al.*, (1992) indiquent que les variations simultanées du potentiel hydrique foliaire et de la transpiration sont l'indice de la participation à un réservoir interne de l'arbre.

Une des premières études, réalisée par Bouzoubaâ et El Mousadik (2003) a été menée pour déterminer en conditions contrôlées les seuils de tolérance de l'arganier, au stade germination, aux facteurs abiotiques tels que la température, la salinité et le déficit hydrique. Ces auteurs ont trouvé que l'arganier est sensible aux basses températures et tolérant aux hautes températures, assez tolérant à la salinité et moyennement tolérant au déficit hydrique. Dans le même sens, Tazi *et al.*, (2003) ont noté que le stress hydrique induit par le polyéthylène glycol (PEG-6000) a un effet sur la faculté germinative des graines d'arganier *in vitro* en réduisant leur taux de germination. De plus, la production des biomasses totales aérienne et racinaire a été également affectée par le stress.

De nombreux travaux sont ensuite intéressés à la tolérance des jeunes plants d'arganier sujettes à des conditions de stress hydrique ou salin dans le but d'étudier son comportement

face à ces facteurs stressants, et d'élargir les connaissances sur sa tolérance-résistance à un stress. Comme la plupart des espèces, *Argania spinosa* L. développe des mécanismes adaptatifs pour tolérer le stress hydrique. Zahidi *et al.* (2013b) ont constaté que la contrainte hydrique a entraîné une réduction considérable de la hauteur des plantules, du nombre de feuilles, de la surface foliaire, de la production de biomasse et de la teneur relative en eau. Ils ont aussi observé une augmentation significative de la longueur des parties racinaires et aériennes. Selon Meslem *et al.*, (2015), les plantules d'*Argnaia spinosa* L. stressées surmontent l'effet du stress hydrique par une élongation racinaire. Le maintien d'un système racinaire important sous stress hydrique permet une meilleure assimilation et une meilleure utilisation de l'eau.

Par ailleurs, il a été démontré qu'*Argania spinosa* L. réduit la conductance stomatique, le potentiel hydrique des feuilles et la teneur relative en eau des feuilles en cas de sécheresse (Chakhchar *et al.*, 2015). De plus, en situation de stress hydrique, il a été montré que la teneur en pigments chlorophylliens diminue (Chakhchar *et al.*, 2018 ; Meslem *et al.*, 2015). Cette diminution est souvent due à une dégradation de la chlorophylle.

Plusieurs études ont indiqué que l'accumulation d'osmolytes tels que la proline et les sucres solubles est l'un des mécanismes d'adaptation souvent développés chez *Argania spinosa* L. contre le stress hydrique (Meslem *et al.*, 2015 ; Chakhchar, 2015 ; Jafarnia *et al.*, 2018). Selon Ben Ahmed *et al.* (2009), ces osmolytes maintiennent l'eau dans le cytoplasme. Hessini *et al.* (2009) ont souligné que les osmolytes préviennent la dénaturation des protéines et les dommages à la membrane cellulaire, ce qui induit une stabilité structurelle des protéines enzymatiques pour préserver leur activité.

L'une des premières réponses biochimiques au stress hydrique chez l'argnaier est la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), dont le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Chakhchar *et al.*, 2015). En vertu des conditions de stress, la production élevée de ROS peut provoquer des dommages cellulaires dus au stress oxydatif et à une peroxydation lipidique accrue (Chakhchar *et al.*, 2015 ; Jafarnia *et al.*, 2018 ; Hachemi *et al.*, 2021). L'augmentation de la peroxydation lipidique peut être déterminée par la teneur en malondialdéhyde (MDA). Pour réguler la production excessive de ROS et prévenir le stress oxydatif, les plantes ainsi que *Argania spinosa* L. ont développé des systèmes enzymatiques qui comprennent la superoxyde dismutase (SOD), la peroxydase (POD) et la polyphénol oxydase (PPO) (Chakhchar *et al.*, 2015 ; Jafarnia *et al.*, 2018 ; Hachemi *et al.*, 2021).

Par ailleurs, une étude récente de Outamamat *et al.* (2022), sur l'inoculation du système racinaire par un complexe indigène de champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) et l'effet de différents régimes hydriques, souligne l'impact de cette symbiose sur l'amélioration de la tolérance de l'arganier à la sécheresse. Les auteurs ont noté que la symbiose mycorhizienne était positivement corrélée avec les semis d'arganier en termes de croissance, de nutrition minérale, de teneur en sucre soluble et d'activité enzymatique.

En revanche, aucune étude abordant les mécanismes moléculaires de la tolérance aux stress chez l'arganier n'a pas été documentée jusqu'à présent dans la littérature. À l'échelle moléculaire et en guise de réponse et d'adaptation aux conditions stressantes, les plantes impliquent le fonctionnement coordonné d'un grand nombre de gènes.

Le développement des outils de la génomique a permis de générer des données utiles sur la variation de l'expression des gènes, des profils d'expression des protéines et des métabolites, en réponse à des stress abiotiques. En outre, il devient intéressant d'étudier les enzymes impliqués dans des voies métaboliques particulières et d'identifier les gènes exprimés de manière différentielle en conditions contrôlées et stressantes afin de mieux sauvegarder cette espèce endémique et la préserver face aux changements climatiques en améliorant sa tolérance aux facteurs environnementaux (Mazzucotelli *et al.*, 2008).

## **I.2. Stress hydrique et salin chez les plantes**

### **I.2.1. Définition du stress**

Le terme "stress" peut être défini de différentes manières. Selon Lichtenthaler (1996), il est défini comme 'toute condition ou substance défavorable affectant ou bloquant le métabolisme, la croissance ou le développement d'une plante'. Alternativement, il a été décrit comme 'des changements physiologiques qui se produisent lorsque les espèces sont exposées à des conditions extrêmement défavorables et qui ne représentent pas nécessairement une menace pour la vie, mais induira une réaction d'alarme' (Gaspar *et al.*, 2002), et également comme 'une condition causée par des facteurs engendrant un déséquilibre' (Kranner *et al.*, 2010). D'autres auteurs le définissent comme une anomalie de la physiologie normale, du développement et de la fonction des plantes qui peut causer des dommages irréversibles au système végétal (Nagarajan et Nagarajan, 2009).

Malgré les différences entre ces définitions du stress des plantes, elles sont toutes centrées sur la description d'un changement dans les conditions qui affectent la plante, la réponse de la plante et le niveau de dommage provoqué par ce changement (Mosa *et al.*, 2017).

### **I.2.2. Stress salin**

La disponibilité des minéraux et des nutriments dans le sol a une grande importance. Cependant, la présence inutile de sels solubles provoque un stress osmotique et ionique sévère chez les plantes (Sazzad, 2007). Le stress salin ou la salinité peut être défini comme étant le résultat de la présence de quantités excessives de sels solubles, principalement le chlorure de sodium et les sulfates dans le sol (Karan et Subudhi, 2012).

La salinité du sol est l'un des principaux stress abiotiques qui entravent la croissance et la productivité des cultures dans le monde (Ahmad *et al.*, 2019). Il a été rapporté qu'environ 20 % des terres irriguées sont affectées par le sel, ce qui représente un tiers des terres de production alimentaire (Gregory *et al.*, 2018). De plus, il a été prévu que la moitié des champs agricoles seront affectées par la salinité d'ici le milieu du 21<sup>ème</sup> siècle (Shahid *et al.*, 2018). Les zones touchées par le sel augmentent à un taux de 10 % par an pour diverses raisons, notamment de faibles précipitations, de l'évaporation foliaire élevée, de mauvaises pratiques culturales et l'irrigation par d'eau salée (Shrivastava et Kumar, 2015). La salinité génère généralement deux types de stress chez les plantes: osmotique et ionique (İbrahimova *et al.*, 2021).

#### **I.2.2.1. Stress osmotique**

Le sel exerce un effet osmotique sur la plante dès que leurs racines sont en contact avec une concentration du sel dépassant le niveau normal. En d'autres termes, le stress osmotique est se traduit comme étant une moindre disponibilité en eau pour les plantes (Munns et Tester, 2008). A cette situation, les plantes diminuent leur potentiel osmotique à cause de la présence d'ions dans la rhizosphère qui limitent l'extraction de l'eau par les racines, ce qui entraîne une diminution du potentiel hydrique du sol. La cellule doit alors ajuster son potentiel osmotique afin d'éviter des pertes d'eau (Parihar *et al.*, 2015).

#### **I.2.2.2. Stress ionique**

Le stress ionique est spécifique du stress salin, il est dû à une combinaison de la toxicité des ions comme le sodium ( $\text{Na}^+$ ) et le chlore ( $\text{Cl}^-$ ) accumulés en excès dans la partie aérienne de la plante et l'incapacité à tolérer les ions qui sont accumulés dans les tissus végétaux (Munns et Tester, 2008). Dans le cas de salinité, l'accumulation d'ions  $\text{NaCl}$  perturbe l'homéostasie des ions cytosoliques de l'organisme (Munns et Tester, 2008) et affecte l'activité de certaines enzymes en provoquant sa déstabilisation.

### I.2.2.3. Effets du stress salin sur les plantes

Le stress salin entraîne des perturbations de nombreux processus biochimiques et physiologiques qui affectent négativement la croissance et le développement de la partie aérienne et du système racinaire des plantes. Des concentrations élevées de sel induisent un abaissement du potentiel d'eau qui, à son tour, cause la réduction de l'absorption d'eau par les racines des plantes (Parihar *et al.*, 2015). Elles produisent également une toxicité des ions spécifiques, accumulés en excès, tels que  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  (Ibrahimova *et al.*, 2021).

Le stress salin entraîne un déséquilibre ionique engendrant une réduction d'autres ions indispensables à l'activité enzymatique de la plante. En outre, il provoque un effet osmotique, une insuffisance d'utilisation de l'eau et une carence en nutriments (N, Ca, K, P, Fe et Zn), une formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui conduit finalement à un stress oxydatif chez les plantes (Rehman *et al.*, 2019).

La machinerie de la photosynthèse est également affectée par le stress de salinité, principalement en raison de la réduction de la surface foliaire, de la conductance stomatique et des niveaux de chlorophylle et diminution de l'efficacité du photosystème II (Netondo *et al.*, 2004). En outre, le stress salin, accompagné d'effets osmotiques et ioniques, peut entraîner une carence en  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ , une altération du métabolisme et éventuellement la mort de la plante (Mudgal *et al.*, 2010).

### I.2.2.4. Stratégies d'adaptation à la salinité

Face à des fortes concentrations de sel et pour assurer l'homéostasie ionique, différentes stratégies sont mises en place par les plantes : d'abord la diminution de l'entrée des ions  $\text{Na}^+$ , ensuite son exclusion hors de la cellule, et enfin leur compartimentation au niveau des vacuoles (Yamaguchi et Blumwald, 2005).

Des espèces (glycophytes) possèdent la capacité de restreindre l'entrée des ions toxiques vers leurs tissus. Cette exclusion peut avoir lieu au niveau de la plante entière ou bien au niveau cellulaire (Munns, 2002 ; Tester et Davenport 2003). D'autres espèces (halophytes) ont recours au mécanisme de compartimentation du NaCl dans les vacuoles afin d'éviter leur effet toxique sur l'activité photosynthétique et les processus métaboliques. Ce mécanisme est assuré par l'action d'un antiport vacuolaire sodium/proton ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) (Riadh *et al.*, 2010). Par ailleurs, les plantes utilisent une autre stratégie, qui consiste à synthétiser et accumuler des solutés organiques osmoprotecteurs telles que les sucres et les composés aminés (Hanana *et al.*, 2011).

### **I.2.3. Stress hydrique**

#### **I.2.3.1. Rôle de l'eau chez les plantes**

Les plantes étant en grande partie constituées de l'eau, elle est indispensable pour leur survie et comprend généralement 70 à 95 % de la biomasse des tissus non ligneux tels que les feuilles et les racines. Par conséquent, l'eau est un élément vital pour la croissance et le développement des plantes. Elle est impliquée aussi bien dans les structures que dans les processus de transports et de métabolisme des plantes. Au niveau cellulaire, l'eau est le principal moyen de transport des métabolites à travers la cellule. En raison de sa structure hautement polaire, l'eau dissout facilement de grandes quantités de composés minéraux et de métabolites organiques polaires comme les sucres, les acides aminés et les protéines qui sont essentielles au métabolisme cellulaire (Lambers et Oliveira, 2019).

Au niveau de la plante entière, l'eau est le milieu qui transporte les matières premières (glucides et nutriments) ainsi que les phytohormones nécessaires à la croissance et au développement d'un organe végétal. L'eau distribuée en continue dans la plante joue un triple rôle comme étant un transporteur, un solvant et un réactant. Elle donne aux plantes leur turgescence permettant l'expansion cellulaire dans les tissus en croissance. La transpiration permet aussi de réguler la température interne des parties aériennes grâce aux quantités d'eau perdues sous forme de vapeur d'eau. L'utilisation inefficace de l'eau, par les plantes, est une conséquence inévitable de la photosynthèse (Lambers et Oliveira, 2019).

#### **I.2.3.2. Notions de sécheresse et déficit hydrique**

La sécheresse est une caractéristique normale et récurrente du climat (Dai, 2012), qui se produit particulièrement dans les zones arides et semi-arides et ses caractéristiques peuvent être très différentes d'une région à l'autre (Bray, 2001). Il est considéré comme un stress majeur qui influence négativement la production et le rendement des cultures (Bray, 2007).

C'est un terme général pour la description des phénomènes atmosphériques ou météorologiques. Généralement, elle est définie comme étant une période de pluie insuffisante qui conduit le plus souvent à un stress hydrique (Dai, 2012).

Le stress hydrique se produit quand l'eau disponible dans le sol est insuffisante pour la plante, en raison d'une faible humidité du sol à un certain moment (Keyvan, 2010 ; Dai, 2012), et que le fonctionnement normal de la plante est affecté.

D'autre part, le stress hydrique (carence) de la plante se produit lorsque le taux de transpiration des surfaces foliaires est supérieur à l'absorption d'eau par les racines (Lisar *et*

*al.*, 2012). Ce déséquilibre entre l'absorption d'eau et les pertes d'eau des plantes se produit principalement lorsque le potentiel hydrique du sol est inférieur au potentiel hydrique des racines des plantes (Hirt et Shinozaki, 2003). Plusieurs facteurs peuvent entraîner un déficit hydrique des plantes, notamment des précipitations insuffisantes, une forte demande d'évaporation, une diminution du niveau des eaux souterraines et la rétention d'eau par les particules du sol (Jaleel *et al.*, 2009 ; Farooq *et al.*, 2009).

#### I.2.3.3. Effets du stress hydrique sur les plantes

Le stress hydrique peut affecter de manière significative de nombreux aspects morphologiques et physiologiques des plantes (Bhargava et Sawant, 2013), tels que la photosynthèse, la respiration et le mouvement des ions et le métabolisme primaire (Jaleel *et al.*, 2009). Il réduit considérablement la croissance et le développement des plantes résultant d'une faible humidité dans les plantes, d'une forte intensité de lumière solaire, d'une température élevée causée par la sécheresse (Fathi et Tari, 2016). En effet, la croissance est le processus le plus sensible au stress hydrique. La diminution de la pression turgescence associée au stress hydrique réduit l'expansion cellulaire et la croissance des cellules. Les modifications qualitatives et quantitatives des productions végétales dépendent de la division et la différenciation cellulaire, et toutes ces phases peuvent être affectées par le stress hydrique (Shao *et al.*, 2008).

En condition de stress hydrique, la disponibilité en nutriments est réduite, par conséquent leur absorption et leurs concentrations diminuent drastiquement dans les tissus des plantes (Kheradmand *et al.*, 2014). Le stress hydrique provoque aussi une réduction de l'activité photosynthétique, ralentissant la synthèse des métabolites nécessaires pour la division cellulaire. Par conséquent, les divisions mitotiques, l'élongation et l'expansion cellulaire sont diminuées et accompagnées d'un effet négatif sur la croissance générale de la plante. Cet effet impacte la germination des semis et le développement des plantules (Kaya *et al.*, 2006).

#### I.2.3.4. Mécanismes d'adaptation

Étant des organismes sessiles, les plantes mettent en œuvre différentes sortes d'adaptations, leur permettant d'assurer à la fois leur survie et leur reproduction dans des zones sujettes à des stress. En situation de contrainte hydrique, trois principaux mécanismes ont été décrits : l'esquive, l'évitement, la tolérance et la récupération de la sécheresse (Fang et Xiong, 2015).

i. Esquive

L'esquive permet à la plante de réduire ou annuler l'effet du déficit hydrique grâce à des particularités de leur cycle de développement, ce que signifie que la plante a la capacité d'accomplir son cycle avant que le déficit hydrique ne soit important (Perlikowski et Kosmala, 2020). La précocité permet à la plante de contourner la période de la sécheresse, en assurant une meilleure efficacité de l'utilisation de l'eau (Christensen et Feldmann., 2007). Contrairement aux génotypes tardifs, les génotypes à croissance rapide et à maturité précoce utilisent mieux l'eau disponible et sont moins exposés au stress hydrique (Slama *et al.*, 2005).

ii. Évitement

Les plantes qui pratiquent l'évitement, vont développer un mécanisme qui leur permet de maintenir un potentiel hydrique élevé, afin d'éviter ou de retarder une déshydratation des tissus durant la contrainte. Ce mécanisme d'évitement est principalement assurée par des caractères adaptatifs permettant, d'une part, la minimisation de la perte d'eau par la réduction de la surface foliaire et de la transpiration et, d'autre part, l'augmentation de l'absorption d'eau par un bon développement des racines (Grieu *et al.*, 2008).

iii. Tolérance et la récupération

La troisième stratégie employée par les plantes est la tolérance. Elle repose sur la capacité des plantes d'assurer leurs fonctions physiologiques même à faible potentiel hydrique. Cette stratégie est traduite par des réponses physiologiques, biochimiques et moléculaires complexes. Elle implique un certain nombre de mécanismes, telles l'expression de différents gènes, l'accumulation de divers osmolytes, le piégeage et la détoxification des ROS et d'autres mécanismes pour réduire ou réparer les dommages résultant du stress (Fang et Xiong, 2015). Enfin, la récupération de la sécheresse, une stratégie qui permet à la plante de reprendre leur métabolisme normale après une exposition à un stress sévère causé par un déficit hydrique (Luo, 2010).

### **I.3. Réponses des plantes aux stress hydrique et salin**

Les plantes sont des organismes sessiles souvent exposées à divers stress environnementaux, notamment des stress abiotiques et biotiques (Bray, 2007). Les stress abiotiques, tel que la sécheresse, le froid et la salinité ou leurs combinaisons conditionnent la distribution naturelle des espèces végétales (Repo *et al.*, 2008). La sensibilité des plantes au stress abiotique dépend des espèces, des génotypes et des stades phénologiques. Pour faire face à ces aléas

environnementaux, les plantes ont développé une série de réponses physiologiques, biochimiques et moléculaires qui affectent négativement leur croissance et leur développement. Les différents stress abiotiques présentent des éléments communs et spécifiques à la fois pour les dommages occasionnés et pour la réponse de la plante (Ciarmiello *et al.*, 2011).

### **I.3.1. Réponses morphologiques**

La réponse des plantes au stress abiotique (hydrique et salin) se reflète principalement au niveau des feuilles et des racines, ainsi leurs caractéristiques morphologiques et leur structure anatomique peuvent mieux refléter l'adaptabilité aux environnements défavorables (Suwa *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2020 ; Pedersen *et al.*, 2021). En plus de leur importance dans la fixation et l'absorption des substances à partir du sol, les racines jouent également un rôle essentiel en réponse au stress dû au déficit hydrique (Fang *et al.*, 2017). Non seulement la longueur du système racinaire, son poids, son volume et sa densité mais, aussi sa structure interne sont parmi les caractéristiques les plus importantes pour améliorer l'absorption d'eau et la résistance à des conditions de sécheresse (Fang *et al.*, 2017 ; Strock *et al.*, 2021).

Quant à la réponse des feuilles au stress hydrique, elle s'est avérée très variable dans l'adaptation à l'environnement à long terme. Il a été démontré que les feuilles réagissent de manière similaire sous stress hydrique, en montrant des signes d'étiollement, d'atrophie, d'enroulement, de sénescence et même d'abscission (Patharkar et Walker 2019). Dans certains cas, le stress a entraîné un retard de croissance des feuilles et une réduction de leur nombre et leur surface (Fang *et al.*, 2017 ; Nadal *et al.*, 2020), ainsi que des changements complexes dans l'épaisseur des feuilles, le tissu palissadique et le tissu spongieux pendant l'adaptation (Rueda *et al.*, 2017).

L'excès du sel dans les sols ou dans des solutions entraînent des dommages morphologiques. En effet, il réduit la croissance des plantes (Munns et Tester, 2008), limite l'expansion des feuilles (Cramer, 2002), modifie le rapport du ratios des parties aériennes et celles des parties souterraines (Tattini *et al.*, 1995), et change également l'architecture du système racinaire (Munns, 2005).

La croissance normale des plantes est réduite par une augmentation du potentiel osmotique du sol et crée un déficit hydrique pour la plante, dont les racines inaptes à absorber l'eau. De ce fait, le potentiel hydrique foliaire baisse aussi. La réduction de la surface foliaire est une réponse typique du stress salin. En effet, la diminution de la croissance foliaire est une réponse plus précoce des glycophytes exposés au stress salin (Munns et Termaat, 1986).

Sous un stress, les racines des plantes sont les premiers organes qui détectent les conditions défavorables telles que l'excès de sel dans le sol. Elles continuent à se développer en favorisant des surfaces supplémentaires pour séquestrer les ions toxiques. D'autres caractéristiques des racines, telles que le nombre de poils absorbants, le diamètre des vaisseaux du xylème, la largeur du cortex racinaire sont des réponses adaptatives contre le stress salin (Steudle, 2000 ; Ranathunge *et al.*, 2010).

### **I.3.2. Réponses physiologiques et biochimiques**

#### **I.3.2.1. Photosynthèse et la teneur en chlorophylle**

Parmi les mécanismes qui se mettent en place en réponse aux stress abiotiques, la photosynthèse est particulièrement étudiée (Chaves *et al.*, 2009). Les stomates ont double fonction principale chez les plantes. En effet, d'une part, elles régulent la transpiration, qui fournit aux plantes des nutriments et régule la température des feuilles et, d'autre part, elles contrôlent l'entrée de CO<sub>2</sub> dans la feuille. La réduction de l'ouverture des stomates provoquée par le déficit hydrique est l'une des premières réponses des plantes. A long terme, cela induit une altération dans la photochimie et/ou le métabolisme du carbone qui, entraîne l'arrêt des processus photosynthétiques (Araújo *et al.*, 2019). L'inhibition de la photosynthèse est associée à une diminution du taux de l'assimilation du CO<sub>2</sub> dans les feuilles, ce qui provoque une augmentation de la dissipation de l'énergie d'excitation du photosystème II (PS II), entraînant des photo-endommagements des centres réactionnels du PS II (Neil *et al.*, 2006).

La fermeture des stomates considérée comme une réponse d'adaptation au stress hydrique, permet à la plante d'économiser de l'eau et de maintenir une teneur élevée en eau des tissus (Saradadevi *et al.*, 2017). En plus, une déficience en CO<sub>2</sub> intracellulaire peut altéré les réactions biochimiques et par conséquent, occasionner une diminution de l'activité de la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO), ce qui limite la régénération du ribulose biphosphate (RuBP), substrat du cycle de Calvin (Wang *et al.*, 2018).

Les contraintes environnementales, telles que la sécheresse et la salinité, génèrent la formation des ROS qui oxydent les pigments photosynthétiques et par conséquent, l'inactivation potentielle de la photosynthèse causée par la diminution de la teneur en chlorophylle. Ce déclin en pigments chlorophylliens résultant de la photooxydation des pigments et la dégradation de la chlorophylle, est considéré comme un symptôme du stress oxydatif (Rahdari *et al.*, 2012 ; Taïbi *et al.*, 2016).

### I.3.2.2. Régulation des phytohormones

Étant des organismes sessiles, les plantes ont développé de nombreuses stratégies pour maintenir la croissance et le développement dans des conditions stressantes. Les phytohormones sont l'une de ces stratégies qui jouent un rôle essentiel dans la régulation d'un large éventail de stimuli environnementaux. Elles sont reconnues comme des régulatrices clés de la croissance et des processus de développement des plantes, ainsi ils jouent un rôle crucial dans la réponse aux stress abiotiques (Fahad *et al.*, 2015 ; Wani *et al.*, 2016). Ces derniers peuvent altérer la biosynthèse, l'accumulation et la distribution de plusieurs phytohormones, notamment l'acide abscissique (ABA), l'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA), l'acide indole-3-acétique (AIA), les gibbérellines (GA) et les cytokinines (CK) (Eyidogan *et al.*, 2012).

L'acide abscissique est considéré comme la principale hormone sensible au stress. Il est principalement synthétisé dans les racines et est ensuite transféré aux feuilles pour maintenir le statut hydrique des cellules grâce à la fermeture des stomates, à des activités des canaux et à l'expression des gènes sensibles à l'ABA (Fahad *et al.*, 2015 ; Ullah *et al.*, 2018). De plus, l'ABA peut également induire la modification du métabolisme des lipides primaires (Gollmack *et al.*, 2014) et permet de réguler la synthèse d'osmoprotecteurs, les enzymes anti-oxydantes et l'expression de plusieurs gènes et protéines. Il est impliqué également dans la modification de l'architecture du système racinaire en favorisant l'allongement des racines pour atteindre les eaux profondes du sol lors de conditions de déficit hydrique (Comas *et al.*, 2013 ; Wani *et al.*, 2016 ; Ullah *et al.*, 2018).

Outre son implication dans les processus de reproduction, le développement des racines et la maturation des fruits, l'acide jasmonique (JA) et ses dérivés jouent un rôle central dans la réponse au stress hydrique et salin chez les plantes (Fahad *et al.*, 2015 ; Wani *et al.*, 2016). La biosynthèse de l'acide jasmonique se produit généralement dans les feuilles, en particulier dans les chloroplastes et les peroxysomes (Cheong et Choi, 2003), bien que certains rapports mentionnent également les racines comme organe de synthèse de cette hormone (Fahad *et al.*, 2015). Chez les plantes, comme l'ABA, JA induit la tolérance au stress hydrique et salin de différentes manières, notamment la fermeture des stomates, le piégeage des ROS et le développement des racines.

L'acide salicylique (SA) est un composé phénolique des plantes impliqué généralement dans leur défense contre des agents pathogènes. Il active l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites secondaires, des chaperons et des protéines de choc thermique

(Miura et Tada, 2014). Par ailleurs, plusieurs travaux ont démontré que cette hormone a également un rôle important dans la réponse aux stress abiotiques (Fahad et Bano, 2012 ; Miura *et al.*, 2013). La biosynthèse de SA dans les chloroplastes à des faibles concentrations améliore la capacité anti-oxydante des plantes, alors que des fortes concentrations peuvent entraîner la mort des cellules ou une certaine sensibilité au stress abiotique (Jumali *et al.*, 2011).

L'acide indole-3-acétique est largement reconnu pour ses implications dans la croissance et le développement des plantes (Fahad *et al.*, 2015). En outre, lors de déficit hydrique et de stress salin, cette phytohormone semble coordonner la croissance (Eyidogan *et al.*, 2012 ; Iqbal *et al.*, 2014) et induire l'expression de gènes liés à l'initiation du méristème racinaire, favorisant la ramification racinaire et augmentant la tolérance des plantes au stress (Wolters et Jürgens, 2009).

#### I.3.2.3. Ajustement osmotique

Les plantes peuvent adopter des stratégies pour résister à la salinité et au stress hydrique. Parmi ces stratégies, le mécanisme d'ajustement osmotique, un comportement inné, peut aider les plantes à s'adapter aux situations stressantes en accumulant de grandes quantités d'osmolytes (Chen et Jiang, 2010). Ces osmolytes se répartissent en deux grandes catégories, soit les solutés organiques soit les ions inorganiques, et jouent un rôle crucial dans l'ajustement osmotique.

Les solutés organiques, généralement appelés des solutés compatibles, comprennent les acides aminés, le glycérol, les sucres et les autres métabolites de faibles poids moléculaires, équilibrant le potentiel hydrique dans la cellule sans perturber le métabolisme normal des plantes (Sharma *et al.*, 2019). De plus, ces molécules inertes détoxifient les ROS, protègent l'intégrité de la membrane et stabilisent les enzymes ou les protéines (Singh *et al.*, 2015). Les ions inorganiques, incluent principalement les ions de sodium ( $\text{Na}^+$ ), de calcium ( $\text{Ca}^{+2}$ ) et de potassium ( $\text{K}^+$ ), contribuant fortement à l'ajustement osmotique par le processus de transport ionique, en relation avec les canaux ioniques et les antitransporteurs (Chen et Jiang, 2010).

Sous stress hydrique, une multitude de molécules osmotiquement actives, telles que la proline, le saccharose, les polyols, le tréhalose, le glycine bêtaïne (GB) et l'alanine bêtaïne s'accumulent pour maintenir l'état hydrique des plantes (cellules). En effet, ils provoquent une endosmose de l'eau dans la cellule et maintient la turgescence de la cellule. La proline est l'osmolyte le plus important en cas de stress hydrique. De nombreux travaux sur différentes

espèces ont montré que l'accumulation de la proline améliore la tolérance au stress hydrique (Abid *et al.*, 2018 ; El Yamani *et al.*, 2019).

#### I.3.2.4. Antioxydants

Le stress hydrique et la salinité des plantes peuvent affecter négativement la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries et les chloroplastes en déséquilibrant ou en déformant complètement le processus de régulation (Gill and Tuteja, 2010 ; Numan *et al.*, 2018). L'excitation d'oxygène entraîne la formation de formes réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species), tels que l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), les radicaux libres superoxydes ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), les radicaux hydroxyles ( $\cdot\text{OH}$ ), les radicaux perhydroxyles ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) et les radicaux alkoxydes ( $\text{RO}^{\cdot}$ ) ainsi que des formes non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et l'ozone ( $\text{O}_3$ ) dans les cellules végétales (Parent *et al.*, 2008).

Les ROS sont de puissants composés oxydants et jouent un double rôle dans la réponse des plantes aux stress abiotiques. En effet, ce sont à la fois des molécules importantes dans la transduction des signaux, mais aussi des sous-produits toxiques du métabolisme du stress. Ce sont des initiateurs et intégrateurs des réseaux régulant un large éventail de processus tels que les réponses de croissance, de développement, de défense et d'acclimatation aux stress biotiques et abiotiques (Baxter *et al.*, 2014). Une accumulation de ROS, en trop grandes quantités, peut endommager la membrane plasmique et les systèmes endomembranaires (Ahanger et Agarwal, 2017 ; Foyer, 2018). Cependant, ils agissent également comme des signaux de stress, activant ainsi les enzymes antioxydantes SOD, GPX, APX, CAT et GR et des composés non enzymatiques (par exemple, l'ascorbate, les flavonoïdes, le glutathion, les tocophérols et les composés phénoliques) pour maintenir un niveau équilibré de ROS dans les cellules dans des conditions normales et de stress (Caverzan *et al.*, 2016 ; Ahanger *et al.*, 2018).

#### I.3.3. Réponses métaboliques

Les conditions stressantes affectent fortement le métabolisme des plantes, entraînant de modifications profondes de la biosynthèse, du transport et du stockage des métabolites (Fraire-Velázquez et Balderas-Hernández, 2013 ; Di Ferdinando *et al.*, 2014). Ces derniers sont considérés comme des indicateurs de l'adaptabilité des plantes aux stress abiotiques. Les métabolites primaires sont abondants et essentiels à la croissance et au développement des plantes, tandis que les métabolites secondaires jouent un rôle dans l'interaction des plantes avec leur environnement (Jorge et António, 2018).

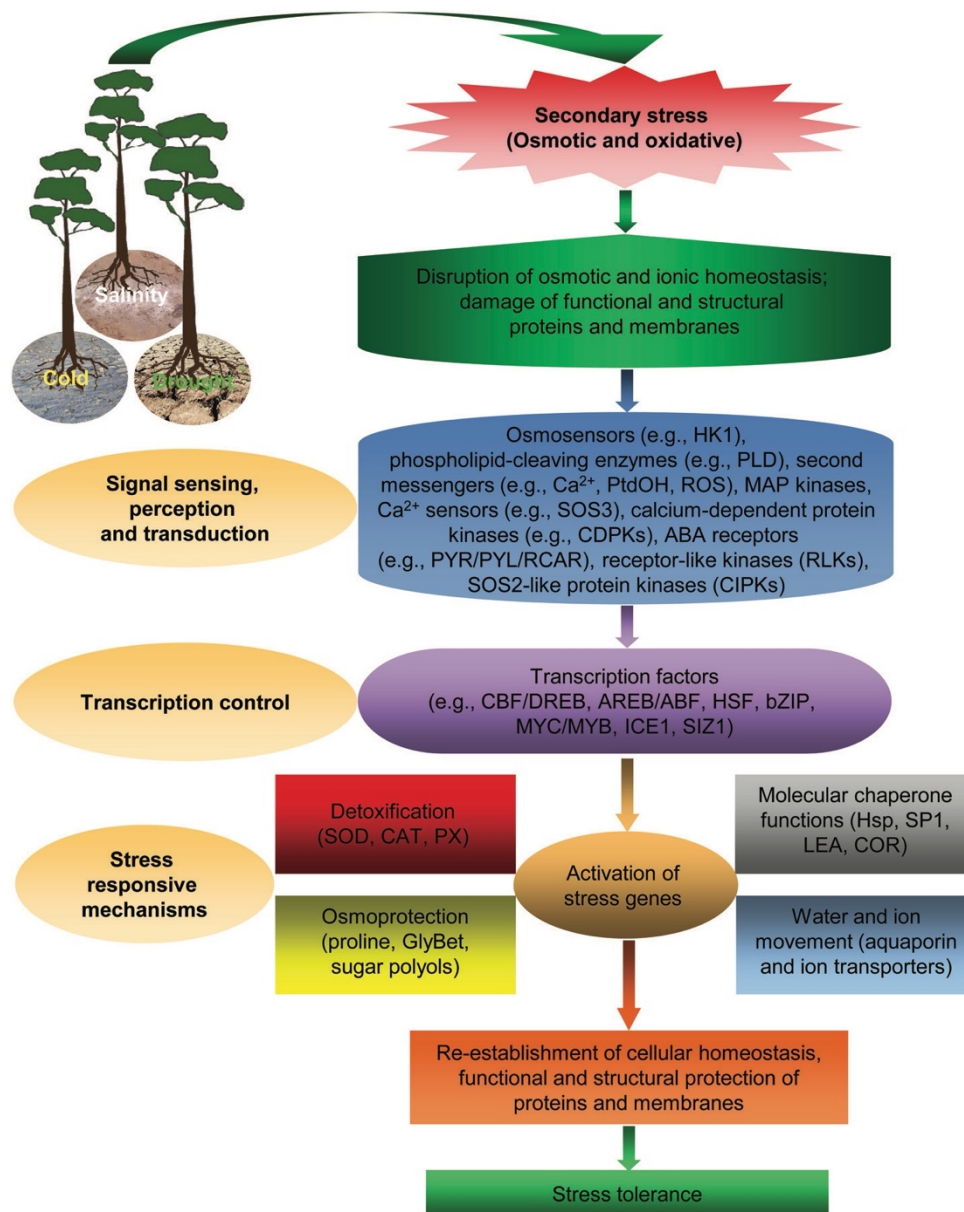
Les réponses métaboliques au stress hydrique sont semblables à celles du stress salin et mettent en évidence un chevauchement des voies biochimiques et des ajustements similaires des métabolites. L'accumulation des osmolytes identifiés via des études métabolomiques, tels que certains glucides, polyols, acides aminés et polyamines, est un mécanisme d'adaptation importante à la salinité et au stress hydrique, permettant la turgescence cellulaire et contribuant à la stabilisation de la membrane, des enzymes et des protéines (Kao, 2015 ; Jorge et António, 2018 ; Sharma *et al.*, 2019).

Comme des antioxydants puissants, les composés phénoliques jouent un rôle important dans l'élimination des ROS. Des études métabolomiques ont révélé que la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes est la voie la plus stimulée, entraînant une augmentation de la production de divers composés phénoliques (Sharma *et al.*, 2019). D'autres composés tels que les polyphénols ont la capacité de piéger des ROS (Di Ferdinando *et al.*, 2014 ; Sharma *et al.*, 2019). Par exemple, l'accumulation rapide d'anthocyanes et de flavones peut agir comme des piègeurs de ROS dans les vacuoles en réponse à la sécheresse (Fàbregas et Fernie, 2019). De plus, les flavonoïdes tels que le kaempférol et la quercétine participent efficacement à la détoxification des molécules H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sharma *et al.*, 2019).

Les composés lipophiles ont un pouvoir antioxydant important vis-à-vis de stress. En outre, l'accumulation du  $\alpha$ -tocophérol suite à des conditions de stress salin chez différentes espèces s'est avérée activer la tolérance à la salinité (Malik *et al.*, 2013). Mais, il a aussi été montré que d'autres composés tels que le phytol, l'acide octadécanoïque, le tétratétracontane et le tétracosane ont augmenté significativement en réponse au stress hydrique (Soliman *et al.*, 2019).

#### **I.4. Régulations moléculaires en réponse au stress**

La réponse des plantes aux stress environnementaux implique l'intégration de plusieurs mécanismes à différents niveaux d'organisation. Au niveau cellulaire, la membrane plasmique est une barrière physiologique permettant le passage de certaines molécules et constitue l'area de perception des différents stress environnementaux. En principe, la réponse cellulaire à un stress donné est initiée par la perception et la transduction d'un signal, suivi d'une activation de l'expression des gènes afin de contrer les effets négatifs de ce stress (Harfouche *et al.*, 2014) (Figure 2).



*Figure 2: Voie générale de la réponse des plantes aux stress abiotiques, à partir de la perception du signal et menant aux réponses au stress (Harfouche et al., 2014)*

#### I.4.1. Signalisation et perception du stress

Afin que la cellule puisse réagir à un signal extérieur (déficit hydrique, sel, froid...), elle doit convertir ces signaux physiques en signaux biochimiques, perçus alors au niveau moléculaire, entraînant une transduction de signal (Virilouvet, 2011). Cette dernière recrute une cascade réactionnelle spécifique. Des seconds messagers tels que Ca<sup>2+</sup>, les ROS et les inositol phosphates (IP), sont mis en jeu pour modifier le taux du Calcium intracellulaire. Cette altération est détectée par des senseurs. Ce sont des protéines changeant leur conformation de

façon  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante. Cela entraîne des cascades de phosphorylations activant des protéines impliquées dans la protection cellulaire ou leurs facteurs de transcription (Beck *et al.*, 2007). Les modifications liées à l'expression des gènes lors d'un stress peuvent influencer les taux de certaines phytohormones, notamment, l'acide abscissique (ABA). Selon l'implication de l'ABA ou non, deux types de voies de transduction du signal peuvent être empruntées : ABA dépendante et ABA indépendante (Shinozaki *et al.*, 2003). L'accumulation de l'ABA active plusieurs gènes associés aux stress, dont les produits peuvent être des protéines fonctionnelles ou des protéines de régulations.

#### **I.4.2. Gènes et leurs produits induits en cas de stress**

Lors d'un stress abiotique, la réponse moléculaire des plantes fait intervenir un assortiment de gènes, dont leurs produits peuvent être catégorisés classiquement en deux groupes (Macedo, 2012) :

- Le premier groupe comporte les gènes fonctionnels codent pour des protéines assurant une protection directe de la cellule végétale face au stress. Il regroupe ainsi les protéines chaperonnes, les protéines LEA (déhydrines), les enzymes clés de la biosynthèse des osmolytes, les canaux à eau (aquaporines), les transporteurs de sucre et de proline, les enzymes de détoxification et diverses protéases.
- Le deuxième groupe est impliqué dans la régulation de la transduction du signal et de l'expression des gènes de stress. Il inclut les facteurs de transcriptions, les protéines kinases, les protéines phosphatases, les enzymes impliquées dans le métabolisme des phospholipides, ainsi que d'autres molécules signales.

Plusieurs familles de gènes intervenant lors d'un stress hydrique, telles que les aquaporines (AQP), les déhydrines (DHN), les protéines DREB (DREB2)..., ont des caractéristiques structurales propres avec des domaines conservés tout en ayant le même rôle qui est la réponse et l'adaptation au stress. Concernant le stress salin, on parle de gènes SOS (Salt overly sensitive), HKT (High affinity potassium transporter) et NHX (Antiporteurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ).

#### **I.4.3. Régulation des flux d'eau par les aquaporines (AQPs)**

##### **I.4.3.1. Aperçu sur les AQPs**

Les aquaporines sont des canaux transmembranaires appartenant à la grande famille des protéines intrinsèques, les MIPs (*Majeur Intrinsec Proteins*). Ces canaux spécifiques sont

situés sur les membranes biologiques et permettant le mouvement passif de l'eau et/ou des petits solutés neutres (urée, acide borique..) ou de gaz (ammonium, dioxyde de carbone) (Maurel et Chrispeels 2001 ; Baiges *et al.*, 2002 ; Kruse *et al.*, 2006). Elles sont omniprésentes presque dans tous les organismes vivants et impliquées dans la régulation de différents phénomènes physiologiques (Singh *et al.*, 2020).

Un membre de la famille des aquaporines a été identifié et séquencé pour la première fois en 1984 par Gorin et son équipe (Gorin *et al.*, 1984) à partir des tissus des bovins, mais plus tard la fonction de l'activité du transport de l'eau n'a été mise en évidence qu'avec le groupe de Peter Ager à Baltimore (USA) en 1992. Cette protéine membranaire, CHIP-28 (*Chanel Integral Membrane Protein-28KDa*), appelée Aquaporine1 (AQP1) a été identifiée à partir des globules rouges des mammifères. L'année suivante, Maurel (1993) et ces collaborateurs ont découvert la première aquaporine végétale, une protéine homologue (TIP : *Tonoplast Intrinsic Protein*) d'*Arabidopsis thaliana* exprimé dans l'ovocyte des xenopus (Maurel *et al.*, 1993). Depuis lors, de nombreux travaux ont été menés et la découverte de cette aquaporine végétale a ouvert une perspective sur la relation entre l'eau et la plante (Maurel et Chrispeels, 2001).

Chez les végétaux, ces aquaporines présentent une diversité et une abondance très intéressante (Sutka *et al.*, 2017 ; Benga, 2009 ; Laloux *et al.*, 2018). Cela peut être expliqué par le phénomène de la duplication des gènes et la polyploïdie (Adam et Wendel, 2005 ; Gupta et Sankararamakrishnan, 2009 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Park et Campbell, 2015).

#### I.4.3.2. Classes des AQPs

Depuis leur découverte, les aquaporines ont été largement étudiées et sont réparties en diverses classes à la base de leur homologie de séquence et leur localisation au niveau de la membrane. Quatre classes d'aquaporines ont été initialement identifiées chez les végétaux : les PIP (*Plasma Intrinsic Protein*), les TIP (*Tonoplast Intrinsic Protein*), les NIP (*Nodulin Intrinsic Protein*), et les SIP (*Small Intrinsic Protein*) (Maurel *et al.*, 2008, Almeida-Rodriguez *et al.*, 2010). D'autres classes d'aquaporines ont été répertoriées lors des études d'annotation chez la bryophyte, *Physcomitrella patens* (mousse modèle), celles des GIPs (*GlpF-Like Intrinsic Proteins*), des HIPs (*Hybrid Intrinsic Proteins*) et des XIP (*Uncategorized x Intrinsic Proteins*) (Danielson et Johanson., 2008). Les deux dernières classes sont absentes chez les plantes supérieures et cela peut être expliqué par leur disparition au cours de l'évolution des plantes (Danielson et Johanson., 2008). Les GIPs et les HIP ne se trouvent que dans les algues

et les bryophytes (la mousse) tandis que les XIPs ont été trouvées chez la mousse et quelques plantes supérieures, Aoulouz compris le peuplier (*Populus trichocarpa*).

Les classes d'aquaporines les plus importantes et les plus répondues chez les plantes sont les PIPs et les TIPs. Les PIPs constituent la classe la plus grande d'aquaporines des plantes avec un poids moléculaire aux alentours de 30 kDa. La majorité des membres PIPs ont été identifiés dans les membranes plasmiques et ils sont situés généralement dans des organes caractérisés par de grands flux d'eau (Gupta et Sankararamakrishnan, 2009). Elles sont divisées en deux sous-groupes, les PIPs1 et PIPs2, sur la base de similitude de séquences. La différence entre ces deux sous-groupes réside dans la longueur d'extrémité C-terminal et N-terminal, et leur perméabilité à l'eau. Les PIPs1 renferment cinq membres (PIP1.1-PIP1.5), tandis que les PIPs2 contiennent huit membres (PIP2.1-PIP2.8) (Maurel, 2007). Les protéines PIP1 possèdent une extrémité N-terminal plus longue et une extrémité C-terminal plus courte par rapport aux protéines PIP2 (Wayne et Tazawa, 1990). Les PIP1 sont considérées comme ayant une faible perméabilité à l'eau (Chaumont *et al.*, 2000). De plus, certains membres des PIP1 peuvent participer dans le transport du glycérol et du CO<sub>2</sub> en plus de l'eau (Hanba *et al.*, 2004). Quant aux aquaporines du sous-groupe PIP2, elles sont les plus efficaces comme canaux d'eau que celles des membres de la PIP1 et elles sont considérées comme la principale voie du transport d'eau de cellule à cellule (Kaldenhof et Fisher, 2006a).

Les TIPs forment une classe d'aquaporines de cinq isoformes (TIP1-TIP5) et sont les plus abondants dans la membrane vacuolaire. Elles sont responsables, en plus de l'eau, du passage de petits solutés et de gaz (Maurel *et al.*, 2008 ; Nozaki *et al.*, 2008). Elles ont été les premières protéines identifiées parmi celles montrant une activité du transport de l'eau dans les membranes vacuolaires chez *Arabidopsis thaliana* (Johnson *et al.*, 1990). Ces protéines sont caractérisées par une perméabilité à l'eau plus élevée en raison de l'abondance des aquaporines dans le tonoplaste que celle de la membrane plasmique (Fleurat-Lessard *et al.*, 2005), ce qui conduit à un ajustement osmotique rapide et, par conséquent au maintien de la turgescence cellulaire.

Les NIPs, protéines associées aux nodules, sont différentes des autres MIPs des plantes et sont situées à la fois dans les membranes plasmique et intracellulaire des plantes légumineuses et non légumineuses (Maurel, 2007). Elles sont classifiées en sept groupes (NIP-NIP7) et permettent le transport de l'eau et des petites molécules avec une très faible perméabilité en eau par rapport aux autres aquaporines. Elles jouent également un rôle important dans les

réponses au contrainte hydrique et salin, et dans le maintien de l'équilibre hydrique des plantes (Weig *et al.*, 1997).

En plus de ces trois classes, un autre groupe d'aquaporine -les SIPs- forme une petite classe de deux à trois homologues divergents des aquaporines et sont principalement localisés dans le réticulum endoplasmique (Ishikawa *et al.*, 2005). Chez *Arabidopsis*, trois homologues de SIP ont été identifiés et se sont avérés résider principalement dans le réticulum endoplasmique (Maurel *et al.*, 2008).

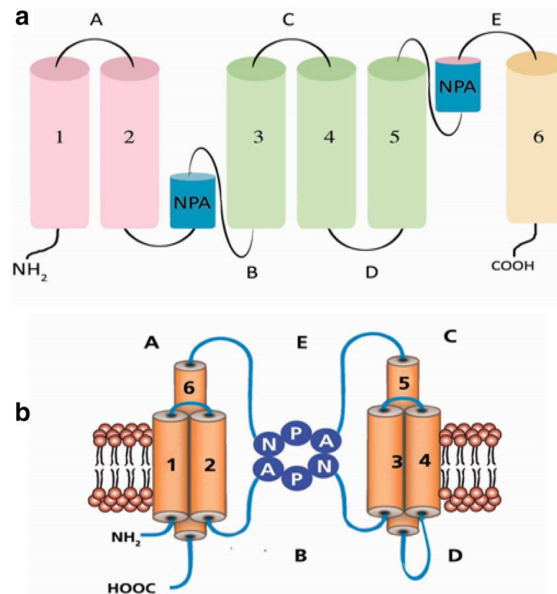
Une nouvelle catégorie de MIP, qui partagent de faibles similitudes avec les autres classes d'aquaporines, a été identifiée chez les plantes terrestres et nommée protéines intrinsèques X (XIP) (Danielson et Johanson, 2008). Les XIP apparaissent comme des canaux multifonctionnels perméables à l'eau, aux métalloïdes et aux ROS (Lopez *et al.*, 2012). Ils sont généralement divisés en quatre sous-groupe (XIP1, XIP2, XIP3 et XIP4) (Gupta et Sankararamakrishnan, 2009 ; Venkatesh *et al.*, 2013). Chez certaines espèces végétales supérieures comme les monocotylédones, les membres de XIPs semblent être absentes.

#### I.4.3.3. Structure et fonctions des AQP

Les aquaporines sont des protéines membranaires de poids moléculaire variant de 23 à 31 kDa, formant un canal dans les membranes plasmiques ou les membranes intracellulaires pour faciliter le mouvement rapide et bidirectionnel de l'eau.

Toutes les protéines majeures intrinsèques (MIPs), Aoulouz compris les aquaporines possèdent souvent six hélices transmembranaires (notés de 1 à 6), avec des extrémités N et C-terminales cytoplasmiques. Ces domaines sont reliés par cinq boucles (notées de A à E), dont trois sont extra-cytoplasmiques (A-C-E) (Murata *et al.*, 2000 ; Chaumont *et al.*, 2005) (Figure 3.a). Les deux boucles conservés B et E sont extrêmement hydrophobes, contenant chacun un motif NPA (Asparagine-Proline-Alanine) très conservé et sont enchâssés dans la membrane par le repliement des boucles (Kruse *et al.*, 2006, Maurel, 2007). Cette organisation génère la formation d'un canal central et sélectif en forme de sablier (Figure 3.b) qui est responsable du passage des molécules à travers la membrane (Kapilan *et al.*, 2018).

Les protéines d'aquaporines, en général, s'assemblent par quatre au sein de la membrane formant des tétramères et chaque monomère fonctionne comme un pore indépendant (Chaumont *et al.*, 2005, Maurel *et al.*, 2008, Hachez et chaumont, 2010). Cette formation quaternaire, résultat de l'interaction hydrophobe entre monomères, est importante non seulement pour le repliement et la stabilité des aquaporines, mais aussi pour leur fonctionnalité (Ali et Imperial, 2005).



**Figure 3: Topologie d'une aquaporine (Kapilan et al., 2018). A) 6 hélices transmembranaires (1-6) sont reliés par 5 boucles (A-E), les boucles B et E contiennent des motifs conservés NPA. B) Arrangement d'aquaporine fonctionnelle formée par l'interaction des deux héli-pores**

Bien que de nombreuses aquaporines soient hautement sélectives pour l'eau, les filtres sélectifs des aquaporines montrent une forte divergence (Sui *et al.*, 2001), suggérant une grande diversité fonctionnelle pour ces protéines (Bansal et Sankararamakrishn, 2007). Ainsi, certaines isoformes d'aquaporines ne présentent pas une spécificité stricte pour l'eau et peuvent tout aussi bien transporter d'autres solutés d'une grande importance physiologique (Kaldenhoff et Fischer, 2006b ; Mudumbi *et al.*, 2017). A titre d'exemple, l'eau et le dioxyde de carbone transportés dans le chloroplaste sont indispensables pour le bon fonctionnement de la photosynthèse (Maurel *et al.*, 2008 ; Heckwolf *et al.*, 2011 ; Gao *et al.*, 2018).

De plus, étant localisées dans la majorité des organes de la plante, les aquaporines sont cruciales dans des multiples mécanismes physiologiques, Aoulouz compris la germination des graines, la croissance et le développement (Li *et al.*, 2014). Plus intéressant encore, les aquaporines sont impliquées dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Maurel et Chrispeels 2001).

#### I.4.3.4. Réponses des AQP aux stress abiotiques

De nombreux travaux ont confirmé que l'abondance des aquaporines est régulée par divers facteurs environnementaux, notamment les stress biotiques et abiotiques. La régulation des gènes d'aquaporines en réponses aux stress biotiques et abiotiques a été rapportée dans plusieurs plantes cultivées. Les aquaporines servent également comme des régulateurs clés en modulant la croissance et le développement des plantes pendant diverses conditions physiologiques et environnementales (Alexandersson *et al.*, 2005 ; Zhou *et al.*, 2012).

Les stress environnementaux tels que la salinité et la sécheresse peuvent réduire le débit du transport d'eau (Siemens et Zwiazek, 2003 ; Boursiac *et al.*, 2005 ; Ranganathan *et al.*, 2016). Cependant, la préservation du statut hydrique dans des conditions stressantes est un défi majeur et essentiel pour les plantes. Par conséquent les plantes doivent avoir un arsenal adaptatif pour gérer les aléas environnementaux et leurs effets sur l'équilibre hydrique. En effet, les gènes codant des aquaporines jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie et de l'équilibre de l'eau dans ces conditions stressantes (Siemens et Zwiazek, 2003; Ranganathan *et al.*, 2017).

Mais, la réponse des aquaporines au stress hydrique est très variable en fonction de niveau de stress, du stade de développement, du type de tissus, de l'isoforme d'aquaporine et de l'espèce (Galmes *et al.*, 2007 ; Siemens et Zwiazek, 2003). D'un point de vue transcriptomique, diverses études comparatives ont révélées des profils d'expression différentielle de plusieurs homologues d'aquaporines. Ainsi, leur expression peut augmenter, diminuer ou demeurer invariable en condition de stress hydrique (Alexandersson *et al.*, 2005).

A titre d'exemple, en réponse uniquement au stress hydrique chez *Arabidopsis thaliana*, des analyses d'expressions de 35 gènes homologues d'aquaporines, indiquent que la plupart des PIPs et certains isoformes des TIPs ont des niveaux d'expressions plus élevés, tandis que les NIP montrent une expression très faible (Alexandersson *et al.*, 2005). Dans le même travail, les auteurs ont également observé une régulation négative de la plupart des gènes PIPs au niveau des feuilles, à l'exception de PIP1,4 et PIP2.5, dont l'expression augmente (Alexandersson *et al.*, 2005). Conformément à cette étude antécédente, de nombreux travaux chez *Arabidopsis* ont montré que parmi toutes les sous-familles d'aquaporines, les PIP sont les plus sensibles au stress hydrique et la plupart d'entre eux subissent une régulation négative. Seuls quelques gènes révèlent une régulation positive (Jang *et al.*, 2004, Alexandersson *et al.*, 2010).

À l'heure actuelle, les membres de la famille AQP ont été identifiés ou étudiés dans plus de 100 espèces végétales (Hoai *et al.*, 2020). Comparées aux autres organismes, les plantes contiennent le plus grand nombre d'homologues AQP. Un nombre important de gènes AQP a été identifié et caractérisé chez différentes plantes ligneuses dont *Acacia auriculiformis* (Zhang *et al.*, 2021), *Coffea canephora* (Yaguinuma *et al.*, 2021), *Citrus sinensis* (Wei *et al.*, 2019), *Olea europea* (Faize *et al.*, 2020), *Populus trichocarpa* (Gupta and Sankaramakrishnan 2009) et *Hevea brasiliensis* (Zou *et al.*, 2015a).

## I.5. Régulation de compartimentation vacuolaire du sodium par les antiporteurs NHX

### I.5.1. Généralité sur les NHXs

Les antiporteurs Cation/Protons (CPA) qui assurent l'échange de cations monovalents, principalement  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , avec un ou deux protons à travers la membrane sont l'un des principaux canaux et transporteurs ioniques. Ces antiporteurs appartiennent à deux grandes familles, CPA1 et CPA2 (Brett *et al.*, 2005). La famille CPA1 est constituée de deux clades, les transporteurs NHX et NHE (échangeur sodium-proton) tandis que CPA2 comprend les familles  $\text{K}^+$  efflux antiporter (KEA) et Cation/ $\text{H}^+$  (CHX) (Chanroj *et al.*, 2012 ;Ye *et al.*, 2013).

Les antiporteurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  sont un groupe des protéines membranaires intégrales qui catalysent l'échange de cations à travers les membranes (tonoplaste) sous le gradient électrochimique de protons vacuolaire  $\text{H}^+$ -ATPase et  $\text{H}^+$ -PPase (Wang et Wu, 2013). Ils ont été identifiés chez plusieurs mammifères, des bactéries et des plantes (Wiebe *et al.*, 2001).

Chez les plantes, ces antiporteurs comportent généralement plusieurs isoformes au sein d'une même espèce, avec huit éléments (NHX1-8), dont NHX7/SOS1 situé dans la membrane plasmique et les sept autres dans les membranes intracellulaires (An *et al.*, 2007). En fonction de leurs emplacements, les transporteurs localisés dans la membrane intracellulaire sont classés comme étant des protéines de classe 1 et 2, situés dans la membrane vacuolaire (NHX1 -4) et dans l'endosome (NHX5 , 6 et 8 ), respectivement (Figure 4) (Isayenkov *et al.*, 2020).

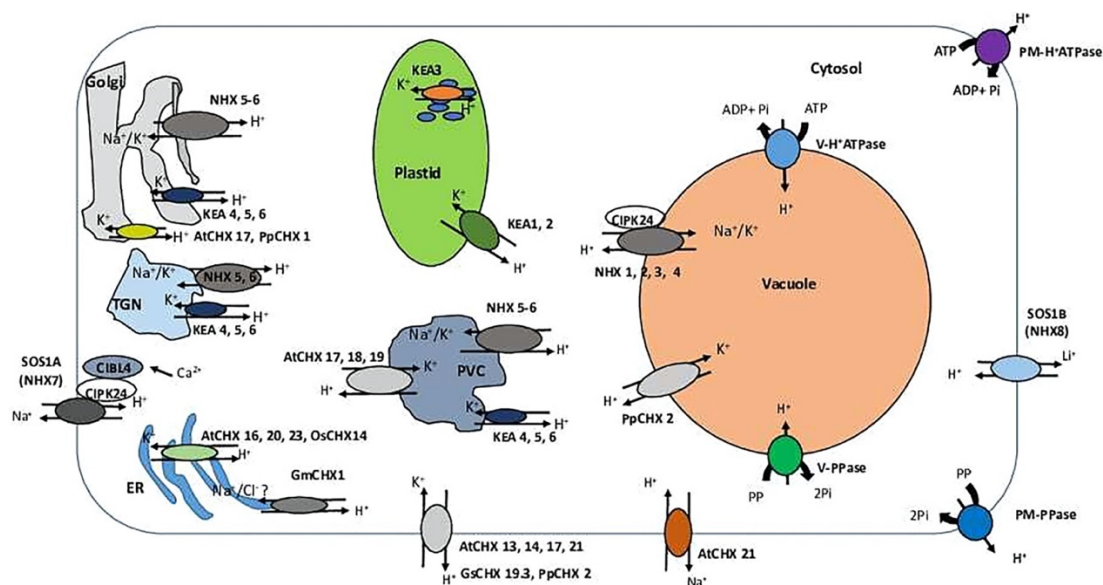


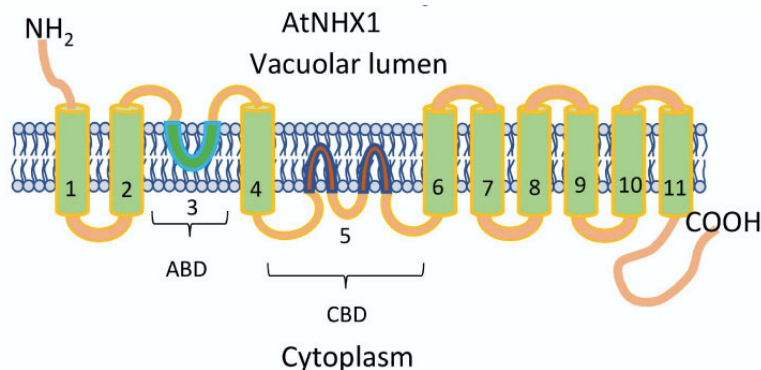
Figure 4: Localisation subcellulaire de la famille des protéines NHX (Isayenkov *et al.*, 2020).

Des études ultérieures ont montré que les protéines de type NHX sont également importantes et jouent un rôle essentiel dans divers processus cellulaires à savoir la compartimentation de  $K^+$  dans les vacuoles, la croissance et le développement de la plante et sa tolérance au sel en intervenant dans l'homéostasie cellulaire des ions  $Na^+$ ,  $K^+/H^+$  et la régulation du pH (Reguera *et al.*, 2014).

### I.5.2. Structure des NHXs

La topologie de la protéine NHX chez les plantes, n'est toujours pas clairement élucidée. Toutefois, l'analyse hydrophatique de NHX végétaux indique une organisation de domaine similaire aux isoformes de NHE humain, suggérant une conservation des caractéristiques structurelles dans toutes les familles. Typiquement, les NHX présentent 10 à 12 régions hydrophobes qui constituent potentiellement des hélices transmembranaires. La séquence du domaine N-terminal hydrophobe, impliqué dans l'activité du transport, est la plus conservée, tandis que la partie C-terminal hydrophile responsable des interactions régulatrices, semble plus spécifique (Rodriguez-Rosales *et al.*, 2009). L'analyse topologique n'a jusqu'à présent été réalisée qu'avec la protéine NHX1 de l'Arabidopsis.

Deux modèles topologiques différents sont proposés. Le premier modèle suggère que la topologie d'AtNHX1 ressemble étroitement à celle de la protéine NHE humaine, avec 11 hélices transmembranaires et une boucle intra-membranaire correspondant à la région hydrophobe 9 (Sato et Sakaguchi, 2005). La première hélice transmembranaire de AtNHX1, correspondant à la deuxième hélice transmembranaire du NHE1, est insérée dans la même orientation dans la membrane, tandis que l'extrémité C-terminale est exposée au cytoplasme impliqué dans les interactions régulatrices (Sato et Sakaguchi, 2005).



**Figure 5: Modèle topologique de la structure de l'antiporteur vacuaire AtNHX1 du Arabidopsis thaliana (Yamaguchi *et al.*, 2003)**

À la différence du premier, le deuxième modèle a proposé que le domaine C-terminal serait exposé à la lumière vacuolaire, tandis que le N-terminal serait cytoplasmique (Figure 5)

(Yamaguchi *et al.*, 2003). Ce modèle prédit une structure avec 9 hélices transmembranaires, dont les deux domaines hydrophobes (5 et 6) qui, ne traverseraient pas la membrane, contenant des résidus impliqués probablement dans la liaison et le transport de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{H}^+$ . Le troisième domaine hydrophobe contient un domaine de fixation du composé diuétique amiloride (FFIYLLPPI). Ce dernier, ayant la faculté d'inhiber les échanges cations/ $\text{H}^+$  (Bassil *et al.*, 2012), est hautement conservé chez la plupart des protéines NHX.

### I.5.3. Fonction des NHXs

Les gènes NHX des plantes codant des antiporteurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , semblent être particulièrement importants pour l'homéostasie des ions et la régulation d'une grande variété de processus physiologiques y compris, le développement des plantes, la régulation du pH cellulaire, le transport des protéines, le trafic vésiculaire et la tolérance à la salinité (Pehlivan *et al.*, 2016).

En condition normale de la croissance, il s'est avéré que les NHXs participent à la régulation du pH par un échange de  $\text{K}^+$  plutôt que de  $\text{Na}^+$  contre un proton (Adem *et al.*, 2014). En plus d'être un nutriment essentiel, le  $\text{K}^+$  agit pour équilibrer la charge intracellulaire et représente également un cofacteur pour certaines enzymes cytosoliques. La majorité du  $\text{K}^+$  cellulaire est séquestré au sein de la vacuole, contribuant ainsi à la régulation osmotique et au contrôle de la turgescence nécessaire à l'expansion et au grandissement cellulaire (Bassil *et al.*, 2012). Une acidification du cytoplasme dans ces conditions peut servir de signal pour induire soit une absorption de  $\text{K}^+$  de haute affinité du sol, soit un efflux de  $\text{K}^+$  de la vacuole (Walker *et al.*, 1996). Une réduction du gradient de pH à travers la membrane tonoplaste peut atténuer l'accumulation de  $\text{K}^+$  vacuolaire entraînée par le mécanisme antiporteur  $\text{K}^+/\text{H}^+$ .

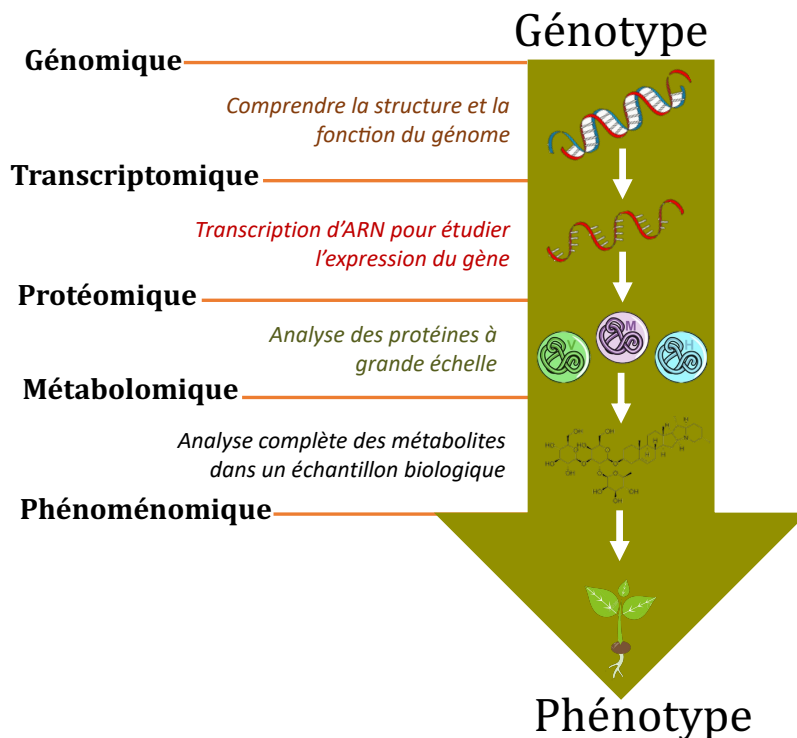
En condition de stress salin, l'accumulation de  $\text{Na}^+$  à l'intérieur des vacuoles est l'une des stratégies importantes chez les plantes pour atténuer la toxicité du  $\text{Na}^+$  dans le cytoplasme (Wu, 2018). Les antiporteurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  jouent un rôle crucial dans la séquestration du  $\text{Na}^+$  dans les vacuoles pour maintenir l'homéostasie du  $\text{Na}^+$  et, ainsi conférer aux plantes un système de tolérance à la salinité (Li *et al.*, 2017b). De ce fait, l'expression de ces gènes NHX est fortement induite par les stress salin et osmotique. En plus de  $\text{Na}^+$ , les NHX sont capables de transporter d'autres cations monovalents tels que  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ , et leur affinité pour ces cations est variable selon, les espèces et les conditions d'analyses (Venema *et al.*, 2003 ; Xia *et al.*, 2002 ; Yokoi *et al.*, 2002). Ainsi, ils apparaissent comme étant les régulateurs critiques de processus cellulaires de base tels que la régulation du trafic vésiculaire et le contrôle de l'adressage des protéines (Sottosanto *et al.*, 2007).

Les antiports NHX sont connus pour leur rôle primordial dans le contrôle de l'homéostasie ionique. Cependant, cette osmorégulation est capitale pour la croissance et le développement de toutes les espèces végétales, qu'elles soient tolérantes ou sensibles à la salinité.

## I.6. Approches -Omiques et stress abiotiques des plantes

### I.6.1. Aperçu général sur les -omiques

Au cours des dernières décennies, les progrès en spectroscopies et en chromatographies ont conduit l'amélioration de l'identification et la quantification de molécules à différentes échelles (du gène au phénotype), permettant ainsi l'analyse d'échantillons de plus en plus complexes tout en diminuant le temps d'analyse. Le domaine de la biologie des systèmes dédié à la compréhension des organismes au niveau moléculaire a ainsi connu un développement exponentiel et les « cascades -omiques » ont participé de manière évidente à l'avancement de cette compréhension (Chawla *et al.*, 2011).



*Figure 6: Approche de la biologie des systèmes des plantes pour comprendre le concept du génotype au phénotype (adaptée et modifiée (Choudhury et al., 2021))*

Les technologies de séquençage produisent un nombre très élevé de génomes contribuant à la prédiction des gènes, des ARNs et des protéines et permettant également le développement des technologies d'analyse à haut débit, dites approches -omiques. Parmi elles se trouvent la

génomique impliquée dans l'analyse de l'ensemble des gènes ; la transcriptomique, qui explique l'organisation et les fonctions des transcrits ; la protéomique, qui concerne l'analyse structurale et fonctionnelle des protéines et élucide la voie régulatrice impliquée dans la modification post-traductionnels des protéines ; la métabolomique, utilisée comme moyen puissant pour l'analyse de l'ensemble des métabolites (Bagati *et al.*, 2018). Par la suite, cette terminologie a été élargie pour couvrir d'autres types de données comme par exemple les données phénomiques qui étudient l'ensemble des phénotypes (Figure 6).

Ces approches -omiques ont apporté un changement de paradigme dans la recherche liée au comportement des plantes vis-à-vis de diverses contraintes environnementales et ont ouvert la voie à une meilleure compréhension des différents aspects liés à la tolérance aux stress abiotiques. Étant donné que les plantes modifient leurs profils -omiques pour lutter contre un stress donné, l'intégration d'approches phénotypiques, génétiques, transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques qui se complètent, aidera à identifier les gènes de tolérance au stress et leurs mécanismes afin de développer des plantes tolérantes aux stress abiotiques (Takeda et Matsuoka 2008).

### **I.6.2. Approches génomiques**

La génomique est un support moléculaire des êtres vivants qui porte sur l'étude exhaustive des gènes d'un génome donné, y compris l'identification des séquences de gènes, des séquences intra-géniques ainsi que la structure et l'annotation des gènes (Duque *et al.*, 2013). Si l'ambition de la génomique structurale est de décrire l'organisation physique du génome et dresser l'inventaire de gènes qu'il contient, celle de la génomique fonctionnelle est de caractériser l'expression du génome et son intégration dans l'élaboration de grandes fonctions métaboliques. Des progrès récents combinant la génomique et la bio-informatique ont conduit au développement de méthodes efficaces à haut débit ainsi que de ressources de bases de données génétiques pour identifier des familles de gènes impliquées dans la tolérance au stress abiotique (Gambino et Gribaudo, 2012).

De nombreuses études ont été focalisées sur la génomique des plantes pour identifier divers gènes impliqués dans les réponses au stress abiotique (Govind *et al.*, 2009 ; Ramegowda *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2018). Beaucoup de ces gènes ont également été utilisés avec succès dans le développement de plantes cultivées tolérantes aux stress abiotiques (Chen *et al.*, 2012 ; Thiry *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2016). En outre, un éventail de données génomiques générées à l'ère de la génomique servent de base aux études de

transcriptomique et de protéomique (Alter *et al.*, 2015 ; Mousavi *et al.*, 2016 ; Shen *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2018).

### **I.6.3. Approches transcriptomiques**

L'étude du transcriptome (la transcriptomique) est une partie fondamentale de l'ère « post-génomique » qui consiste à étudier l'ensemble des ARN transcrits, souvent plus particulièrement les ARN messagers (ARNm), au sein d'une cellule ou d'un tissu donné à un stade de développement donné pour un instant donné (Wang *et al.*, 2009 ; McGettigan 2012). Contrairement au génome, le transcriptome est unique, très dynamique et change avec l'âge, le stade de développement, la disponibilité des nutriments ou l'environnement (El-Metwally *et al.*, 2014a). Différentes technologies permettent l'étude à large échelle des transcriptomes, notamment les puces à ADN, les ESTs (Expression Sequence Tags), les SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), les RNA-seq. Le RNA-seq est une approche relativement récente utilisant le séquençage de deuxième génération (NGS). Elle est en effet la technologie la plus employée pour identifier et quantifier, à grande échelle, les gènes exprimés dans un ou plusieurs individus, tissus ou types cellulaires, dans des conditions physiologiques données (Li *et al.*, 2017a ; Leisner *et al.*, 2017). La recherche et l'identification des gènes candidats à l'aide de la transcriptomique comparative semble une voie prometteuse pour améliorer la tolérance au stress abiotique chez les plantes. Plusieurs travaux ont été réalisés pour étudier l'impact du stress abiotique sur l'expression des gènes via des approches transcriptomiques dans diverses plantes telles que *Populus euphratica* L. (Tang *et al.*, 2013), *Zea mays* L. (Liu *et al.*, 2020) *Glycine max* L. (Leisner *et al.*, 2017) et *Panicum miliaceum* L. (Yuan *et al.*, 2022).

### **I.6.4. Approches protéomiques**

Le protéome définit l'ensemble des protéines produites à partir du génome d'un organisme à un moment donné. Comme le transcriptome, le protéome est également très dynamique et change avec l'âge, l'organe, le stade de développement, la disponibilité des nutriments ou les conditions environnementales (Tyers et Mann 2003).

La protéomique permet d'étudier le protéome. C'est l'étude quantitative et/ou qualitative de l'ensemble des protéines dans une cellule, un tissu, un organe ou un organisme donné dans un contexte spécifique (Tyers et Mann 2003 ; Luan *et al.*, 2018 ). Généralement, elle est focalisée sur trois principaux points: déterminer les protéines exprimées dans un protéome, chercher modifications post-traductionnelles portées par les protéines et définir les interactions

physiques et fonctionnelles survenant entre ces protéines. La spectrométrie de masse (MS) est l'une des technologies innovantes développées pendant les dernières années et certainement le choix le plus frappant pour la protéomique. Elle comprend plusieurs approches telles que la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (en anglais Liquid Chromatography-Mass Spectrometry ou LC-MS), la spectrométrie de masse à piège ionique (en anglais Ion Trap–Mass Spectrometry ou IT-MS) et la désorption/ionisation-masse assistée par laser avec un spectrométrie de masse ( en anglais Matrix-assisted Laser Desorption/ Ionization–Mass Spectrometry ou MLDI-MS) (Helmy *et al.*, 2012 ; Komatsu *et al.*, 2014 ; Shao *et al.*, 2015).

L'accès facile à diverses bases de données protéiques et les progrès des techniques de la spectrométrie de masse ont facilité la reconnaissance des protéines qui sont exprimées dans les plantes au cours de divers stades de développement ainsi que lors des stress abiotiques (Subudhi 2011). Les études protéomiques ont contribué donc à la recherche des protéines répondants aux stress abiotiques en fournissant des connaissances étendues sur l'abondance des protéines dans des conditions contrastées (Hakeem *et al.*, 2012). Des études protéomiques ultérieures ont analysé la réponse des plantes à divers stress abiotiques chez différentes espèces ligneuses telles que *Populus* (*Populus euphratica* L.), *Quercus* (*Quercus ilex* L.), et le Caféier (*Coffea arabica* et *Coffea canephora*) (Bogeat-Triboulot *et al.*, 2007 ; Guerrero-Sánchez *et al.*, 2021 ; Marques *et al.*, 2022).

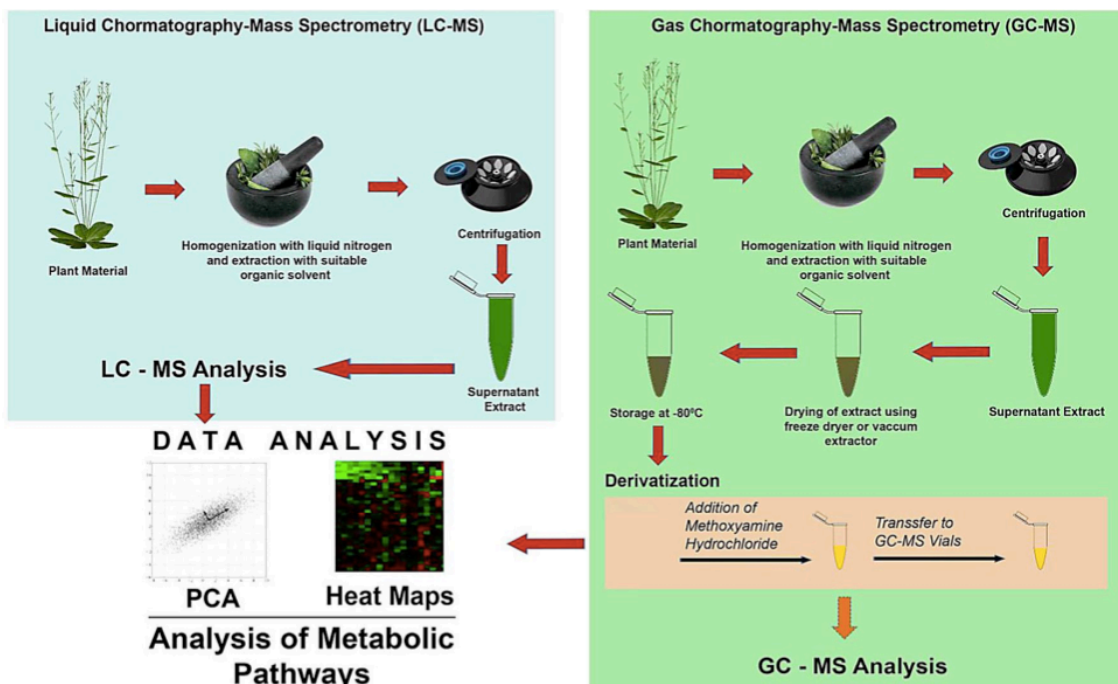
#### **I.6.5. Approches métabolomiques**

La connaissance des gènes, des transcrits et des protéines n'est pas suffisante pour identifier complètement une cellule. Il est nécessaire d'étudier le large éventail de métabolites primaires et secondaires présentes dans une cellule (Deshmukh *et al.*, 2014). L'identification de ces métabolites en condition défavorable permet de mieux comprendre les processus de régulation ainsi que de relier le génotype au phénotype et d'étudier les changements de phénotype qui ont lieu dans des conditions de stress (Badjakov *et al.*, 2012).

La métabolomique représente une nouvelle discipline émergente au sein de la grande famille - omiques. Elle consiste à identifier et quantifier les métabolites (métabolome) et les composantes chimiques chez différentes espèces biologiques. Le métabolome est le pool total de métabolites dans un organisme, qui peut être mesuré pour caractériser les variations génétiques ou environnementales (Razzaq *et al.*, 2019). La métabolomique joue un rôle important dans l'exploration des interactions environnement-gène, la caractérisation des

mutants, le phénotypage, l'identification des biomarqueurs et la découverte de médicaments (Razzaq *et al.*, 2019). Elle est apparue comme une approche prometteuse pour décrypter divers réseaux métaboliques liés à la tolérance aux stress biotiques et abiotiques chez les plantes (Shulaev *et al.*, 2008).

Pour comprendre les réponses des plantes aux stress abiotiques, la métabolomique s'est imposée comme l'un des moyens les plus efficaces. Les principales recherches sur les réponses des plantes aux stress abiotiques sont largement associées à l'identification des gènes impliqués à l'adaptabilité et à la tolérance au stress sur la base de profils d'expression génique contrastés de différentes espèces de plantes. Étant donné que les métabolites sont des produits finaux de différents processus de régulation, l'ensemble de données métabolomiques reste extrêmement décisif pour comprendre les réponses des plantes aux stress. Les modifications du métabolome des plantes ont été intensément étudiées chez plusieurs espèces végétales, y compris celles soumises à différents stress environnementaux (Shulaev *et al.*, 2008 ; Urano *et al.*, 2010). En effet, plusieurs travaux du métabolome ont montré que sous un stress abiotique (hydrique, salin...) diverses espèces végétales comme *Populus deltoides* L. (Tschaplinski *et al.*, 2019), *Arachis hypogaea* L. (Gundaraniya *et al.*, 2020), *Triticum aestivum* L. (Guo *et al.*, 2020) et *Triticum turgidum* ssp. durum (Borrelli *et al.*, 2018) présentent des changements métabolomiques.



**Figure 7: Approche métabolomique présentant les techniques de la spectrométrie de masse (MS) combinée à (GC) ou (LC) (Choudhury *et al.*, 2021)**

Pour obtenir un profil métabolique d'une plante ou d'un échantillon donné, il est nécessaire de combiner plusieurs techniques d'analyses et de séparation, en raison des différences dans les propriétés chimiques et physiques des métabolites (Jogaiah *et al.*, 2013). Les techniques de la spectrométrie de masse (MS) combinée à la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou la chromatographie liquide (LC) (Figure 7) et RNM sont les plus utilisées pour l'étude de la métabolomique des plantes (Parida *et al.*, 2018). La spectrométrie de masse est plus avantageuse que la RNM en raison de sa sensibilité et sa résolution élevée.

#### **I.6.6. Approches lipidomiques**

Les plantes synthétisent un large éventail de composés hydrophobes, généralement appelées lipides qui assurent non seulement la stabilité membranaire, mais servent également de molécules de signalisation et de stockage d'énergie. Ces composés hydrophobes sont présents en abondance, de dizaines à centaines de milliers, ce qui rend leur étude très complexe (Yang *et al.*, 2009). Considérant que les lipides membranaires sont très dynamiques et hautement sensibles en réponse aux changements environnementaux, la lipidomique peut fournir des informations sur la façon dont les plantes réagissent au stress environnemental (Callahan *et al.*, 2022).

La lipidomique, en tant que branche relativement jeune dans le domaine de la métabolomique, est devenue une discipline en plein essor au cours des dernières années (Harkewicz et Dennis, 2011). Elle vise l'étude des voies et des réseaux lipidiques en caractérisant et quantifiant le lipidome d'un organisme donné par des méthodes de chimie analytique (Yang et Han, 2016). La GC/MS s'est avérée être une technique très efficace pour la séparation, l'identification et la quantification des lipides et a aidé à comprendre le métabolisme des lipides (Yang et Han, 2016). Le changement des profils lipidiques a été analysé chez différentes espèces dans les conditions de stress. En condition de salinité, Natéra *et al.* (2016) ont observé chez deux cultivars de blé (*Hordeum vulgare* L.) une modification de la composition des acides gras et des profils lipidiques comparativement aux plantes non stressées. Sous stress hydrique, des différences au niveau du profil lipidique chez deux espèces de thym sensibles et tolérantes ont été évaluées par Moradi *et al.* (2017). De même, Zhang *et al.* (2019) ont rapporté un changement du profil lipidomique chez *Festuca arundinacea* suite à un stress hydrique ou thermique. Spicher *et al.* (2016) ont évalué l'effet de la température plus élevée sur le lipidome de *Solanum lycopersicum*. Ils ont identifié environ 791 molécules lipidiques, dont des lipides membranaires.

### **I.6.7. Bio-informatique**

Avec les avancées technologiques sur le séquençage à haut débit, des quantités énormes des données biologiques -omiques sont générées, suscitant des défis considérables pour leur analyse, leur visualisation et leur stockage (El-Metwally *et al.*, 2014b). Des outils bio-informatiques sont développés pour une meilleure gestion de ces données.

La bioinformatique représente un nouveau champ à l'interface des révolutions du 20<sup>ème</sup> siècle dans les domaines de la biologie moléculaire et de l'informatique. Il s'agit de l'ensemble de technologies mettant en œuvre des méthodes mathématiques et des algorithmes informatiques pour développer des outils de l'analyse des données biologique. Autrement dit, c'est le traitement automatique des données biologiques (Mougenot, 2012). Ainsi, elle propose une gamme de possibilités de gestion et d'analyse telles que le stockage de masse des grandes quantités d'informations, la comparaison et l'annotation des séquences, la construction d'arbre phylogénétiques et l'étude l'évolution moléculaire des êtres vivants, l'identification des gènes et leurs produits d'expression et la prédiction de leurs fonctions, le développement des marqueurs à partir des gènes d'intérêts, l'étude des réseaux d'interactions moléculaires et la visualisation simplifiée des résultats et des structures 2D et 3D des molécules (Yadav, 2015).

*Partie II:*  
*Matériels et méthodes*

## Partie II : Matériel et méthodes

Le schéma ci-dessous (Figure 8) résume les différentes approches méthodologiques suivies au cours de cette thèse. La première partie (en bleu) illustre l'approche gène candidat qui a pour but d'identifier *In silico* les gènes (AQP et NHX) de tolérance aux stress abiotiques chez l'arganier. La deuxième partie (en gris) montre la préparation du matériel végétal et le stress appliqué. La dernière partie (en vert) porte sur les caractérisations biochimique, physiologique, moléculaire et métabolomique en condition de stress.

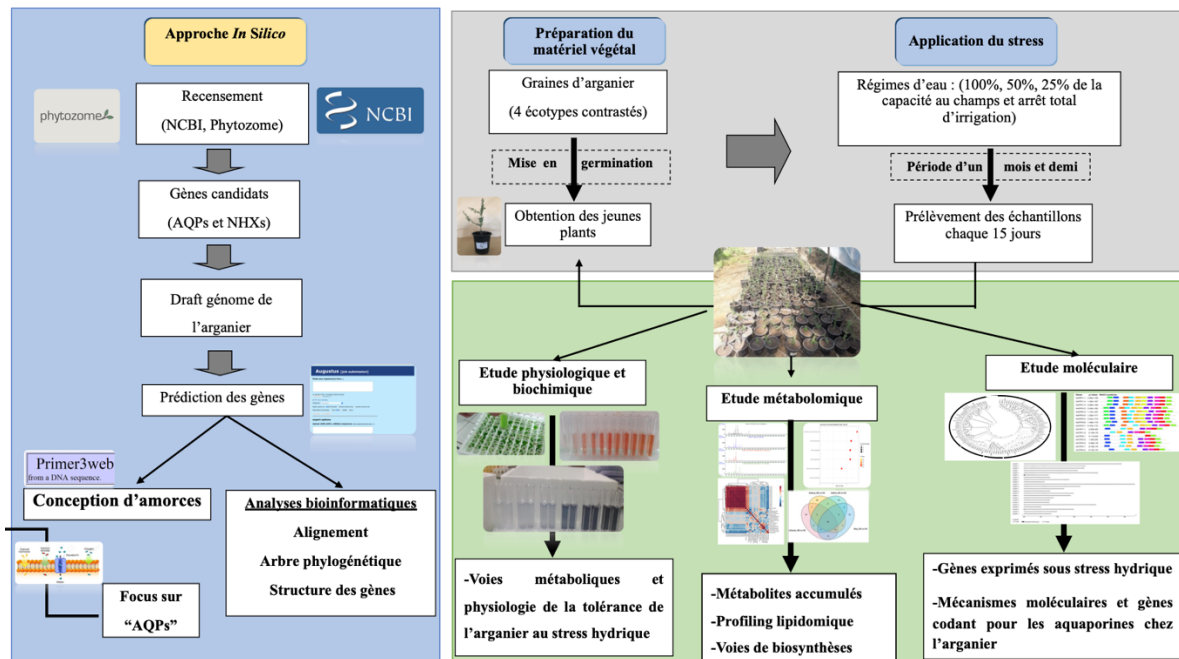


Figure 8: Schéma des approches méthodologiques

### II.1. Analyses bio-informatiques *in silico*

#### II.1.1. Recensement des membres des gènes AQPs et NHXs

Afin d'identifier les gènes putatifs codant des aquaporines (AQPs) et des antiporteurs (NHXs) chez l'*Argania spinosa* L., une approche gène candidat a été adoptée. Pour la réalisation des analyses *In silico* de ces gènes, on a eu recours dans un premier temps à une collecte de séquences nucléotidiques et protéiques de différents groupes de gène AQP et NHX chez deux espèces modèles : *Arabidopsis thaliana* L. et *Populus trichocarpa* L. La collecte de ces gènes candidats a été effectuée en cherchant les séquences par mots clés ou par numéros d'accèsion

en utilisant des bases de données publiques tels que TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) et Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

## II. 1.2. Analyses In silico des séquences

### II.1.2.1. Annotation des séquences

L'ensemble des séquences récupérées ont été enregistrées sous format FASTA et utilisées comme requête dans BLAST (Tblastn) sur NCBI contre le génome d'arganier, afin d'extraire les contigs contenant les gènes prédits en question. Tous les contigs obtenus sont annotés *via* le serveur AUGUSTUS en ligne avec une interface graphique. Ensuite, l'outil Pfam (<http://pfam.xfam.org/search/sequence/>) a été utilisé pour examiner si toutes les séquences protéiques obtenues contiennent le motif conservé caractérisant chaque gène. Les séquences protéiques présentant un domaine MIP et deux motifs NPA sont considérées comme des gènes AQP potentiels, tandis que celles qui contiennent un domaine amiloride sont codées pour les antiporteurs NHX.

De plus, les poids moléculaires (MW), le point isoélectrique théorique (pI) des protéines prédites ont été calculés par un serveur Internet, Expasy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)). Les hélices transmembranaires (HTM) des AsAQP et des AsNHX ont été évaluées par la méthode de prédiction MEMSAT-SVM disponible sur le serveur Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) ( Kelly *et al.*, 2015), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh *et al.*, 2001), et leur localisation subcellulaire ont été prédites par Plant-mPLoc5 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) et WolfPsort.

### II.1.2.2. Alignement multiple et phylogénie

Les séquences d'acides aminés obtenues à partir du génome d'Arganier ainsi que celles d'*Arabidopsis* et *Populus* ont été utilisées pour comprendre l'évolution de chacun des gènes d'AQP et de NHX d'*Argania spinosa* L. Les alignements multiples de toutes les séquences ont été effectués moyennant la plateforme Web du programme Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Les arbres phylogénétiques ont été générés par le programme MEGA-X à travers son interface graphique sous Windows. Les relations phylogéniques ont été estimées par la méthode de Neighbor-joining en utilisant le modèle de Kimura à deux paramètres (transitions et transversions). La fiabilité de la topologie des arbres a été évaluée par une analyse du Bootstrap à 1000 répliques.

### II.1.2.3. Motifs et structures des familles des gènes

La présence de motifs conservés entre les séquences protéiques de la famille des gènes étudiés a été étudiée avec la suite MEME (<http://meme-suite.org/>) (Bailey *et al.*, 2009). Les réglages par défaut ont été utilisés, excepté le nombre de motifs à chercher : 10, et les tailles minimale et maximale du motif : 6 à 20 aa. Diverses organisations exon-intron des gènes AQP et NHX ont été analysées avec 'GSDS' Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) sur la base des séquences codantes des gènes et de leurs séquences d'ADN génomique correspondantes.

La structure tridimensionnelle (3D) des séquences protéiques des AsAQP a été générée par le serveur Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelly *et al.*, 2015) avec le mode "Normal". Les résultats générés sous forme de fichiers PDB à partir de Phyre2 ont ensuite été téléchargés sur le serveur PoreWalker pour prédire la structure tertiaire des protéines (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PoreWalker/>) (Pellegrini-Calace *et al.*, 2009).

### II.1.2.4. Design d'amorces SSR et validation

Le développement des amorces SSR à partir des séquences nucléotidiques des gènes candidats a été fait moyennant le logiciel LRAS. Ce logiciel est une combinaison entre deux programmes, MISA (MIcoSATellite), adapté à la recherche automatique des SSR, et Primer3, automatisé à la conception des amorces aux régions flanquant les SSR identifiés, en possédant plusieurs paramètres d'entrée.

Les valeurs de paramètres de calcul pour LRAS sont comme ceci :

- La Tm : 57°C-63°C
- La taille des amorces : 18-27 pb
- Le pourcentage en GC : 20%-80%.

L'exécution de ce programme engendre deux types de fichiers séparés :

- **Fichier.lras** : contient les microsatellites identifiés avec leurs types, leurs localisations, les amorces associées à chaque SSR avec plusieurs paramètres, tels que, la taille d'amorce, la teneur en GC, la Tm et taille de produit.
- **Fichier Statistics** : résume les différentes statistiques d'un type de microsatellites.

Suite à notre recherche *In Silico*, 6 paires d'amorces SSR sélectionnées de l'ensemble des amorces développées ont été synthétisées pour une validation au laboratoire de Microbiologie

et Biologie Moléculaire (LMBM). Ces amorces sont impliquées dans le stress hydrique spécifique au gène d'aquaporine chez différentes plantes ligneuses.

Des échantillons d'ADN génomique préalablement extraits et stockés à -20°C disponibles au LMBM ont été utilisés. Ces ADNs sont extraits à partir des feuilles lyophilisées de différentes plantes y compris l'Arganier.

## II.2. Expérimentation sur l'Arganier (*Argania spinosa* L.)

### II.2.1. Matériel végétal

Le présent travail a porté sur quatre écotypes (provenances) d'arganier (*Argania spinosa* L.) issus de quatre régions de l'arganeraie marocaine, géographiquement distincts (région de Rbai, région d'Admin, région d'Aoulouz et région de Lakhssas) (Figure 9). Des jeunes plantes d'arganiers âgés de trois mois ont été gracieusement fournies par le Centre Régional de la Recherche Forestière de Marrakech (CRRF).

Ces jeunes plantes ont été transplantées ensuite dans des alvéoles contenant un mélange de sol forestier (75%) et de tourbe (25%) et placées en serre dans le Centre de Recherche Forestier de Rabat. Après trois mois, les plantules ont été transférées dans des pots individuels remplis du même mélange et irriguées quotidiennement jusqu'à ce qu'elles aient un an et demi.

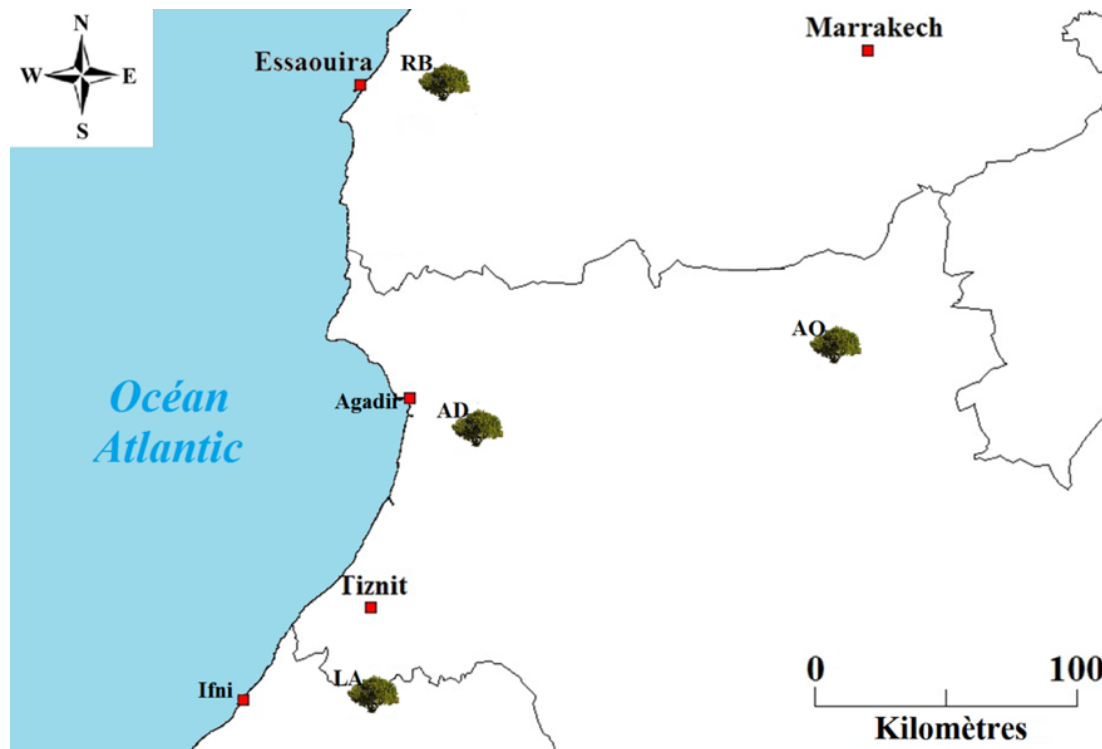
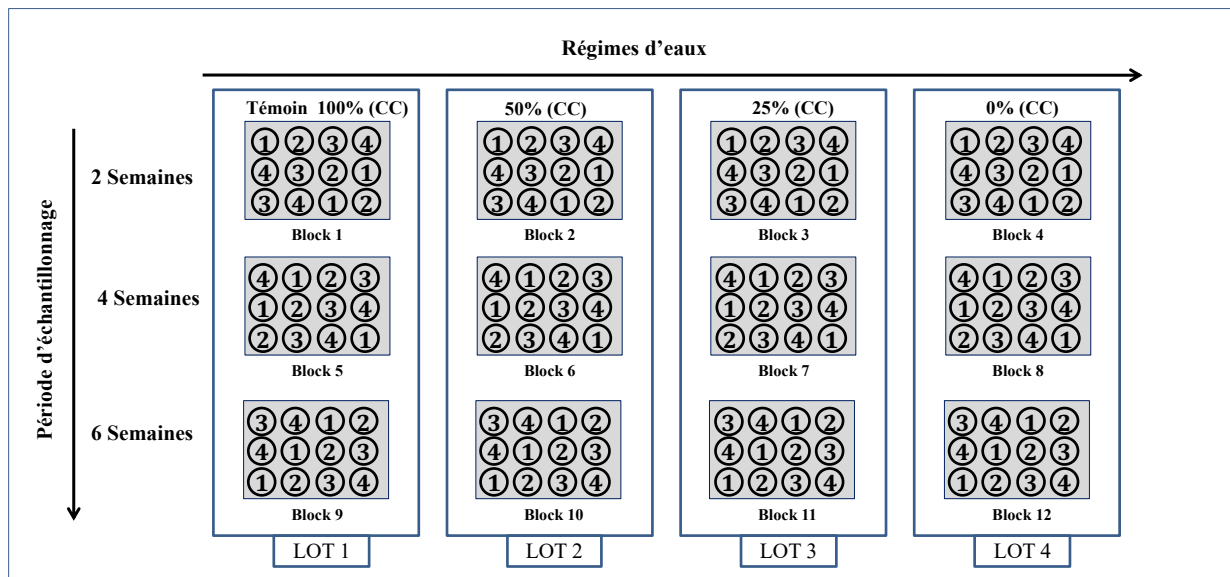


Figure 9: Répartition géographique des écotypes étudiés (RB :Rbai, AD : Admin, LA :Lakhssas, AO : Aoulouz)

### II.2.2. Mise en place de l'expérimentation et l'application du stress

La conception de l'essai a été complètement randomisée et effectuée dans une serre en condition semi contrôlée. Un total de 144 plantules ont été sélectionnées afin d'appliquer différents niveaux de stress hydrique (100 %, 50 %, 25 % et 0 % de la capacité au champ).

Cette expérimentation a été réalisée sous forme de quatre lots de 36 plantules sous forme de block à raison de 12 pots/block (Figure 10). Les plantules du premier lot ont été considérées comme étant les témoins (Capacité au champ 100%). Les plantules du deuxième et du troisième lot ont subi une réduction des apports en eau de 1/2 (Capacité au champ de 50%) et de 1/4 (Capacité au champ de 25 %), respectivement. Pour le dernier lot, les plantules ont été maintenues à 0 % de la capacité au champ (arrêt d'irrigation).



**Figure 10: Dispositif expérimental schématisé sous forme des blocks. 1,2,3 et 4 : les écotypes ; CC : Capacité au champ**

Les niveaux d'irrigation (100 %, 50 % et 25 %) par rapport à la capacité au champ du pot ont été déterminés selon la méthode décrite par Côme et Corbinau, (1998). Nous pesons des pots contenant 1 kg de substrat sec utilisé dans l'expérience (P1 = 1kg de sol sec). Ensuite, nous procédons à l'irrigation des pots jusqu'à la saturation. Après 24 h, nous repesons les pots de nouveau P2 (poids à saturation). La différence entre P1 et P2 représente la quantité d'eau que le sol a pu conserver à 100 % de la capacité du champ.

La capacité au champ du pot pour chaque traitement sera suivie quotidiennement tout en ajustant chaque pots avec la quantité nécessaire après chaque pesée. Des prélèvements d'échantillons des feuilles ont été effectués aux jours 15, 30 et 45 pendant la phase de stress.

## **II.3. Mesure des traits biochimiques**

Afin d'évaluer les traits biochimiques ainsi que les réponses métabolomiques et transcriptomiques, les feuilles des plantules d'arganier ont été broyées dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette dernière est aliquotée en trois flacons séparés qui vont servir aux études biochimique, métabolomique et d'expression des gènes, puis la conservation à -80°C.

### **II.3.1. Extraction d'enzymes et dosage d'activité enzymatique**

L'extrait brut des enzymes antioxydants a été préparé par homogénéisation de la poudre de feuilles d'arganier (100 mg) dans 3 ml de 100 mM du tampon phosphate de sodium (pH 7,8), contenant 5 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 5 mM d'EDTA et 2 % de PVP. L'homogénat a été transféré dans deux tubes (1,5 ml), puis centrifugé à 10 000 g pendant 20 min à 4°C. La phase supérieure, qui contient les protéines a été collectée puis utilisée pour déterminer la teneur en protéines et mesurer les activités antioxydantes (Chen et Zhang, 2016).

Afin de calculer les activités spécifiques des enzymes étudiées, la concentration des protéines totales solubles a été déterminée selon la méthode décrite par Bradford (1976), en utilisant le sérum albumine bovine (BSA) comme étalon. Toutes les analyses spectrophotométriques ont été menées sur un spectrophotomètre « UV-2005 ».

### **II.3.2. Teneur en proline**

La teneur en proline a été déterminée selon la méthode décrite par Chen et Zhang, (2016). L'extrait enzymatique de 50  $\mu$ l a été mélangé avec 1 ml de la solution de réaction contenant le sulfosalicylique à 3 %, l'acide acétique et l'acide-ninhydrine à 2,5 %. Le mélange réactionnel a été bouilli à 100 °C pendant 15 min, puis incubé dans la glace durant 5 mn. L'absorbance fut lue à une longueur d'onde de 520 nm, les concentrations ont été déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage tracée au préalable dans les mêmes conditions à partir du L-proline en tant que standard.

### **II.3.3. Teneur en chlorophylle**

Pour quantifier les pigments photosynthétiques, le matériel foliaire a été mélangé avec l'acétone à 80 % (v/v) et CaCo<sub>3</sub> (p/v) à 0,1 %. Après centrifugation à 3000 tr/min pendant 10 min, l'absorbance des surnageant récupérés a été lue aux longueurs d'onde 663, 645 et 470 nm pour la chlorophylle a, la chlorophylle b et le caroténoïde respectivement. La teneur en

chlorophylle a, b et en caroténoïdes a été calculée selon les équations proposées par Lichtenthaler (1987).

#### **II.3.4. Dosage des sucres solubles**

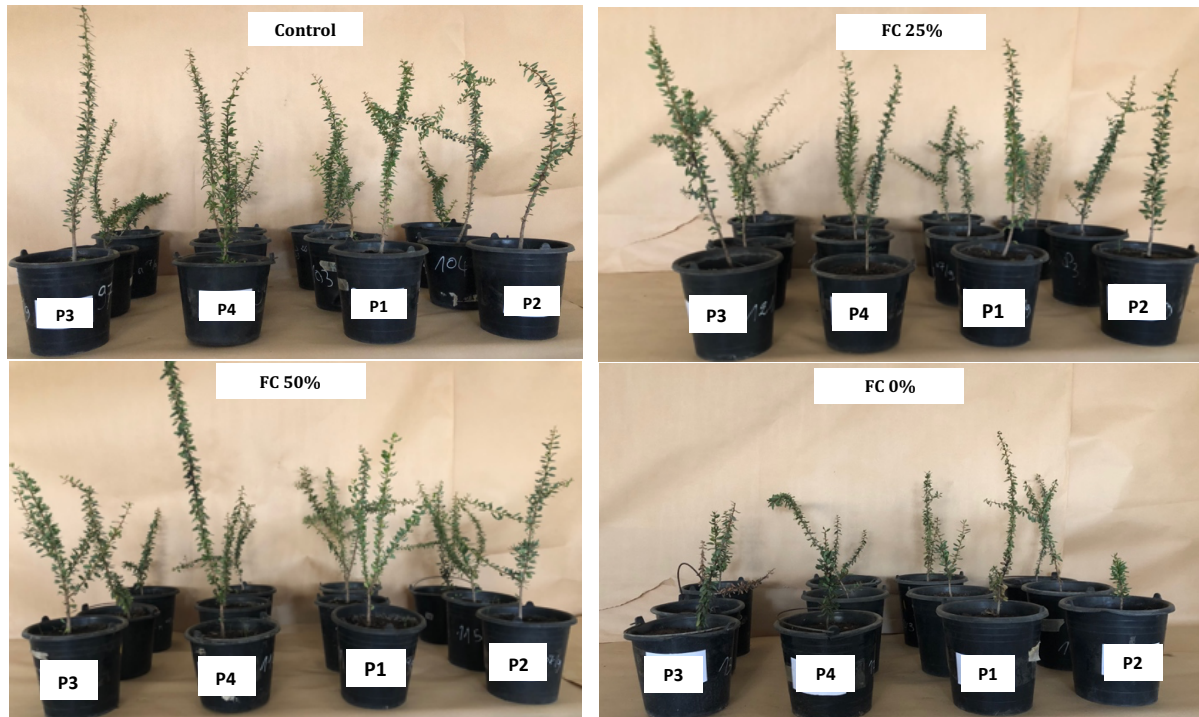
La teneur en sucres solubles totaux a été estimée spectrophotométriquement après une extraction de matériel foliaire (30 mg) à l'éthanol (80 %) selon la méthode décrite par Dubois *et al.*, 1956. Les extraits ont été incubés à 80 °C pendant 1h et centrifugés à 500 g. Le surnageant (10 µl) a été mélangé avec 5% de phénol (200 µl) puis additionné de 1ml d'acide sulfurique. Le mélange réactionnel a été laissé au repos pendant 10 min, vortexé (30 s) puis placé à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 490 nm et le D-glucose a été utilisé comme étalon externe.

#### **II.3.5. Teneur en phénols totaux**

La concentration en phénols totaux a été déterminée selon la méthode décrite par Ainsworth et Gillespie, 2007). Des aliquotes poudres finement broyée du matériel foliaire (20mg) ont été mélangés homogénéisés dans 2 ml de méthanol à 95 % (vol/vol). Les homogénats ont été incubés à température ambiante pendant 48 h dans l'obscurité. Après centrifugation (13000 g/ 5min), 25 µl d'extrait ont été mélangés avec 200 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (10 %). La solution a été agitée vigoureusement par vortex puis 800 µl de NaCo<sub>3</sub> (700 mM) ont été ajoutés et incubés à température ambiante pendant 2 h. L'absorbance a été mesurée à 765 nm et la teneur phénolique totale a été calculée en utilisant la courbe standard de l'acide gallique.

## II.4. Analyse d'expression des gènes candidats : Aquaporines

qRT-PCR est une technique de choix pour analyser l'expression du gène d'aquaporine durant la contrainte hydrique imposée par différents régimes d'eau. Cette partie va se focaliser sur les plantules échantillonnées (48 plantules au total) en dernier prélèvement (après 45 jours) (Figure 11). Les feuilles des plantules triplet ont été mélangées et broyées dans l'azote liquide et réduites en un « pool » de poudre fine.



**Figure 11:** Plantules d'*Argania spinosa* L. des différents écotypes sous trois régimes d'eau pendant 45 jours destinées pour l'étude de l'expression. P1: écotype Rbai; P2: écotype Admin; P3: écotype Aoulouz; P4: écotype Lkhssas; Control: 100% de la capacité au champ, FC25% : 25% de la capacité au champs, 50%FC : 50% de la capacité au champ, FC0% : 0% de la capacité au champ

### II.4.1. Extraction des ARN totaux

Pour extraire les ARN totaux de feuilles d'arganier, une méthode adaptée de celle de Xu *et al.* (2009) a été mise au point lors de nos travaux. Cette expérimentation doit être réalisée dans des conditions de propreté extrême, afin de limiter tout risque de contaminations de l'extrait par des RNases naturellement présentes dans notre environnement qui détruiraient les ARN extraits.

Le broyat (100 mg) a été disposé immédiatement dans des tubes Eppendorf RNase-free avec 600 µl de tampon d'extraction (100 mM Tris, pH 8.0, 25 mM EDTA, 2M NaCl, 2 % CTAB).

Le tout a été mélangé par inversement pendant 30 s. La suspension a été incubée à 65°C pendant 15mn sous agitation. Après incubation, 600 µl de chloroforme ont été additionné et mélangé par retournement plusieurs fois. Le mélange a été centrifugée à 14 000 rpm pendant 10 min à 4°C. Une fois la phase aqueuse récupérée, 100 µl du NaCl (5M) et 300 µL du chloroforme ont été ajoutés et le tout a été mélangé par retournement plusieurs fois puis centrifugé à 14 000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été récupéré puis traité de la même manière que l'étape précédemment.

Les acides nucléiques contenus dans le surnagent ont été précipités en présence d'acétate de sodium 3M et 0,5 volume de l'isopropanol pour une durée de 15 mn à une température ambiante. Le culot obtenu après une centrifugation à 14000 rpm pendant 15 mn à 4°C a été lavé avec l'éthanol 75% (800 µl) et ensuite il a été séché puis suspendu dans 50 µL d'eau « RNase free » avant d'être stocké à -20°C.

#### **II.4.2. Synthèse ADNc par Transcription Inverse**

Une fois la qualité des ARNs extraits est vérifiée par le spectrophotomètre Thermo Scientific NanoDrop 2000c UV-Vis, une transcription inverse sur 5 µg d'ARN totaux a été réalisée. En premier lieu, un traitement avec une DNase (Turbo DNA-Free, Applied Biosystems) a été effectué afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique. Les ARNs ont été traités par de la DNase pendant 30 min à 37°C. Le mélange réactionnel a été réalisé dans un volume final de 20 µl, comportant : 1 µg d'ARN, 1µl de DNase I (2 U/µl), 2 µl de tampon 10x Dnase Turbo, le reste étant complété par de l'eau « free-Rnase ». Par la suite, une étape d'inactivation d'enzyme a été effectuée par l'ajout de 2 µl de réactif d'inactivation. Le tout a été bien mélangé avant d'être incubé à une température ambiante pendant 2 min. Finalement, après une centrifugation à 10000g pendant 90s, le surnagent a été transféré soigneusement dans de nouveau tube.

En utilisant le Kit Tetro cDNA Synthesis, l'ADNc est synthétisée dans un mélange réactionnel de 20µl contenant : 5µg d'ARN, 1 µl d'amorces Oligo (dT)18, 1µl de dNTPs à 10mM, 5x de Tampon RT, 1µl RiboSafe RNase et 1µl Tetro Reverse Transcriptase (200U/µl). Le premier brin d'ADNc est synthétisé à 45°C pendant 30 min. La réaction fut arrêtée par l'inactivation de l'enzyme à 85°C durant 15min. Le produit de la réaction de rétrotranscription a été dilué, puis utilisé comme matrice, pour l'amplification PCR des gènes candidats.

### II.4.3. Dessin de couples d'amorces

Le choix des amorces est particulièrement important en PCR quantitative. Pour chaque gène étudié, un couple d'amorces amplifiant de manière spécifique a été sélectionné pour étudier les profils d'expression des gènes chez l'*Argania spinosa* L. par RT-qPCR. Toutes ces amorces ont été définies dans la partie codante à l'aide du logiciel Primer3 (<https://primer3.ut.ee>).

La normalisation des données d'expression est une étape primordiale qui, nécessite l'utilisation des gènes ayant des niveaux d'expression parfaitement stables dans toutes les conditions. Il s'agit des gènes de référence 'Housekeeping genes'. Pour notre étude, trois gènes de référence les plus utilisés (ACT, UBQ et TUB). Ces derniers, de même, ont été prédits et identifiés sur le génome d'arganier puis un couple d'amorce a été conçu pour chaque gène de ménage.

Les principales conditions à respecter sont :

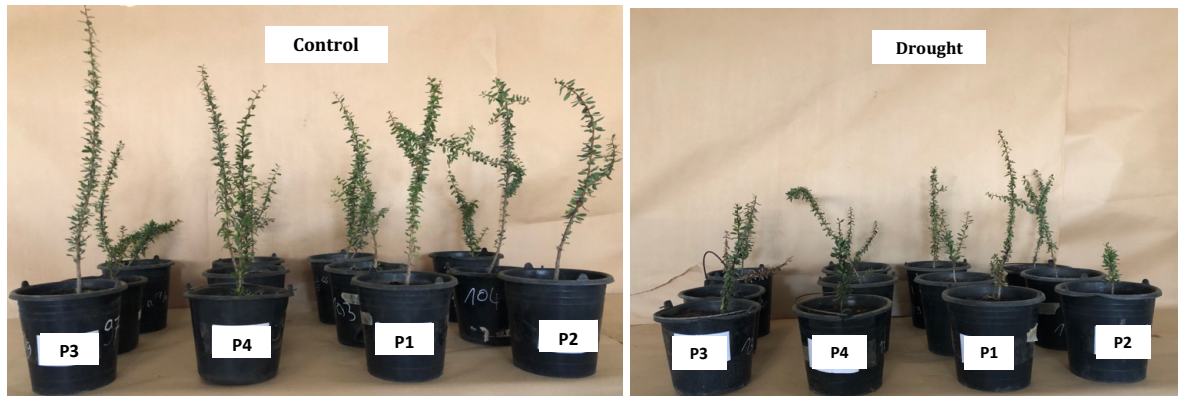
- Amplification de fragments courts, taille recommandée 100-200pb
- Teneur en G/C basse préférable, tolérée entre 20% et 80% mais 50-60% recommandée
- Température de fusion ( $T_m$ ) des paires d'amorces proche de 60°C
- Différence entre  $T_m \leq 0.5^\circ\text{C}$  si possible
- Pas de formation de dimères
- Absence de chevauchement entre paires amorces

### II.4.4. PCR en temps réel (RT-qPCR)

Les réactions RT-qPCR ont été effectuées par le Kit BIOLOINE (SensiFAST SYBR Green/Lo-ROX Kit) conçu pour estimer la quantité des transcrits dans chaque échantillon. Trois répétitions biologiques de chaque échantillon, ont été mélangées dans un seul tube, afin d'obtenir un 'pool' d'échantillons. Le mélange réactionnel a été réalisée en triple exemplaire (trois répétitions techniques) dans un volume finale de 20  $\mu\text{l}$ , composé de : 10  $\mu\text{L}$  de Mixte 2x SensiFAST SYBR® Lo-ROX, 0,8  $\mu\text{l}$  d'amorces sens et anti-sens (400 nM), 1  $\mu\text{l}$  d'ADNc et complété avec de l'eau (RNase free). L'amplification a été conduite avec les paramètres suivants : une étape d'activation de polymérase à 95 °C pendant 2 minutes, suivis d'un cycle comprend : la dénaturation à 94°C pendant 5 secondes, l'hybridation de l'amorce de 60 à 65 °C pendant 10 secondes et la phase d'élongation à 72 °C pendant 5-20 secondes. Ce cycle a été répété 40 fois.

## II.5. Analyse métabolomique par GC-MS

L'analyse GC-MS (Gaz Chromatography - Mass Spectrometry) des échantillons a été réalisée sur la Plateforme de Mascir (Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation and research). Un total de 24 échantillons collectés après 45 jours du stress imposé a été utilisé pour ce volet, dont 12 plantules stressées (non irriguées) et 12 plantules non stressées (capacité au champ à 100%) (Figure 12).



**Figure 12: Plantules d'*Argania spinosa* L. de différents écotypes sous stress hydrique (45 days) pour l'analyse des profils métabolomiques. P1: écotype Rbai; P2: écotype Admin; P3: écotype Aoulouz; P4: écotype Lkhssas; Control: 100% de la capacité au champ, Drought : 0 % de la capacité au champ**

### II.5.1. Préparation des échantillons

Les étapes de ce protocole sont issues des travaux de Kamthan *et al.* (2012) ; et Rachidi *et al.* (2021) avec quelques modifications. L'extraction des métabolites a été effectuée par homogénéisation des aliquotes de poudre congelée de matériel végétal (300 mg) dans 4 ml de chloroforme : méthanol (2:1, v/v) contenant du Dodécane à 10  $\mu$ l (0,75 g/ml). Le mélange a été incubé pendant 2h, vortexé puis sonifié à 60°C à l'aide d'un sonificateur à ultrasons pendant 1h. Par la suite, un volume de 2 ml de méthanol a été additionné et le mélange a été de nouveau sonifié à 60°C pendant 2h. 1 ml de H<sub>2</sub>O a été ajouté puis l'ensemble a été vortexé soigneusement. Avant la transestérification, la phase organique a été recueillie et séchée sous flux d'azote, puis 500  $\mu$ l de méthanol/acide sulfurique (6%, v/v) a été ajouté. Le mélange a été incubé à 85°C pendant 2 h, puis pendant 1 h dans un sonificateur à ultrasons. Après séchage, 250  $\mu$ l d'eau et 750  $\mu$ l de chloroforme ont été ajoutés, et la phase inférieure a été récupérée à l'aide d'une ampoule à décanter afin de passer aux analyses GC-MS.

### II.5.2. Analyses par GC-MS

Un volume 4  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon a été injecté en mode 'Splitless'. Le système GC-MS comprend une chromatographie en phase gazeuse (GC) (série Agilent 7890A) couplée à la spectrométrie de masse (MS). La chromatographie gazeuse s'est faite sur une colonne de 15m de longueur, 320  $\mu\text{m}$  de diamètre interne et 0,1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur du film. La température du quadripôle et celle de la source d'ions ont été fixées à 280°C et 230°C, respectivement. Le gaz vecteur utilisé était de l'hélium à un débit constant de 3  $\text{mL min}^{-1}$ .

### II.5.3. Traitement et analyse des données

Les fichiers de données Agilent bruts ont été convertis au format NetCDF et analysés avec AMDIS (<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>). L'identification des métabolites a été réalisée à partir d'une banque d'indices de rétention/spectre de masse construite à partir des bases de données NIST (<https://www.nist.gov/pml/atomic-spectra-database>).

Une proportionnalité entre la concentration du standard interne (Dodécane) connue et la moyenne de leurs surfaces de pics a été utilisée pour exprimer la concentration de tous les métabolites identifiés en  $\mu\text{g}$  par g de poids frais ( $\mu\text{g/g}$ . FW, Fresh Weight).

Les données métabolomiques générées par GC-MS ont été traitées par le logiciel MetaboAnalyst version 5.0 (Pang *et al.*, 2021) (<https://www.metaboanalyst.ca/>), un package statistique en ligne. Après normalisation (transformation logarithmique), des analyses statistiques multivariés, y compris l'analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse discriminante de la régression par les moindres carrés partiels (PLS-DA) ont été effectuées.

Les métabolites différentiellement accumulés en réponse au déficit hydrique, ont été détectés par la première composante principale du VIP (Variable Importance in the Projection) (Lin *et al.*, 2011). Les variables avec  $\text{VIP} \geq 1$ , le test t de Student  $P < 0,05$  et le fold change  $\geq 1$  ont été considérées comme cumulées de manière significative.

Des voies métaboliques associées à ces différents métabolites accumulés ont été ensuite construites par Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <https://www.genome.jp/kegg/>).

*Partie III :*

*Résultats et présentation des articles*

## **Partie III : Résultats et présentation des articles**

### **III.1. Recherche de bio-marqueurs fonctionnels de type SSR associés aux gènes de la famille de l'aquaporine chez l'arganier**

Ce chapitre est constitué d'un article publié dans le journal *Plant Signaling & Behavior* en 2018.

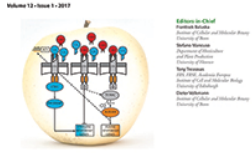
#### **III.1.1. Contexte**

Les marqueurs moléculaires, en particulier les marqueurs fonctionnels associés à la tolérance au stress abiotique, sont encore absents chez *Argania spinosa* L. Les microsatellites (SSR) sont des marqueurs moléculaires codominants et fiables pour l'étude des plantes dont la séquence génomique n'est pas disponible. Ils ont été largement utilisés pour la sélection assistée par marqueurs. Plusieurs approches physiologiques, biochimiques et génomiques ont fait progresser la compréhension des réponses et des adaptations des plantes à divers stress abiotiques tels que la sécheresse, le froid, la salinité, etc. Récemment, le nombre de séquences de gènes ainsi que de génome complet de différentes espèces végétales ont considérablement augmenté et sont disponibles en ligne dans diverses bases de données. Plusieurs gènes sont induits par le stress hydrique chez de nombreuses espèces de plante dont les aquaporines. Ce sont une famille de gènes de protéines membranaires impliqués dans plusieurs processus physiologiques notamment la réponse aux stress abiotiques.

Lors de la première partie de travail de thèse, nous nous sommes intéressés à adopter une démarche *in silico* qui permet de mettre en évidence des marqueurs SSR fonctionnels associés aux gènes d'aquaporine afin de les employer comme outil moléculaire de sélection précoce pour l'arganier.

III.1.2. Article 1: *In silico* development of new SSRs primer for aquaporin linked to drought tolerance in plantes

**PLANT** signaling & behavior



Plant Signaling & Behavior



ISSN: (Print) 1559-2324 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/kpsb20>

## *In Silico* development of new SSRs primer for aquaporin linked to drought tolerance in plants

Karim Rabeh, Fatima Gaboun, Bouchra Belkadi & Abdelkarim Filali-Maltouf

To cite this article: Karim Rabeh, Fatima Gaboun, Bouchra Belkadi & Abdelkarim Filali-Maltouf (2018): *In Silico* development of new SSRs primer for aquaporin linked to drought tolerance in plants, *Plant Signaling & Behavior*, DOI: [10.1080/15592324.2018.1536630](https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1536630)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1536630>



[View supplementary material](#)



Published online: 31 Oct 2018.



[Submit your article to this journal](#)





[View Crossmark data](#)

## RESEARCH PAPER



## *In Silico* development of new SSRs primer for aquaporin linked to drought tolerance in plants

Karim Rabeh <sup>a</sup>, Fatima Gaboun<sup>b</sup>, Bouchra Belkadi<sup>a</sup>, and Abdelkarim Filali-Maltouf <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, Morocco; <sup>b</sup>Biotechnology Unit, National Institute for Agronomic Research (INRA), Rabat, Morocco

### ABSTRACT

Plants are exposed to various stress factors including biotic and abiotic stresses. Drought is a limiting factor that minimizes the development and growth of several plants in arid and semi-arid regions. Stress response is usually occur at different levels, Morphological, physiological and biochemical while at the molecular level a large number of genes are involved. This study aims at developing a new SSR primer for aquaporin related to drought stress in plants. A total of 177 complete coding sequences (CDS) available in the NCBI database are downloaded. After analyzing with BLAST, 163 sequences are selected. 1294 SSR derived from these sequences are characterized with MISA and indicating that all sequences contained SSRs. The most abundant SSR has been tetra-nucleotide repeat motif (36%) and among all the tetra-nucleotide repeats, the motif AAAG/CTTT was the most common type, whereas in tri-nucleotide, the motif CCG/CGG has been the predominate type. By using Primer3, 1120 primer pairs are generated and after analyzing, only 735 non redundant primer pairs that present the good characteristics are selected. Among them, some of the pairs of primers are randomly selected and validated on DNA of various species using PCR and agarose gel.

### ARTICLE HISTORY

Received 25 July 2018  
Revised 3 October 2018  
Accepted 8 October 2018

### KEYWORDS

drought; aquaporin; *In silico*; SSR(SimpleSequenceRepeat)-markers; primers

## Introduction

Plants are exposed during their life-cycle to several environment stresses. Drought is one of the most abiotic stress factors that alters plants physiology, growth and the productivity of crop plants.<sup>1</sup>

Various responses to drought stress are suggested including tolerance strategies and complex survival that are capable of changing gene expression at the molecular level. Many alternatives are produced in protein synthesis, and therefore in their biological functions.<sup>2</sup> Several genes have been already identified in various plants like, cereals, vegetables, and particularly in the model plant, *Arabidopsis thaliana* L.<sup>3</sup>

Aquaporins are integral membrane proteins, which facilitates the passive movement of water through cells and play a crucial role in plant water relations.<sup>4-6</sup> They have been shown to be involved in numerous physiological responses, particularly in water uptake and radial water transport.<sup>6-8</sup> Responses of aquaporins to drought stress are very diverse and depend on the investigated species, tissue, subfamily, isoform, and the level of stress used in the study. Aquaporins are outstandingly involves to various abiotic stresses and a number of studies have been conducted regarding the impact of salinity, cold, and drought on these proteins.<sup>9-11</sup> In olive (*Olea europaea* L.), two PIP (Plasma membrane Intrinsic Proteins) genes (OePIP1,1 OePIP2,1) and one TIP (Tonoplast Intrinsic Proteins) gene OeTIP1,1 showed a significant decrease at the transcript levels in leaves, roots, and twigs.<sup>12,13</sup> In the root of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), drought stress significantly

reduced PIP transcript levels of two investigated genes, NtPIP1;1 and NtPIP2;1.<sup>11,14,15</sup>

Aquaporins (AQPs) belong to the great family of conserved proteins termed MIPs (Major Intrinsic Proteins), and they exhibit a high diversity in numerous organisms.<sup>16</sup> In plants, the aquaporin family is particularly abundant and have a high diversity of isoforms.<sup>17</sup> Based on the sequence homology and sub-cellular localization, the higher plant aquaporins have been divided in five main homologous subfamilies; PIPs (Plasma membrane Intrinsic Proteins), TIPs (Tonoplast Intrinsic Proteins), NIPs (Nodulin 26-like Intrinsic Proteins), SIPs (Small Intrinsic Proteins) and XIPs (X Intrinsic Proteins).<sup>18</sup> All MIPs (Major Intrinsic Proteins) include two highly conserved NPA (Asn-Pro-Ala) motifs that play a crucial role in selective water conduction in aquaporin water channels.<sup>19</sup>

Recent developments in molecular biology have resulted in the development of molecular markers such as RAPD (Randomly Amplified polymorphic DNA),<sup>20</sup> AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism),<sup>21</sup> SSR(Simple Sequence Repeat),<sup>22</sup> ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat),<sup>20</sup> SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism),<sup>23</sup> that are used in various studies like, genetic diversity, fingerprinting and elucidation of the genetic origin of various species. Due to their many advantages, including co-dominance, high polymorphism, relative abundance and reproducibility, efficiency and simplicity, SSR markers were considered relevant markers for several studies such as plant cultivar identification, genetic

linkage map construction, genetic diversity analysis, and comparative genomics.<sup>24</sup>

Recently, the number of gene sequences as well as the complete genome of different plant species have increased significantly and are available online in various databases. *In silico* analysis of these sequences is crucial for the functional annotation of genes. In this context, the objectives of the present study are:

- Identifying a large number of aquaporin genes associated with drought stress;
- Comparing the abundance, distribution and dominant repeat motifs among SSR markers;
- Developing a new set of SSR-primers from various species, and testing some of the primers designed on four DNA accessions using PCR and agarose gel.

This resource will help the researchers in obtaining experimental data for the tolerance of drought of a large species.

## Results and discussion

### Frequency and distribution of genic SSR

Based on the complete CDS (coding Sequence), a total of 163 nucleotide sequences of aquaporins candidate genes were retrieved. These sequences are divided into four sub-families (PIP1, PIP2, TIP1 and TIP2) for drought stress response in various species (woody and herbaceous) (Supplementary Table1). The aquaporin PIP2 is the most abundant sub-family with 32 and 34 sequences in the woody and herbaceous plants, followed by PIP1, TIP1 and TIP2 sub-families (Figure 1).

Using a tool known as MISA (MICroSatellite), 1294 microsatellites were detected from 163 nucleic acid sequences (179696bp). Out of the 1294 microsatellites, 162 had more than SSR and 84 SSRs present in compound formation (Table 1). Single repeat types of SSR represented 94.7% and compound repeats represented 5.3%.

In this study, a total of 1294 SSRs containing repeats from mono- to hexa-nucleotides, being 1210 SSRs single (94%) and 84 SSRs compound formation (6%) for all studied species. Due to their repeat compositions, all simple-sequence repeats identified have been classified (Figure 2). The tetra-nucleotide repeat were most abundant (466) and accounted for 36% of the total SSRs, followed by tri-nucleotide repeats 19% (242), penta-nucleotides 18% (229), hexa-nucleotides 15% (189), mono- and di-nucleotides represent successively 6% (73) and 1% (11).

The frequency and abundance of different motif repeats have been reported to show variable and uneven distribution among different organisms. The predominant type in the present study has been tetra-nucleotide, similar to previous studies with other plants, including sugar cane and cucumber.<sup>25,26</sup> However, this result is in contrast to earlier studies showing that type of motif repeats predominates in mushroom is mononucleotide,<sup>27</sup> in citrus tri-nucleotide<sup>28</sup> and in cotton penta-nucleotide.<sup>29</sup> The variation of this predominance of repeat motifs can be explained by the source of the DNA sequences (EST, cDNA, or gene sequences) used in each study. The di-nucleotide repeats were also the most frequent class of SSR derived from genomic DNA of various species, including melon, bean, peanut and quinoa.<sup>30-34</sup>

Among the tri-nucleotide repeat units, CCG/CGG code which stands for proline and arginine, was the most abundant with frequency of 4.8% (67) followed by ACC/GGT code (60, 4.3%) which stands for threonine and glycine (Figure 3). These results are in line with the studies in *Pyropia haitanensis* wherein the GCC/CCG was the most common trinucleotide repeat, accounting for 60.07%.<sup>35</sup> Parekh, Kumar, Zala, Fougat, Patel, Bosamia, Kulkarni and Parihar<sup>36</sup> reported that AAG/CTT and ATC/ATG were the most common tri-nucleotide repeat in diploid cotton. Each triplet of nucleic acid describes a specific amino acid, which plays a crucial role in many cellular, biological, and metabolic processes in plants.<sup>37</sup>

Of the tetra-nucleotide, the motifs AAAG/CTTT, AAAC/GTTT, ACCC/GGGT and AAGT/ATTC were the most frequent with frequencies of 4.6% (63), 3.5% (48), 3.2% (44) and 3% (42),

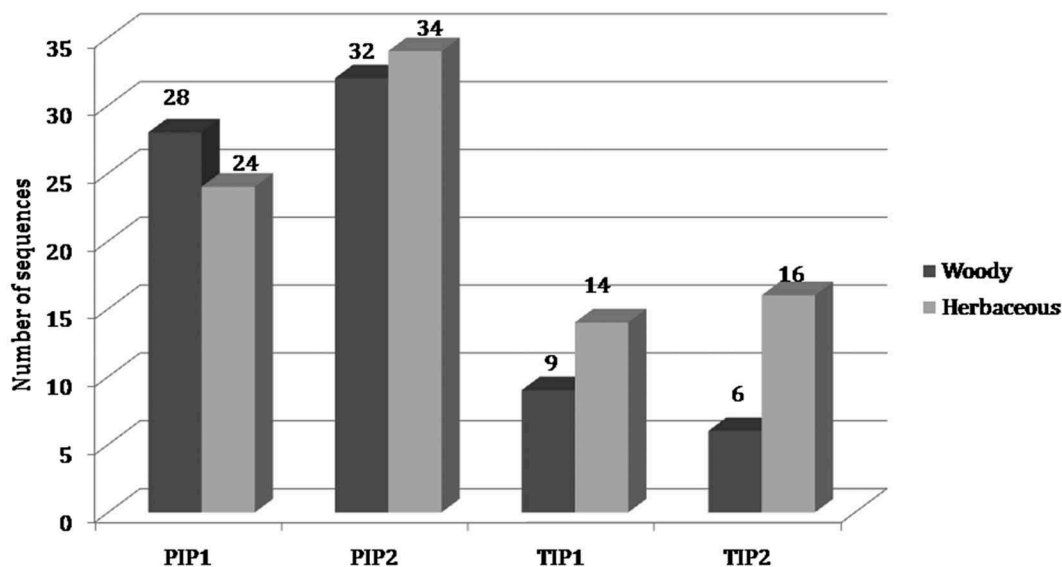


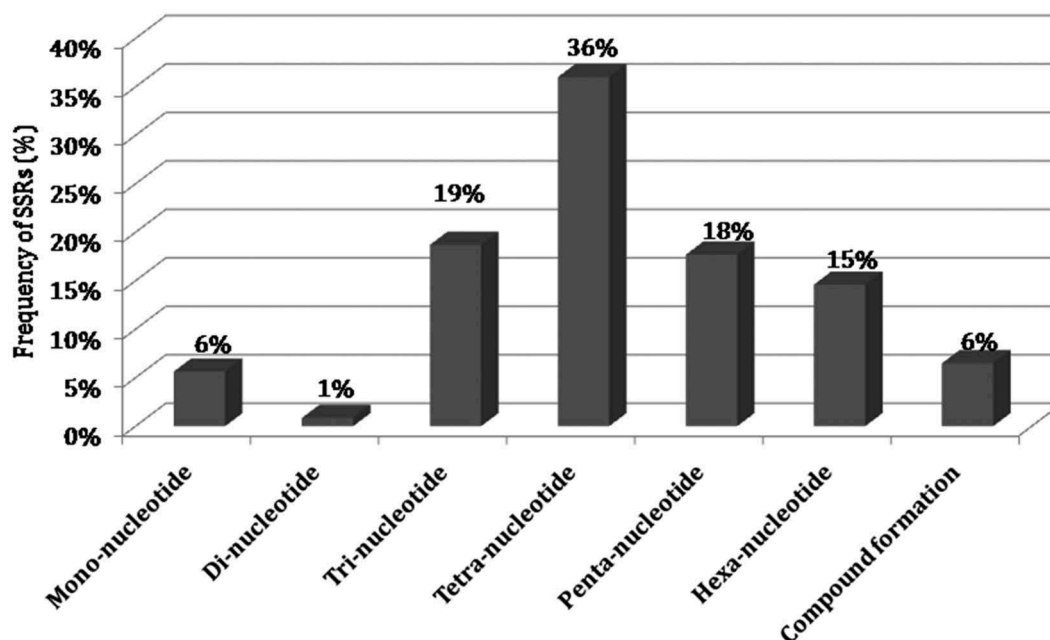
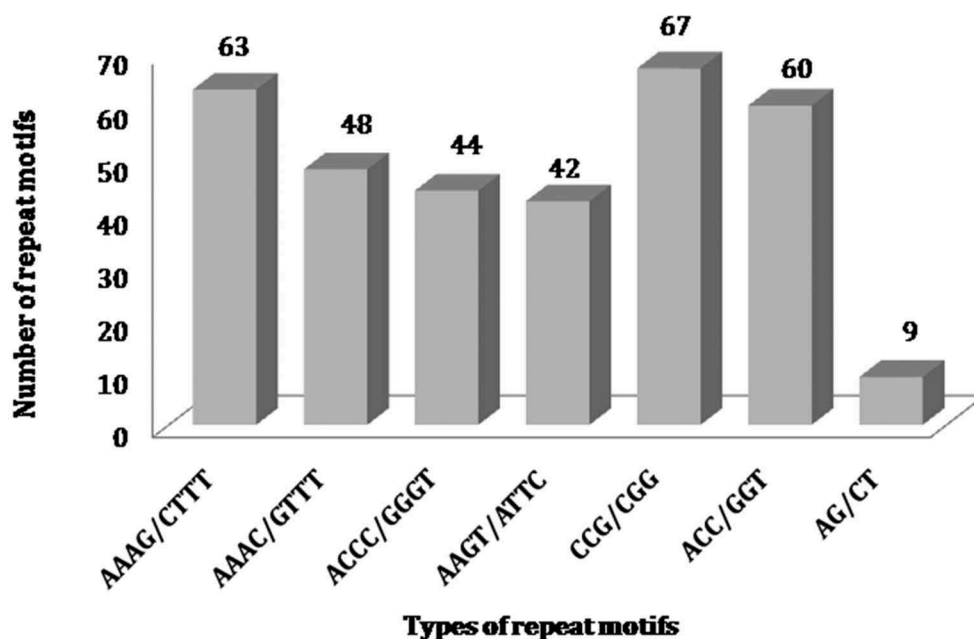
Figure 1. The number and type of aquaporin sequence in different species.

**Table 1.** Results of microsatellite search.

Total number of sequences examined	Total size of examined sequences (bp)	Total number of identified SSRs	Number of SSR containing sequences	Number of sequences containing more than 1 SSR	Number of SSRs present in compound formation
163	179696	1294	163	162	84

respectively (Figure 3, Table 2). For the same reason, AAAG and ACCC were the most common motif types detected in cucumber genomic data. For di-nucleotide repeats, AG/CT was the most

frequent with 1% (9) (Figure 3). Similar results were reported for *C. canephora*, wherein AG/CT was the most common motifs.<sup>38</sup> In monocots plants, the motifs CG/GC and CCG/CGG are the most abundant, whereas dicotyledonous plants have a low frequency.<sup>39,40</sup> In 5' and/or 3' UTR (untranslated) regions, dinucleotide repeats are the most abundant but occasionally produce in coding regions.<sup>41</sup> Parekh, Kumar, Zala, Fougat, Patel, Bosamia, Kulkarni and Parihar<sup>36</sup> proposed that the generation of informative markers based on EST-SSR is made from long motif SSRs, like tetra-nucleotide repeat motif, which appeared to be polymorphic in their study.

**Figure 2.** Frequency distribution of different SSR repeat type.**Figure 3.** Types and frequency of most common repeat motifs.

**Table 2.** Number and frequency of SSR from sequences of aquaporin gene.

	Class	Nombre of repeats (n)										Total	%	
		Repeats	2	3	4	5	6	7	8	9	10			> 10
Mon-o-nucleotide	A/T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	67	78	5,6%
Di-nucleotide	AC/GT	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	2	0,1%
	AG/CT	-	-	-	-	3	2	1	1	-	-	2	9	1%
Tri-nucleotide	AAC/GTT	-	10	-	-	1	-	-	-	-	-	-	11	0,8%
	AAG/CTT	-	23	5	1	-	-	-	-	-	-	-	29	2,1%
	AAT/ATT	-	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	7	0,5%
	ACC/GGT	-	57	1	1	1	-	-	-	-	-	-	60	4,3%
	ACG/CTG	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	0,6%
	ACT/ATG	-	11	6	-	-	-	-	-	-	-	-	17	1,2%
	AGC/CGT	-	11	2	2	-	-	-	-	-	-	-	15	1,1%
	AGG/CCT	-	25	1	-	-	-	-	-	-	-	-	26	1,9%
	AGT/ATC	-	20	3	2	1	-	-	-	-	-	-	26	1,9%
	CCG/CGG	-	64	3	-	-	-	-	-	-	-	-	67	4,8%
Tetra-nucleotide	AAAC/GTTT	42	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	48	3,5%
	AAAG/CTTT	60	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	63	4,6%
	AAAT/ATTT	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24	1,7%
	AACC/GGTT	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19	1,4%
	AACG/CTTG	15	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	1,3%
	AACT/ATTG	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	0,9%
	AAGC/CGTT	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	1,0%
	AAGG/CCTT	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	1,9%
	AAGT/ATTC	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42	3,0%
	AATC/AGTT	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	0,5%
	AATG/ACTT	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	1,2%
	AATT/AATT	17	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	1,3%
	ACAG/CTGT	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	1,5%
	ACAT/ATGT	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	1,4%
	ACCC/GGGT	44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	44	3,2%
	ACCG/CTGG	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	0,6%
	ACCT/ATGG	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	0,5%
	ACGC/CGTG	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	0,6%
	ACGG/CCTG	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	0,9%
	ACGT/ATGC	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	1,0%
	ACTC/AGTG	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	0,7%
	ACTG/ACTG	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0,3%
	AGAT/ATCT	7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	0,6%
	AGCC/CGGT	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	1,1%
	AGCG/CGCT	11	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	0,9%
	AGCT/ATCG	8	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	0,7%
	AGGC/CCGT	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,2%
	AGGG/CCCT	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	0,4%
	AGGT/ATCC	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0,3%
	AGTC/AGTC	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,2%
	CCCG/CGGG	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	0,8%
	CCGG/CCGG	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	1,2%
	(Pentanucleotide)		269	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	275
(Hexa-nucleotide)n		211	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	212	15,3%
Total		1004	257	25	6	6	3	2	1	11	69	1384		

### Design of SSR primers

The definition of primer pairs was made from the flanking sequences of SSRs. A total of 1120 primer pairs (for 85.8% of total SSR motifs) including the redundant were generated from the 1294 SSRs present in all sequences.

From the 1294 SSRs developed, there was a large proportion of primer pairs on tetra-nucleotide 37% (411), tri-nucleotide 19,9% (221), penta-nucleotide 18,9% (210) and hexa-nucleotide 16,1% (180) repeats, while compound (75), mono- (10) and di-nucleotide (5) repeats together represented less than 7% of the total primer pairs (Figure 4).

In all 1120 primer pairs flanking the SSR repeat patterns, only non-redundant primer were analyzed by a free program online (Multiple Primer Analyzer). After analyzing, only 735 non-redundant primer pairs that present the good characteristics, which may open the possibilities for marker assisted

selections. This molecular marker will be used for genetic studies such as identification and characterization genes associated with drought stress.

Further information on these 735 optimal SSR primer pairs designed for aquaporins is presented in Table 3, including primer sequence (forward and reverse) and their names, annealing temperature, % of CG, SSR repeat motifs, start and end of each primer and product size.

### Validation of the SSR primers

6 SSR primer pairs were selected, synthesized (Table 4), and tested by PCR on 3 genotypes of 4 species, Argan tree (*Argania spinosa* L.), Balanites (*Balanites aegyptiaca* L.), Wheat (*Triticum aestivum* L.), Shorgum (*shorgum bicolor* L.). After numerous optimizations of annealing temperature, all primers showed a generated right

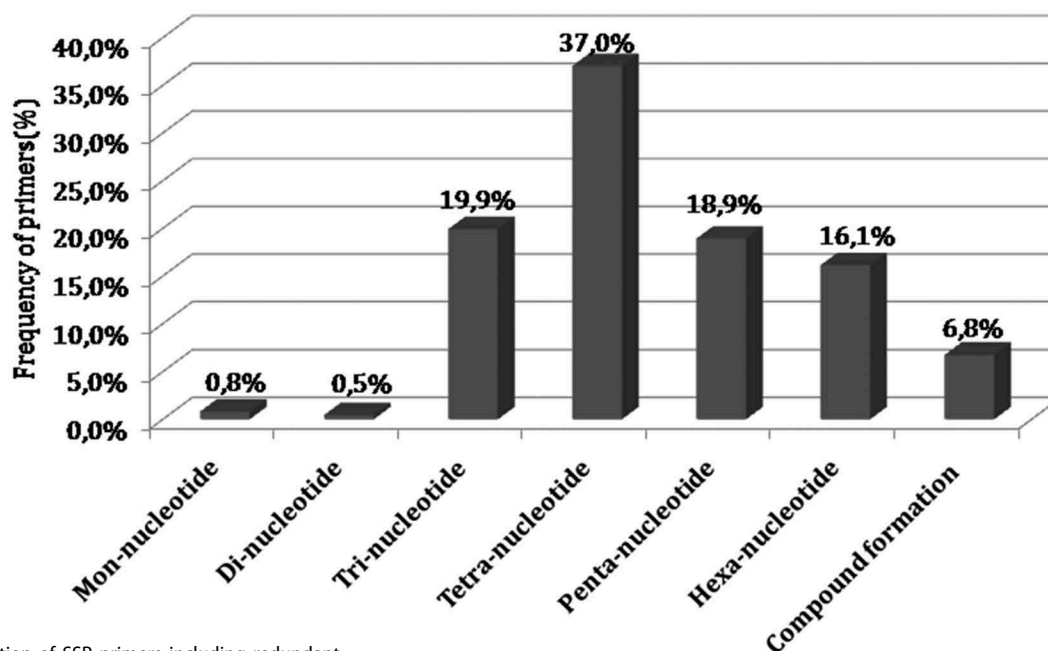


Figure 4. Distribution of SSR primers including redundant.

Table 3. Primer pairs selected for amplification.

Primer	Repeats	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (3'–5')	Tm °C	Product size (bp)
DT_1	(TTTG) 2	TGCTGAGGAAAAGAGCCATT	CATCCTCTTCCTTTCCCTCC	53	102
DT_2	(TTGT) 2	AAGAGCAGGGCTTAAGAGGG	CAAAGGTTGGAAACTGAAGCA	54	139
DT_3	(GGGAGT)2	GTCACCAACGGCCAGACTAC	AGACCAGTCCGAACGTCATC	57	100
DT_4	(CCAG) 2	GAGATCATCGGCACCTTTGT	GGCATGCTGCTTGTGTAGA	57	213
DT_6	(CCTT) 2	CATGGTCGTTTTACAGGGCT	TAGAAAACCGCCCTTGTGAG	53	262
DT_8	(GAAA)3	TTTCGAGTATCCAAAACCTCA	GATTCTTCACGGTTCCGA	53	119

and reproducible amplified product. After numerous optimizations of annealing temperatures, DT\_1, DT\_2, DT\_3, DT\_4 and DT\_6 primers showed a generated right and reproducible

amplified product. For DT\_8 no amplification was indicated. An example of amplification patterns obtained by DT\_1 and DT\_2 in different species was shown in Figure 5.

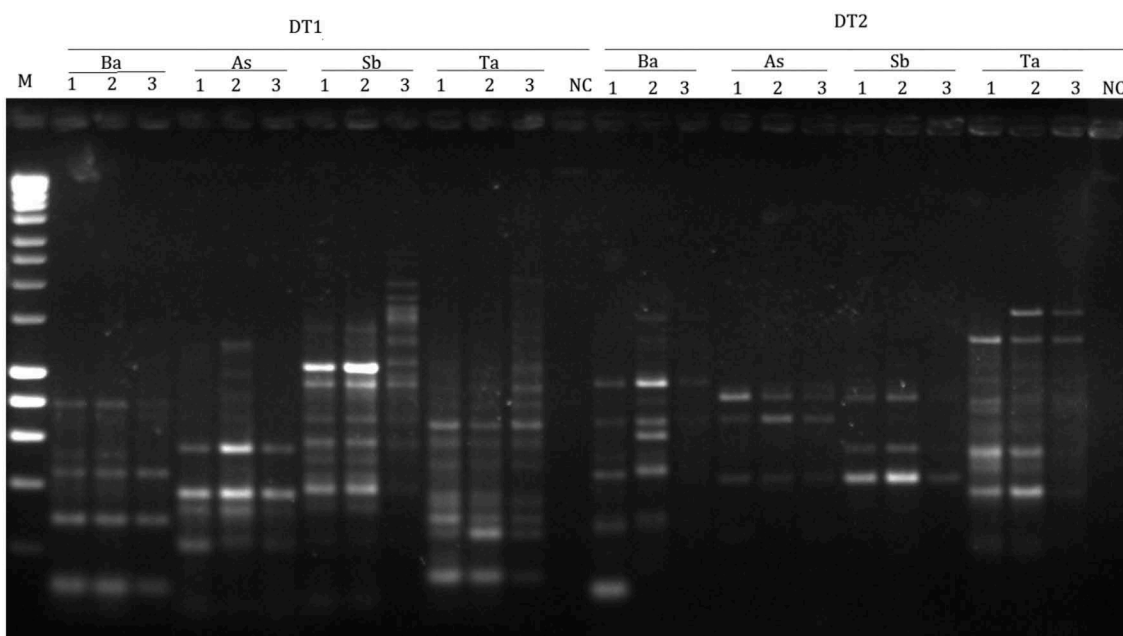


Figure 5. Band patterns amplified by SSR primers DT\_1 and DT\_2, on genomic DNA of 4 species. Lane M (Marker Molecular 1kp), Ba (*Balanites aegyptiaca* L.), Aa (*Argania spinosa* L.), Sb (*Shorghum bicolor* L.), Ta (*Triticum aestivum* L.), Lane NC (Negative Control).

Generally, SSRs are known by its specificity at locus and, therefore, it is expected that each amplification could yield one or two bands with SSR primer pair. However, in the present study, most of the primer pairs produced more than 2 bands. Generation of multiple bands can be explaining probably by duplication events in species genomes during its evolution history.<sup>42</sup> This suggests the non-use of these primers for diversity studies. However, we can use them for the eventual detection of “aquaporin” expression gene polymorphism and highlight the transferability of these markers in related species.

## Materials and methods

### In Silico detection of aquaporin sequences

Full length aquaporin sequences from several species including woody and herbaceous plants, were obtained from Genbank database (National Center for Biotechnology Information, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)) which were analyzed using BLAST tool to eliminate similar and redundancy sequences.

### SSR detection and development of primer pairs designing

The MISA (MicroSatellite) was used for detecting SSR in the aquaporin sequences based on criteria such as: minimum number of 2 repeats for tetra-, penta-, and hexa-nucleotide motifs, 3 repeats for tri-nucleotide motif, 6 repeats for dinucleotide motif and 10 repeats for mono-nucleotide motif. The primers flanking SSRs were designed using the primer3 with length of 18–27 pb, annealing temperature of 57–61°C, and GC content from 26 to 67%. All primers designed were checked for desired characteristics like hairpin structure, primer dimer using online tool, Multiple Primer Analyzer, ThermoFisher scientific (<http://www.thermofisher.com/ma/en/home.html>). The primers were named with prefix DAS (Drought\_Aquaporin\_SSR) followed by an order number.

### Evaluation of the SSR markers

In order to test the effectiveness of the SSR, some primer pairs were selected for testing of DNA accession from 4 species. To validate the SSR markers, genomic DNA was extracted from young leaves using ISOLATE Plant Mini Kit (Bioline, USA) following the manufacturer’s protocol.

Standard PCR was carried out in a reaction volume of 25 µl using MyTaq™ HS Mix (Bioline, USA) according to the manufacturer’s instructions. PCR amplification was performed by thermocycler gradient (Applied Biosystem® Veriti® Thermal Cycler) using the following profile: 95°C for 1 min, followed by 30 cycles of 95°C for 15 s, appropriate annealing temperature for 15 s, 72°C for 15 s, and a final extension at 72°C for 1 min. Amplified products were electrophoresed in 1.5% agarose gel.

## Conclusion

Here, we used a candidate gene approach to identify a set of SSR markers in plants genes for drought stress and design the

primer pairs associated with the markers developed. A total of 1294 microsatellites in 163 complete CDSs (coding sequences) of aquaporins in many species were identified, indicating all of sequences containing SSRs. The most abundant SSR was tetra-nucleotide (36%) repeat motif, and among all the tetra-nucleotide repeats, the motif AAAG/CTTT (4.6%) was the most abundant type. A total of 735 SSR primers were designed and selected with good criteria. From all SSR primers identified, 6 pairs of primers were selected and validated on 4 accessions genomic DNA. Five primers were given positive and reproducible results with a multi-band profile. These primer pairs may potentially serve as a new molecular marker, including polymorphism search for genes expressed in different species and highlight the transferability of these markers in related species. Thus, they may be used as markers of aquaporin genes in tolerance studies to dehydration plants and can also be employed in functional studies to mark the level of gene expression of these genes in new species.

## Acknowledgments

This work was realized in the framework of conducting the project ArganBiogen and funded by Hassan II Academy of Science and Technology (Morocco) and The Ministry of Higher Education, scientific Research and Professional Training Of Morocco.

## Compliance with ethics requirements

It is declared that this article is in entire compliance with the research ethics.

## ORCID

Karim Rabeh  <http://orcid.org/0000-0003-2147-6465>

Abdelkarim Filali-Maltouf  <http://orcid.org/0000-0002-2727-3389>

## References

1. Harb A, Krishnan A, Ambavaram MMR, Pereira A, Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiol.* 2010;154:1254–1271. doi:10.1104/pp.110.161752.
2. Bray EA, Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in Arabidopsis thaliana: an analysis using microarray and differential expression data. *Ann Bot.* 2002;89:803–811. doi:10.1093/aob/mcf104.
3. Hanana M, Deluc L, Fouquet R, Daldoul S, Leon C, Barrieu F, Ghorbel A, Mliki A, Hamdi S, [Identification and characterization of “rd22” dehydration responsive gene in grapevine (*Vitis vinifera* L.)]. *C R Biol.* 2008;331:569–578. doi:10.1016/j.crv.2008.05.002.
4. Maurel C, Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Lett.* 2007;581:2227–2236. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.021.
5. Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ, Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell.* 2005;97:749–764. doi:10.1042/BC20040133.
6. Knipfer T, Fricke W, Water uptake by seminal and adventitious roots in relation to whole-plant water flow in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot.* 2011;62:717–733. doi:10.1093/jxb/erq312.
7. Javot H, Maurel C. The role of aquaporins in root water uptake. *Ann Bot.* 2002;90:301–313.
8. Hachez C, Zelazny E, Chaumont F, Modulating the expression of aquaporin genes in planta: a key to understand their physiological

- functions? *Biochim Biophys Acta-Biomembranes*. 2006;1758:1142–1156. doi:10.1016/j.bbmem.2006.02.017.
9. Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H, An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. 2004;54:713–725. doi:10.1023/B:PLAN.0000040900.61345.a6.
  10. Galmés J, Pou A, Alsina MM, Tomás M, Medrano H, Flexas J, Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis sp.*): relationship with ecophysiological status. *Planta*. 2007;226:671–681. doi:10.1007/s00425-007-0515-1.
  11. Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P, Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol*. 2005;59:469–484. doi:10.1007/s11103-005-0352-1.
  12. Secchi F, Lovisolo C, Uehlein N, Kaldenhoff R, Schubert A, Isolation and functional characterization of three aquaporins from olive (*Olea europaea* L.). *Planta*. 2007;225:381–392. doi:10.1007/s00425-006-0365-2.
  13. Secchi F, Lovisolo C, Schubert A, Expression of OePIP2.1 aquaporin gene and water relations of *Olea europaea* twigs during drought stress and recovery. *Ann Appl Biol*. 2007;150:163–167. doi:10.1111/aab.2007.150.issue-2.
  14. Mahdiah M, Mostajeran A, Horie T, Katsuhara M, Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Physiol*. 2008;49:801–813. doi:10.1093/pcp/pcn054.
  15. Ayadi M, Cavez D, Miled N, Chaumont F, Masmoudi K, Identification and characterization of two plasma membrane aquaporins in durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum) and their role in abiotic stress tolerance. *Plant Physiol Biochem*. 2011;49:1029–1039. doi:10.1016/j.plaphy.2011.06.002.
  16. Venkatesh J, Yu J-W, Park SW, Genome-wide analysis and expression profiling of the *Solanum tuberosum* aquaporins. *Plant Physiol Biochem*. 2013;73:392–404. doi:10.1016/j.plaphy.2013.10.025.
  17. Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T, Santoni V, Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol*. 2008;59:595–624. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092734.
  18. Alexandersson E, Danielson JA, Rade J, Moparthi VK, Fontes M, Kjellbom P, Johanson U, Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *Plant J*. 2010;61:650–660. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04087.x.
  19. Luu DT, Maurel C, Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environ*. 2005;28:85–96. doi:10.1111/j.1365-3040.2004.01295.x.
  20. Tabin S, Kamili AN, Ganie SA, Zargar O, Sharma V, Gupta RC, Genetic diversity and population structure of *Rheum* species in Kashmir Himalaya based on ISSR markers. *Flora*. 2016;223:121–128. doi:10.1016/j.flora.2016.05.001.
  21. Tarang A, Gashti AB, The power of microsatellite markers and AFLPs in revealing the genetic diversity of Hashemi aromatic rice from Iran. *J Integr Agric*. 2016;15:1186–1197. doi:10.1016/S2095-3119(15)61221-7.
  22. Liu S, Yin X, Lu J, Liu C, Bi C, Zhu H, Shi Y, Zhang D, Wen D, Zheng J, et al., The first genetic linkage map of *Ricinus communis* L. based on genome-SSR markers. *Ind Crops Prod*. 2016;89:103–108. doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.063.
  23. Yu C, Yin Y, Creech DL, Lu Z, Xu J, Morphological characters and SRAP analysis of two hybrids between *Hibiscus dasyalyx* and *Hibiscus 'Moy Grande'*. *Sci Hortic*. 2016;198:118–124. doi:10.1016/j.scienta.2015.11.037.
  24. Zhang Y, Chen Y, Wang R, Zeng A, Deyholos MK, Shu J, Guo, H. Development of microsatellite markers derived from expressed sequence tags of polyporales for genetic diversity analysis of endangered polyporus *umbellatus*. *Biomed Res Int*. 2015;2015:941357.
  25. Pinto LR, Oliveira KM, Ulian EC, Garcia AA, de Souza AP, Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. *Genome/National Research Council Canada = Genome/Conseil National De Recherches Canada*. 2004;47:795–804. doi:10.1139/g04-055.
  26. Cavagnaro PF, Senalik DA, Yang L, Simon PW, Harkins TT, Kodira CD, Huang S, Weng Y. Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *BMC Genomics*. 2010;11:1–18. doi:10.1186/1471-2164-11-1.
  27. Sonah H, Deshmukh RK, Sharma A, Singh VP, Gupta DK, Gacche RN, Rana JC, Singh NK, Sharma TR, Xu Y, Genome-wide distribution and organization of microsatellites in plants: an insight into marker development in *>brachypodium*. *PLoS ONE*. 2011;6:e21298. doi:10.1371/journal.pone.0021298.
  28. Liu S-R, Li W-Y, Long D, Hu C-G, Zhang J-Z, Development and characterization of genomic and expressed SSRs in citrus by genome-wide analysis. *PLoS ONE*. 2013;8:e75149. doi:10.1371/journal.pone.0075149.
  29. Zou C, Lu C, Zhang Y, Song G, Distribution and characterization of simple sequence repeats in *Gossypium raimondii* genome. *Bioinformatics*. 2012;8:801–806. doi:10.6026/97320630008801.
  30. Jarvis DE, Kopp OR, Jellen EN, Mallory MA, Pattee J, Bonifacio A, Coleman CE, Stevens MR, Fairbanks DJ, Maughan PJ. Simple sequence repeat marker development and genetic mapping in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J Genet*. 2008;87:39–51.
  31. Cuc LM, Mace ES, Crouch JH, Quang VD, Long TD, Varshney RK, Isolation and characterization of novel microsatellite markers and their application for diversity assessment in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea*). *BMC Plant Biol*. 2008;8:1–11. doi:10.1186/1471-2229-8-1.
  32. Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG, Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*. 1995;7:1099–1111. doi:10.1105/tpc.7.7.1099.
  33. Ritschel PS, TCdL L, Tristan RL, Buso GSC, Buso JA, Ferreira ME, Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biol*. 2004;4:1–14. doi:10.1186/1471-2229-4-1.
  34. Benchimol LL, Campos Td, Carbonell SAM, Colombo CA, Chioratto AF, Formighieri EF, Gouvêa LR, LimaSouza AP. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. *Genet Resour Crop Evol*. 2007;54:1747–1762. doi:10.1007/s10722-006-9184-3.
  35. Xie C, Li B, Xu Y, Ji D, Chen C, Characterization of the global transcriptome for *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and development of cSSR markers. *BMC Genomics*. 2013;14:107. doi:10.1186/1471-2164-14-181.
  36. Parekh MJ, Kumar S, Zala HN, Fougat RS, Patel CB, Bosamia TC, Kulkarni KS, Parihar A, Development and validation of novel fiber relevant dbEST-SSR markers and their utility in revealing genetic diversity in diploid cotton (*Gossypium herbaceum* and *G. arboreum*). *Ind Crops Prod*. 2016;83:620–629. doi:10.1016/j.indcrop.2015.12.061.
  37. Kumari K, Muthamilarasan M, Misra G, Gupta S, Subramanian A, Parida SK, Chattopadhyay D, Prasad M, Jordan IK, Development of eSSR-markers in *Setaria italica* and their applicability in studying genetic diversity, cross-transferability and comparative mapping in millet and non-millet species. *PLOS ONE*. 2013;8:e67742. doi:10.1371/journal.pone.0067742.
  38. Hendre PS, Aggarwal RK, Development of genic and genomic SSR markers of robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre Ex A. Froehner). *PLOS ONE*. 2014;9:e113661. doi:10.1371/journal.pone.0113661.
  39. Wang Z, Yu G, Shi B, Wang X, Qiang H, Gao H, Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers based on RNA-sequencing of *Medicago sativa* and in silico mapping onto the *M. truncatula* genome. *PLOS ONE*. 2014;9:e92029. doi:10.1371/journal.pone.0092029.
  40. Wang Z, Li J, Luo Z, Huang L, Chen X, Fang B, Li Y, Chen J, Zhang X. Characterization and development of EST-derived SSR markers in cultivated sweetpotato (*Ipomoea batatas*). *BMC Plant Biol*. 2011;11:139. doi:10.1186/1471-2229-11-68.
  41. Varshney RK, Graner A, Sorrells ME, Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol*. 2005;23:48–55. doi:10.1016/j.tibtech.2004.11.005.
  42. Hu J-B, Zhou X-Y, Li J-W. Development of novel EST-SSR markers for cucumber (*Cucumis sativus*) and their transferability to related species. *Scientia Horticulturae*. 2010;125:534–538.

### III.1.3. Synthèse

Chez les plantes en générale, la réponse moléculaire est régie par tout un assortiment de gènes codant des protéines intrinsèques qui représentent environ 25% du génome (Stevens et Arkin, 2000), reflétant ainsi l'importance de cette classe de protéine. En effet, plusieurs gènes d'aquaporines, à l'échelle du génome, ont été fonctionnellement caractérisés et impliqués dans la réponse adaptative au stress hydrique chez diverses espèces végétales. Cependant, aucune information n'est disponible chez *Argania spinosa* L.

Lors du début de mes recherches dans le cadre de ma thèse, le génome de l'arganier n'était pas encore séquencé. Aussi, nous avons utilisé une approche gène candidat pour identifier des marqueurs SSR chez les plantes liées au stress hydrique afin de concevoir des paires d'amorces associées à ces marqueurs développés. La collecte des séquences des gènes a été faite sur plusieurs génomes de plantes qui nous a permis de créer une base de données de la famille des gènes AQP qui a servi aux analyses comparatives effectuées.

Dans ce travail, nous avons exploré et examiné l'abondance des microsatellites chez 163 séquences d'aquaporines provenant de plusieurs espèces de plantes (Annexe 1). Sur l'ensemble des séquences, les répétitions de type tétranucléotides étaient les plus abondantes (36%) suivies des suites tri-(19%), penta-(18%) et hexanucléotides (15%). Conformément à nos résultats, l'abondance relative des motifs tétra-nucléotidiques a été observée également chez différents génomes de plantes notamment la canne à sucre (61,3%) (Pinto *et al.*, 2004) et la vigne (54,7%) (Mojemmi et Rchok, 2010). En revanche, des études antérieures ont identifié que les motifs tri-nucléotides comme des répétitions géniques les plus fréquentes dans la plupart des espèces de plantes, notamment, *Faba bean* (44,86%) (Gong *et al.*, 2011) et *Pisum sativum* L (43,90%) (Gong *et al.*, 2010), tandis que d'autres études ont trouvé que ce sont les répétitions di-nucléotides qui étaient les plus abondantes, chez *Populus tomentosa* (59,7%) (Du *et al.*, 2013) et *Cucumis sativus* (45,97%) (Hu *et al.*, 2010). La variation de cette prédominance de motifs répétés peut s'expliquer par la source des séquences d'ADN (EST, ADNc ou séquences de gènes) envisagées dans chaque étude.

Parmi les motifs trinucleotidiques, le triplet CCG était le plus abondant avec une fréquence de 4,8 % suivi du triplet ACC avec 4,3 %. Ces résultats sont conformes avec une étude réalisée sur *Pyropia haitanensis* dans laquelle le motif CCG était la plus courante, représentant 60,07 % (Xie *et al.*, 2013). Quant aux tétranucléotides, les motifs AAAG, AAAC, ACCC et AAGT étaient les plus prédominants avec des fréquences de 4,6% (63), 3,5% (48), 3,2% (44)

et 3% (42), respectivement. De même, les AAAG et ACCC étaient les motifs les plus couramment détectés dans le génomique du concombre (Hu *et al.*, 2010).

Afin d'exploiter les SSR identifiés comme marqueurs moléculaires, plus de 700 paires d'amorces ont été conçues pour l'ensemble des SSR identifiés (Annexe 2). Nous nous sommes intéressés aux amorces flanquant les motifs tétra-nucléotidique (288 paires d'amorces) vu leurs fréquences élevées. Sur l'ensemble des amorces développées, seules 15 couples d'amorces choisies au hasard ont fait l'objet d'une validation au laboratoire sur quatre espèces différentes (Argan, Balanite, Blé et Shorgo). Suite aux différentes optimisations du protocole d'amplification, 6 amorces générant de bandes polymorphes et une bonne reproductibilité ont été retenues.

L'inventaire exhaustif des marqueurs SSR dans la présente étude démontre le potentiel de l'approche bio-informatique pour le développement rapide de marqueurs microsatellites pour les analyses génétiques et autres applications chez les plantes. Par ailleurs, nos résultats peuvent avoir des implications importantes non seulement dans la recherche du polymorphisme de gènes aquaporines exprimés de tolérance à la déshydratation chez différentes espèces, mais aussi dans des études fonctionnelles pour marquer le niveau d'expression génique de ces gènes. Également, il serait utile de mettre en évidence la transférabilité de ces marqueurs chez d'autres espèces apparentées.

Suite à la disponibilité du draft du génome d'arganier en ligne, il serait intéressant de passer par une validation *in silico* afin de vérifier la présence de toutes les amorces SSR identifiées et leur localisation en les confrontant avec le génome d'arganier grâce à l'outil Blast.

## **III.2. Analyse *in Silico* de la famille de gène Antiporteur (NHX) sur la base du génome d'arganier**

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans le journal *Current Protein & Peptide Science* en 2021.

### **III.2.1. Contexte**

Dans les zones arides et semi-arides du bassin méditerranéen, la faible disponibilité en eau et la salinité représentent les principaux facteurs limitant la croissance des plantes ainsi que la production agricole. Le Maroc, qui offre toutes les variantes du climat méditerranéen, n'échappe pas à ce phénomène, où la sécheresse observée depuis longtemps a clairement conduit au processus de salinisation des sols. Cette dernière provoque un déséquilibre ionique aggravant l'ensemble des activités métaboliques (Wu *et al.*, 2019). Les plantes réagissent au déséquilibre ionique de manière coordonnée principalement par le maintien de l'homéostasie ionique en régulant l'afflux/l'efflux des ions excessifs à savoir l'accumulation et la compartimentation des ions toxiques (Khare *et al.*, 2015). Il est bien connu que les antiporteurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHX), situés sur la membrane plasmique et le tonoplaste, jouent un rôle central dans le maintien de l'homéostasie du  $\text{Na}^+$  en le transportant du cytoplasme vers les espaces extracellulaires ou les vacuoles (Pehlivan *et al.*, 2016). Malgré les rôles critiques des antiporteurs NHX pour les plantes, les analyses fonctionnelles et systématiques de la famille NHX chez l'arganier (*Argania spinosa* L.) n'ont pas encore été étudiées.

Dans le présent travail, une recherche bibliographique exhaustive a été menée afin de mettre en évidence l'histoire évolutive de cette famille de gènes, sa fonction, sa structure, son importance et ses applications biotechnologiques dans l'amélioration de tolérance aux conditions de stress salin chez un large éventail d'espèces végétales. En parallèle, nous avons mené un cas d'étude sur le « draft » du génome de l'arganier en adoptant une approche *in silico* en vue de prédire et d'identifier des gènes antiporteurs (NHX) sur la base du génome d'arganier récemment séquencé (Khayati *et al.*, 2018). Aussi, diverses caractéristiques des gènes NHX sur le génome de l'arganier ont été analysées, notamment leurs domaines conservés, leurs structures géniques et leurs relations phylogénétiques. Notre étude constitue une référence pour la vérification fonctionnelle la plus poussée des gènes NHX chez l'espèce *Argania spinosa* L.

## REVIEW ARTICLE

# Plant NHX Antiporters: From Function to Biotechnological Application, with Case Study

Rabeh karim<sup>1</sup>, Belkadi Bouchra<sup>1</sup>, Gaboun Fatima<sup>2</sup>, Filali-Maltouf Abdelkarim<sup>1,\*</sup> and Sbabou Laila<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Team of Microbiology and Molecular Biology, Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment Research Center, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, B.P. 1014 RP, Morocco; <sup>2</sup>Plant Breeding Unit, National Institute for Agronomic Research, Regional Center of Rabat, B.P. 6356-Rabat-Instituts, Morocco

**Abstract:** Salt stress is one of the major abiotic stresses that negatively affect crops worldwide. Plants have evolved a series of mechanisms to cope with the limitations imposed by salinity. Molecular mechanisms, including the upregulation of cation transporters such as the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters, are one of the processes adopted by plants to survive in saline environments. NHX antiporters are involved in salt tolerance, development, cell expansion, growth performance and disease resistance of plants. They are integral membrane proteins belonging to the widely distributed CPA1 sub-group of monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporters and provide an important strategy for ionic homeostasis in plants under saline conditions. These antiporters are known to regulate the exchange of sodium and hydrogen ions across the membrane and are ubiquitous to all eukaryotic organisms. With the genomic approach, previous studies reported that a large number of proteins encoding Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter genes have been identified in many plant species and successfully introduced into desired species to create transgenic crops with enhanced tolerance to multiple stresses. In this review, we focus on plant antiporters and all the aspects from their structure, classification, function to their *in silico* analysis. On the other hand, we performed a genome-wide search to identify the predicted NHX genes in *Argania spinosa* L. We highlighted for the first time the presence of four putative NHX (AsNHX1-4) from the Argan tree genome, whose phylogenetic analysis revealed their classification in one distinct vacuolar cluster. The essential information of the four putative NHXs, such as gene structure, subcellular localization and transmembrane domains was analyzed.

## ARTICLE HISTORY

Received: July 16, 2020  
Revised: August 17, 2020  
Accepted: September 06, 2020

DOI:  
10.2174/1389203721666201103085151

**Keywords:** Salt stress, plants, NHX antiporters, *In silico* analysis, *Argania spinosa* L.

## 1. INTRODUCTION

Plants are generally exposed to different natural environmental factors. Salinity is one of the major abiotic stresses that is increasing every year in many areas of the world. To overcome the high level of salinity in the soil, plants prevent the accumulation of excessive Na<sup>+</sup> with special protein channels termed Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. The former is responsible for counter-transport of sodium and hydrogen and therefore play a major role in salinity tolerance [1, 2]. Plant Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters are found to be omnipresent in all sequenced eukaryotic plants [3, 4] and were conserved across various evolutionary lineage indicating their key role in the organisms survival [5].

In plants, these proteins are involved in various physiological processes such as cell expansion, regulation of the cell volume, potassium homeostasis, cellular pH regulation, membrane trafficking, protein processing, and salt tolerance

[6-8]. To minimize excessive accumulation of Na<sup>+</sup> in the cytoplasm, plants use two types of NHX genes for Na<sup>+</sup> compartmentalization: i) Those that code for vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters located on the tonoplast, and ii) those that code for plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters localized in various endosomal compartments of plant cells [9].

In 1976, Ratner and Jacoby identified the first NHX in barley root tips [10], followed by the discovery of NHX1 in *Arabidopsis thaliana* [11]. Through DNA sequencing technologies together with bioinformatics and ‘omics’ studies, it was possible to identify a large number of NHX genes in various plant species. In addition, these technologies have helped to better understand the mechanisms of tolerance to different stress conditions [12]. For the past recent years, there are a growing number of studies reporting the isolation of sodium/hydrogen antiporters (NHX) from different plants and the contribution of these antiporters in salt stress tolerance using transgenic plants [13].

In the current review, the diversity of the functions, origins, and classification of plant NHXs is reported. Also, the isolation of NHX genes and their expression in a wide range of plant species under abiotic stresses, specifically salt

\* Address correspondence to this author at the, Department of Biology, Faculty of Science, Mohammed V University, Av. Ibn Batouta, B.P. 1014 Rabat, MOROCCO; E-mails: [filalimaltouf@gmail.com](mailto:filalimaltouf@gmail.com), [a.filalimaltouf@gmail.com](mailto:a.filalimaltouf@gmail.com)

stress, has been discussed. Additionally, we highlighted the essential role of genome-wide analysis studies for understanding the function of gene families in plants. Furthermore, we analyzed the NHX gene family in the first draft of Argan genome to identify antiporter encoding gene in *Argania spinosa* L., then explored their evolutionary relationship. We also investigated the exon–intron organization, subcellular localization and the conserved domain of NHX genes.

## 2. NHXS GENES FAMILY: ORIGIN, DIVERSIFICATION, STRUCTURE AND FUNCTION

### 2.1. NHXs Origin and Diversification

To date, many ion channels and transporters have been shown to play a crucial role in maintaining living cells' homeostasis. The Cation/Protons antiporters (CPAs) that mediate the exchange of monovalent cations, mainly Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, with one or two protons across the membrane are one of the main ion channels and transporters. These antiporters belong to two major families, CPA1 and CPA2 [4, 14]. CPA1 family consists of two clades, NHX and NHE (sodium-proton exchanger) transporters while CPA2 includes K<sup>+</sup> efflux antiporter (KEA) and Cation/H<sup>+</sup> (CHX) families [5, 15].

Based on the phylogenetic analysis, the plant CPA1 transporters have 10 to 12 membrane-binding domains that have evolved from the ancestral NhaP (sodium-proton antiporter) gene in prokaryotes [4, 5]. According to the subcellular localization of these transporters, the CPA1 family comprises two main groups with well-characterized antiporter proteins associated with salt tolerance in plants [4, 16–18]. The first group involved in the compartmentalization of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> at the vacuole level, contains intracellular proteins, while the second group of plasma-membrane-bound proteins, is responsible for efflux from the cell [3, 7]. Both groups represent examples of two different paths in the molecular evolution of stress tolerance. A previous study on the evolution of two monovalent cation/proton exchangers covering a wide range of plants (33 different species) showed that NHX and SOS1 genes families have undergone purifying selection and that SOS1 has undergone neo-functionalization [19].

The NHX family members are omnipresent in all kingdoms, from prokaryotic to eukaryotic [3, 4]. Two classes of plant NHXs have been characterized to date. The Class I (NHX1) is located in the vacuole membrane and the Class II is localized in various endosomal compartments of plant cells [4]. AtNHX1 was cloned from *Arabidopsis thaliana* as an ortholog of *Saccharomyces cerevisiae* ScNHX1 and was the first characterized plant NHX transporter [11]. In addition, the first described endosomal NHX proteins in plants are LeNHX2 from *lycopersicon esculentum* as well as AtNHX5 and AtNHX6 from *A. thaliana* [20].

Since then, with the emerging plant genome sequencing, several similar orthologs of NHXs in *Arabidopsis* were subsequently cloned and found to be involved in salt tolerance in various species [3]. Up to 2013, the genes encoding Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters (NHX) were identified and cloned from more than 60 plant species including gymnosperms and an-

giosperms (dicotyledonous and monocotyledonous) [21]. Most of these NHX appear to have multiple isoforms, containing representative members [plasma membrane SOS1 like, vacuolar NHX1 like, and endosomal NHX5/6 like] [5, 6]. The *Arabidopsis thaliana* genome contains eight NHX members that are divided into three groups based on their subcellular localization. Six of them are intracellular (AtNHX1–6) localized either at the vacuole (AtNHX1–4) or at the endosomes (AtNHX5–6) and an additional two more divergent members (AtNHX7/SOS1 and AtNHX8) at the plasma membrane (PM) [8]. *Arabidopsis* NHX gene has shown differential expression patterns in different tissues and responsiveness to various abiotic stresses [22, 23]. The expression patterns of AtNHX1, AtNHX2 and AtNHX3 are induced by salt stress and ABA (Abscisic Acid) [23, 24]. The expression levels of AtNHX1 and AtNHX2 were significantly up-regulated in all plant tissues, while transcript of AtNHX3 and AtNHX4 were constitutively expressed in root and flower tissues, respectively. AtNHX5 was also expressed in all tissues with lower levels; whereas the expression of AtNHX6 was detected only in roots and shoots [22, 23].

Vacuolar NHX1 is one of the most studied transporters due to its vital role in plant development and salinity tolerance. Both AtNHX1 and AtNHX2 are required for vacuolar pH control and K<sup>+</sup> uptake, regulate growth, floral development and reproduction [25, 26]. Also, it has been reported that AtNHX1 and AtNHX2 are involved in salt acclimation [27], osmotic adjustment [28], and stomatal regulation [29]. Bassil *et al.* [20], demonstrated that endosomal AtNHX5 and AtNHX6 have crucial roles in plant growth and cell proliferation.

To date, several sodium/hydrogen isoform antiporters have been investigated in various plant species and some of the prominent studies on the expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene family in a wide range of species are summarized in Table (1).

### 2.2. Structure of Na/Hydrogen Antiporters

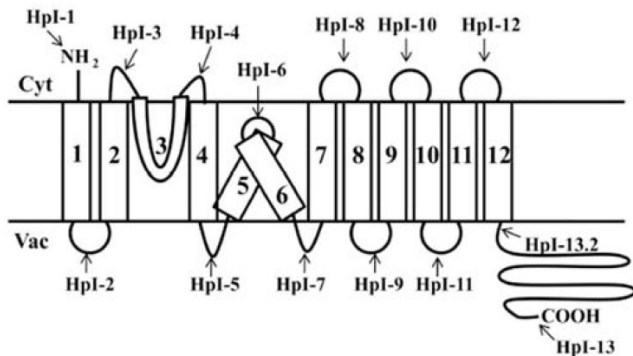
Yamaguchi *et al.* [30], and Wakabayashi *et al.* [31], confirmed that no crystallographic structures for animal NHEs, yeast or plant NHXs are available. However, other studies have contributed to the understanding of NHE and NHX-like topology. Indeed, biochemical and kinetic analyses suggested that NHXs likely contain 9 to 12 transmembrane (TM) domains [30]. Several NHX features indicate a domain organization similar to NHE isoform, suggesting that structural features are conserved across the families [6].

The first analysis of the topology of NHE1 was elucidated [32] using cysteine scanning mutagenesis. The authors suggested 12 transmembrane segments (TM) with the N- and C- terminal being located at the cytosol. These results were admitted until a computational model based on the structure of NahA was suggested as a template [33]. The crystal structure of NahA contained two groups of TM each having three TM bundles [34]. All NHE antiporters conserve a putative Amiloride binding domain (LFFIYLLP-PI) which inhibits the transport activity of the NHE protein [35, 36].

**Table 1. Distribution and classification of NHX in some plants species.**

Species	Family	High Group	NHXs			References
			Vac	Endo	PM	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	Dicot	4	2	2	[4]
<i>Populus trichocarpa</i>	Salicaceae	Dicot	5	1	2	[91]
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solanaceae	Dicot	3	1	1	[8]
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Dicot	7	2	1	[3]
<i>Medicago truncatula</i>		Dicot	6	1	0	[91]
<i>Glycine max</i>		Dicot	8	3	1	[91]
<i>Zea mays</i>	Poaceae	Monocot	6	2	1	[8]
<i>Brachypodium distachyon</i>		Monocot	4	2	2	[91]
<i>Oryza sativa</i>		Monocot	4	2	1	[91]
<i>Sorghum bicolor</i>		Monocot	4	1	2	[92]
<i>Beta vulgaris</i>	Chenopodiaceae	Dicot	3	1	1	[90]
<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	Dicot	5	2	1	[91]
<i>Eucalyptus grandis</i>	Myrtaceae	Dicot	6	2	2	[91]
<i>Morusatropurpurea</i>	Moraceae	Dicot	5	1	1	[93]

Yamaguchi *et al.*, (2003) suggested a topologic model of vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (AtNHX1) in *A. thaliana* by using yeast as a heterologous expression system (Fig. 1). This study showed that this antiporter is composed of 9 transmembrane segments linked with hydrophilic C-terminal domain and three hydrophobic regions. Hydrophobic domain TM3 contains a putative Amiloride binding domain while, TM5 and TM6 contain residues that are likely involved in N<sup>+</sup> or H<sup>+</sup> binding and transport, would not across the membrane [30].

**Fig. (1).** Proposed topological model of AtNHX1.

A topological comparison between human NHE1 and *Arabidopsis thaliana* NHX1 indicates that they are very similar in terms of transmembrane domains with an opposite transport ion direction. In humans, the NHE1 activates the entry of sodium and the extrusion of protons from cytosol, while AtNHX1 mediates the Na<sup>+</sup> influx from cytosol and H<sup>+</sup> efflux to cytosol [30]. The TM segments corresponding to the TM1, TM2, TM10 and TM12 regions of AtNHX1 have the similar properties as the orthologue regions of NHE1, corresponding to TM2, TM3, TM11 and TM13 respectively. For TM4, TM7, and TM8 of AtNHX1 (TM5, TM8, and TM9 of

NHE1) are inverted into the membrane. As the crystal, structures of eukaryotic antiporters have not yet been determined and no three-dimensional structure of the NHX vacuolar antiporter has yet emerged.

### 2.3. Function of NHX Antiporters

Plant adaptation to high salinity requires regulation strategies of the ion and pH homeostasis. Potassium (K<sup>+</sup>) and sodium (Na<sup>+</sup>) monovalent inorganic cations are among the most abundant elements present in the soil and play an essential role for all living organisms [6]. Their physico-chemical properties are very similar. Potassium is generally used by plants, whereas sodium is a principal component of the deleterious effects associated with salinity stress [7].

The NHX antiporters (also known as NHX-type cation/H<sup>+</sup> antiporters) appear to be particularly important for the Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> movement and the regulation of a wide variety of physiological processes, including salt tolerance, vesicle trafficking, pH regulation, K<sup>+</sup> homeostasis, protein transport and growth/development [6-8, 37].

#### 2.3.1. Salt Tolerance and K<sup>+</sup> Homeostasis

Several studies have shown the fundamental role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter proteins in the tolerance to salt stress and their potential use for genetic engineering. Constitutive over expression of NHX genes appears to increase salt tolerance of various plant species. Besides their major role in reducing the toxicity of Na<sup>+</sup> concentration in cytoplasm, NHX genes are one of the predominant vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters<sup>38</sup>. To date, numerous studies have reported the ability to enhance salinity stress tolerance by introducing vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter genes in plants' genome. For example, the expression of TaNHX2 gene from wheat *Triticum aestivum* enhances salt stress tolerance in crop plant varieties, such as *Solanum melongena* [39], *Capsicum annuum* [40], *Medicago sativa* [41] *Solanum lycopersicum* [42], and *Glycine max* [43]. In

other studies, the over-expression of AtNHX1 induced salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [27], tomato [44] and grapes [45], similar to over expression in VvNHX1 in *Solanum tuberosum* [46].

High tolerance to salt stress was not always related to an increased vacuolar Na<sup>+</sup> accumulation [6, 47]. However, based on their specificity and affinity, NHX proteins were suggested to contribute to K<sup>+</sup> homeostasis under normal growth conditions [48-50]. Previous reports demonstrated that the characterized NHX members can transport both K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in numerous species with different possible scenarios. Effectively, eggplant and tobacco show higher K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> concentrations [39, 51] while *Arabidopsis* and buckwheat show lower K<sup>+</sup> and higher Na<sup>+</sup> accumulation [27, 52]. In *Aeluropus littoralis* and *Solanum lycopersicon*, higher K<sup>+</sup> and lower Na<sup>+</sup> contents are observed [44, 53]. In contrast, some endosomal/vesicular NHX may preferentially transport K<sup>+</sup> compared to Na<sup>+</sup>. Indeed, the study revealed that AtNHX1 mediated the potassium compartmentation in the vacuole of transgenic tomato [24]. In grapes, high VvNHX1 expression during veraison stage was significantly up-regulated with an increase in vacuole K<sup>+</sup> accumulation<sup>54</sup>. The major role of plant NHXs in the regulation of K<sup>+</sup> and pH homeostasis has been demonstrated *via* genetic studies in different plants [6, 25]. For example, in *Arabidopsis*, the nhx1 null mutants displayed a reduced antiporter activity that was correlated with smaller cells, smaller leaves, and other developmental irregularities. These effects may be associated with altered K<sup>+</sup> homeostasis [26].

Growth retardation is reduced by a knockdown of LeNHX2 in tomato, while the knockout of nhx5/nhx6 alters cell size, floral development and root growth in the case of *Arabidopsis* [25]. Vacuolar K<sup>+</sup> content in the nhx1/nhx2 double mutants in *Arabidopsis thaliana* is greatly reduced, supporting the role of these antiporters in mediating K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger [20].

### 2.3.2. pH Regulation and Vesicles Trafficking

pH homeostasis is essential for plant growth and stress responses, and their regulation of endomembrane organelles is crucial for functional protein trafficking in eukaryotic cells [55].

The luminal pH of all eukaryotic cells is not homogeneous, but appears to be maintained depending on the intracellular compartment and becomes gradually more acidic, ranging from pH 7.1 in the endoplasmic reticulum (ER) to pH 5.2 in the vacuole [56, 57]. This gradual acidification of compartments along endocytic and secretory pathways in animals is important for protein sorting and vesicle trafficking, and accomplished by the activity of the vacuolar ATPase (V-ATPase). In addition to the V-ATPase, plants have a second endomembrane pump, the vacuolar pyrophosphatase (V-ATPase) [58].

The NHX family of Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchangers is particularly important for the maintenance of pH and has been in-

involved in a vast variety of physiological processes [6, 8]. They operate through the activity of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases pumping protons (H<sup>+</sup>) into the endomembrane lumen, and counter-action by cation/proton exchangers [55].

A clear proof of the role of NHX genes in vacuolar pH regulation was provided by studies of morning glory (*Ipomea*) flower petal pigmentation.

During the opening of the flowers, *Ipomea* changes the color of petals from red (at low pH) to blue as pH increases due to the accumulation of anthocyanin in vacuole. During this color transition, the pH in petal vacuoles increases from 6.6 to 7.7 along with an increase of V-ATPase, V-PPase activities [59, 60]. In nhx1 mutants of *Ipomea*, the change of pH and the parallel change in color was partial and may depend on another abundantly expressed isoform, InNHX2 [61]. In addition, the insertion of a transposable element in the InNHX (*Ipomoea nil*) gene, partially inhibits vacuolar alkalization and consequently, the color of the flower changes [59, 62].

Given the crucial role for plant growth and development, vesicular trafficking is an important cellular process that depends on numerous molecular players and biochemical and biophysical factors [63, 64]. Additionally, vesicular trafficking plays a significant role in protein sorting, signal transduction and development, pathogen response and abiotic stresses [65-67].

In plant cells, the membrane trafficking system is highly organized and there are three major trafficking pathways in the cells: the biosynthetic secretory pathway, the endocytic pathway and the vacuolar transport pathway. In the biosynthetic secretory pathway, the newly synthesized proteins are transferred from the Endoplasmic Reticulum (ER) to the plasma membrane and/or extracellular space. In the endocytic pathway, proteins (cargo) are internalized at the PM transported to the endosomal compartment. During the vacuole transport pathway, the newly synthesized proteins are delivered to the vacuole [68].

The plant trafficking mechanism is highly conserved, and all trafficking pathways share similar trafficking and fusion machinery with other eukaryotic organisms [63].

Previous studies on yeast, animals and plants demonstrated that NHX genes are involved in membrane trafficking [69, 70] and vacuolar fusion [71]. The first vesicle trafficking was reported by Browers and colleagues [70] in yeast Scnhx1p. It is a Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter localized to endosomal/vacuole compartment, and it is crucial in salt and osmotic tolerance and compartmental pH regulation [72, 73].

Later, Reguera and colleagues (2015) showed that nhx5/nhx6 mutant in plants is essential to maintain the endomembrane luminal pH [74]. Similarly, other studies showed the same role in vesicular trafficking using null mutants lacking both class II *Arabidopsis* antiporters Atnhx5/Atnhx6 [20, 74]. In addition, it is indicated that endosomal NHX-type antiporters are critical regulators of endosomal trafficking, by the involvement of AtNHX1 in vesicle

trafficking, which might help plant in adaptation to salt stress tolerance [75]. Differential expression of numerous gene encoding proteins related to intra-vesicular trafficking, trafficking to the nucleus and Golgi processing has been investigated using the transcriptional profile analysis of Arabidopsis nhx1 mutant [76].

### 3. PROGRESS TOWARDS NHX GENES FOR ABIOTIC STRESS

To improve plant salinity tolerance, many approaches have been adopted to better understand how plants perceive and respond to salinity stress. Through both forward and reverse genetics approaches on a genome-wide scale, plant scientists gained the opportunity to characterize, identify and discover many genes related to salt tolerance in various model and non-model plant species.

Several membrane SOS1 and vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHX) genes were isolated and identified from different species such as Arabidopsis [77, 78], rice [62, 79], tomato [80], poplar [81] and various other plant species. The isolated genes from target plants helped enhance salt tolerance and growth improvement in other plants using genetic engineering (transgenic technology). The number of transgenic plants with antiporter genes has sharply increased and expected to increase more in the future [13, 82].

The NHX genes, particularly the vacuolar antiporters, characterized in both species *A. thaliana* and *T. aestivum* are the genes that contribute the most in the salt tolerance improvement in dicotyledonous as well as in monocotyledonous species Table (2). For instance, two recent studies reported that over-expression of wheat TaNHX2 gene in both transgenic sunflower and eggplants conferred tolerance and a high growth performance with high contents of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> in leaves and roots under salt stress (200 mM NaCl) compared with the non-transformed plants [39, 83]. Additionally, transgenic eggplant revealed high antioxidant enzymatic activities and photosynthetic parameters [39]. In other studies, transformed fruits, legumes and cereals with AtNHX from *Arabidopsis thaliana*, especially AtNHX1, also showed salt and drought stress tolerance compared to the non-transgenic plants Table (2).

*Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* are the most important species used in transgenic biotechnologies Table (2). A recent study revealed that the over-expression of vacuolar NHX gene from halophyte (*Kosteletzkya virginica*) improved salt tolerance in Arabidopsis [84]. Similarly, KvNHX1 from halophyte in transgenic tobacco resulted in higher antioxidant enzyme activities and accumulation of more proline, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in the leaves than the wild type85. The transgenic over expressions of a range of plants with membrane (SOS) and vacuolar (NHX) genes are presented and summarized in Table (2).

**Table 2. Detail of important antiporter genes isolated from numerous species and their over-expression in other plants species.**

Genes	Isolated From	Over-expression In	Tolerance	References
AtNHX1	<i>A. thaliana</i>	Arabidopsis	Salt	[27]
AtNHX1		Brassica		[94]
AtNHX1		Tomato		[53]
AtNHX1		Wheat		[95]
AtNHX1		Maize		[96]
AtNHX1		Cotton		[97]
AtNHX1		Sugar beet		[98]
AtNHX1		Rice		[99]
AtNHX1		Festuca		[100]
AtNHX1		Buckweat		[52]
AtNHX3		<i>Beta vulgaris</i>		[101]
AtNHX1		Tobacco		[102]
AtNHX1		Peanut		[103]
AtNHX1		Poplar		[104]
AtNHX1		Kiwifruit	[105]	
AtNHX5		<i>B. papyrifera</i>	Salt, drought	[106]
AtNHX3		<i>Arachis hypogaea</i>		[107]
AtNHX5		Rice		[108]

(Table 2) contd....

Genes	Isolated From	Over-expression In	Tolerance	References	
TNHX1	<i>T. aestivum</i>	Arabidopsis	Salt, drought	[109]	
TaNHX2		Soybean	Salt	[43]	
TaNHX2		Rice		[110]	
TaNHX2		Alfalfa		[111]	
TaNHX2		Tomato		[42]	
TaNHX3		Tobacco		[112]	
TaNHX2		<i>Capsicum annuum</i>		[40]	
TaNHX2		Eggplant		[39]	
TaNHX3		Tobacco		[112]	
TaNHX2		Sunflower		[83]	
DmNHX1		<i>D. morifolium</i>		<i>N. benthamian</i>	[113]
PgNHX1		<i>P. glaucum</i>		<i>Brassica juncea</i>	[114]
PgNHX1	Rice			[115]	
OsNHX1	<i>O. sativa</i>	Rice	[116]		
OsNHX1		Rice	[99]		
OsNHX1		Ryegrass	[117]		
IbNHX2	<i>I. batatas</i>	Sweet potato	Salt, drought	[118]	
AINHX	<i>A. littoralis</i>	Tobacco	Salt	[44]	
AINHX1		Soybean		[119]	
SbsSOS1	<i>S. brachiata</i>	Tobacco	[120]		
SeNHX1	<i>S. europaea</i>	Tobacco	Salt, disease	[121]	
SeNHX1		Alfalfa	[122]		
HcNHX1	<i>H. caspica</i>	Arabidopsis	[123]		
KvNHX	<i>K. virginica</i>	Tobacco	Salt	[85]	
BnNHX1	<i>B. napus</i>	Tobacco		[124]	
SsNHX1	<i>S. soda</i>	Rice	[125]		
SsNHX1		Arabidopsis	Salt, freezing	[126]	
SsNHX1		Alfalfa	[127]		
VrNHX1	<i>V. radiata</i>	Arabidopsis	Salt	[128]	
RtNHX1	<i>R. trigyna</i>	Arabidopsis		[84]	
AgNHX1	<i>A. gmelini</i>	Rice		[129]	
VvNHX1	<i>V. vinefera</i>	Tomato		[46]	
MsNHX1	<i>M. sativa</i>	Arabidopsis		[130]	
SaNHX1	<i>S. anglica</i>	Rice		[131]	
LeNHX1	<i>S. lycopersicon</i>	Arabidopsis		[132]	
HbNHX1	<i>H. brevisubulatum</i>	Tobacco		Salt and drought	[133]
ThNHX1	<i>T. halophila</i>	Arabidopsis		Salt	[134]
CqSOS1A	<i>C. quinoa</i>	<i>C. quinoa</i> and Arabidopsis		Salt	[135]
PtSOS1	<i>P. tenuiflora</i>	Arabidopsis	Salt	[136]	
Pt SOS2	<i>P. trichocarpa</i>	Hybrid poplar	Salt	[137]	
SISOS2	<i>S. lycopersicum</i>	Tomato	[138]		

#### 4. IDENTIFICATION OF ANTIPTER GENE FAMILY IN *ARGANIA SPINOSA* L. SKEELS (SAPO-TACEAE): A CASE STUDY

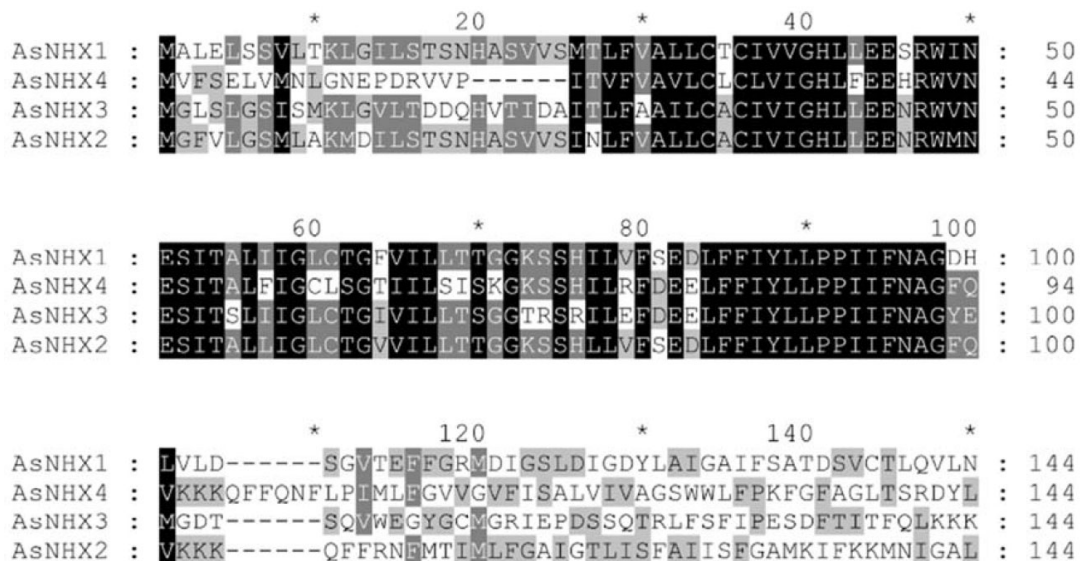
Argan tree (*Argania spinosa* L. skeels) belongs to the tropical Sapotaceae family. It is an endemic species in the Southwest of Morocco. This tree constitutes a socio-economically and ecological important woody plant in this region<sup>86</sup>. It also plays a great role in the biodiversity of the forest ecosystem [87]. This tree is well adapted to the arid and semi-arid areas.

The first research on *Argania spinosa* L. genome sequence was published in 2018 by Khayi *et al.* [88], allowing the identification of NHX genes. This genome (Version1) is the result of an assembly of a sequenced genome from “Argan AMghar: AM” tree with a genome size of approximately 675 Mb. To date, the NHX genes in *A. spinosa* L. have not yet been studied.

To predict NHX gene proteins in Argania, we used AtNHX from Arabidopsis and PtNHX from Poplaras queries to perform a tBlastN against the available genome of Argania. The scaffolds obtained from the blast results were screened for the presence of the Amiloride binding “FFIYLLPPI” as

TAG for NHXs. The filtered sequences were then analyzed in the PFAM databases to confirm the presence of “sodium/hydrogen exchanger family” domain. We identified four putative NHX sequences that were assigned as: AsNHX1, AsNHX2, AsNHX3 and AsNHX4 (Table S1). All AsNHX, except AsNHX3, had shown an Amiloride binding site found in the third transmembrane domain at N terminal (Fig. 2). This site is highly conserved in the eukaryotic NHX family and it serves as a classic inhibitor of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the presence of drug amiloride and/or its derivatives [89]. The amino acid sequences contain 243–721aa. Also, using ExPASy (<http://www.expasy.org/>), the molecular mass of 26.87–80.39 kDa and the theoretical isoelectric point (pI) of 5.68–8.75 were predicted Table (3).

The transmembrane domains (TMs) were predicted using TMHMM Sever v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Prediction of the transmembrane helices (TMs) revealed that the number of TMs in AsNHXs ranged from 5 to 11. Also, the prediction of subcellular localization of identified NHX was carried out using PlantmPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>). We report that most AsNHXs were localized in the vacuolar membrane (3).

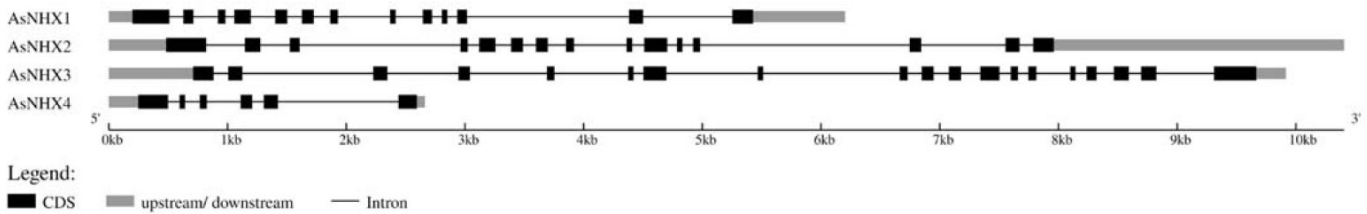


**Fig. (2).** A part of alignment analysis of Argan NHX proteins (AsNHX1-4). The conserved *Amiloride-binding* domain is boxed (84-94 amino acid residues).

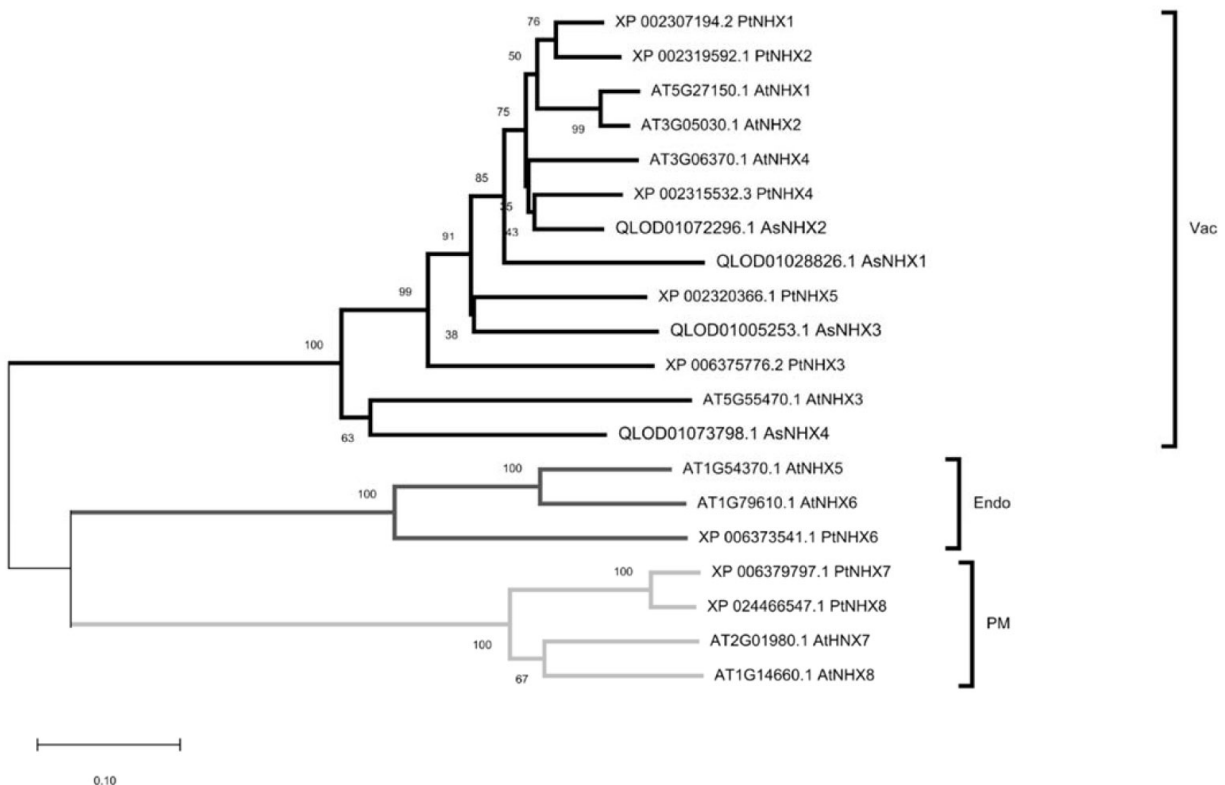
**Table 3.** Information’s about NHXs gene family identified in *Argania spinosa* L.

Putative name	Locus	Protein Length (aa)	TM	pI	MW (kD)	Plant-mPLoc
AsNHX1	QLOD01028826.1	471	9	6.73	52.05	Vacuole
AsNHX2	QLOD01072296.1	588	11	8.51	64.92	Vacuole
AsNHX3	QLOD01005253.1	721	10	8.75	80.39	Vacuole
AsNHX4	QLOD01073798.1	243	5	5.68	26.87	Vacuole

MW: molecular weight; pI: isoelectric point; TM: transmembrane domain.



**Fig. (3).** Exon-intron structures of NHXs family members in *Argania spinosa* L. Grey boxes, black boxes, grey lines, represent the exons, Upstream and downstream, and introns, respectively. CDS: Coding sequence, "\*" represent the located of *Amiloride-binding site*, kb: kilo base.



**Fig. (4).** Phylogenetic tree of the NHX genes from *Argania spinosa* L. (*As*), *Arabidopsis thaliana* (*At*) and *Populus trichocarpa* (*Pt*); *Vac*: Vacuole, *PM*: Plasma Membrane, *Endo*: Endosome. The tree was constructed by the Neighbor Joining method using MEGA version X.

In order to evaluate the structure of the 4 *AsNHXs*, we retrieved the complete genomic DNA and cDNA sequences (Table S1) from the *Argania* tree genome using Augustus online tool (<http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/submission.php>). The intron-exon structures of NHX genes were visualized using the Gene Structure Display Server (GSDS) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) by comparing the cDNA sequences to their corresponding genomic DNA sequences (Fig. 3).

The organization of *AsNHX1-4* illustrated in (Fig. 3) shows the position and length variation of intron-exon. The number of exons mainly ranged from 6 to 19. The *AsNHX1* has 13 exons and *AsNHX4* contains 6 introns, while *AsN-*

*HX3* and *AsNHX2* encompass 19 and 15 exons, respectively Table (3,4). The longest (356 pb) and the shortest (45 pb) exon were both observed in the *AsNHX3*. As *AsNHX2-3*, *AtNHX4* from *Arabidopsis thaliana* and *BvNHX4* from *Beta vulgaris* were observed to have 15 and 19 exons, respectively [90].

To clarify the evolutionary relationship of the *AsNHX*, a phylogenetic tree was built based on amino acid sequences from 20 NHX family members from *Argania spinosa* L., *Arabidopsis thaliana* and *Populus trichocarpa*. Based on multiple alignments of amino acid sequences constructed by CluwtalOmega, a bootstrap neighbor-joining phylogenetic tree was created using MEGAX.

Table 4. Number of exon and intron in AsNHX genes.

NHXs	Exon		Intron	
	Number	Size (pb)	Number	Size (pb)
AsNHX 1	13	46-311	12	81-1363
AsNHX 2	15	46-338	14	81-1764
AsNHX 3	19	45-356	18	80-1149
AsNHX 4	6	46-251	5	59-1013

Protein sequence alignment revealed that NHX genes were separated into three clear clusters (Fig. 4). Cluster 1 comprised the vacuolar type (Vac) NHX1-5 except the PtNHX5. Cluster 2 included the NHX5 and NHX6 as an endosomal type (Endo). While cluster 3 included NHX7 and NHX8 that are usually Plasma Membrane (PM) proteins. All NHX proteins of Argan species were clearly found to belong to the vacuolar-type cluster. Similarly, results by sub-cellular localization confirmed that the NHX genes predicted were only located in vacuolar.

## CONCLUSION

Plants involve complex physiological, biochemical and molecular mechanisms when exposed to various environmental stresses. Several stress-responsive genes under saline conditions were summarized. The antiporters (NHXs) are the most important ion transporters in tolerance to salt stress. In the present paper, a detailed review of NHX genes at different levels was presented. The classification of these genes remains the same across different plant species. Also, the recent progress in the function of various NHX isoforms and their potential use to improve salt tolerance in plants *via* genetic engineering was clearly described and discussed.

A genome-wide approach and *In silico* analysis of the NHX family genes in the draft genome of *Argania spinosa* L. was performed and four putative NHX genes (AsNHX1-4) clustered in one major class (vacuolar group) were identified for the first time. We also investigated a detailed analysis of their gene structure, proteins properties and conserved domain. The results indicate that all the AsNHX contain an Amiloride-binding site and present a variable number of intron and exon.

These genes should therefore provide valuable information to design markers associated with adaptation and serve as a gene candidate. They could further help in characterization of the function of these specific genes in the Argan tree under normal and stressed conditions.

## LIST OF ABBREVIATIONS

ABA	=	ABscisic Acid
CHX	=	Cation/H <sup>+</sup>
CPAs	=	Cation/Protons Antiporters
GSDS	=	Gene Structure Display Server
KEA	=	K <sup>+</sup> Efflux Antiporter
NHE	=	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Exchanger

NHX	=	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter
SOS	=	Salt Over Sensitive
TMs	=	Transmembrane domains

## CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

## FUNDING

None.

## CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. El HASSOUNI Khaoula for her contribution to revise and correct this paper.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publisher's web site along with the published article.

## REFERENCES

- [1] Munns, R.; Tester, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2008**, *59*, 651-681. [<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>] [PMID: 18444910]
- [2] Hasegawa, P.M. Sodium (Na<sup>+</sup>) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environ. Exp. Bot.*, **2013**, *92*, 19-31. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.03.001>]
- [3] Bassil, E.; Blumwald, E. The ins and outs of intracellular ion homeostasis: NHX-type cation/H(+) transporters. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2014**, *22*, 1-6. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2014.08.002>] [PMID: 25173972]
- [4] Brett, C.L.; Donowitz, M.; Rao, R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2005**, *288*(2), C223-C239. [<http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00360.2004>] [PMID: 15643048]
- [5] Chanroj, S.; Wang, G.; Venema, K.; Zhang, M.W.; Delwiche, C.F.; Sze, H. Conserved and diversified gene families of monovalent cation/h(+) antiporters from algae to flowering plants. *Front. Plant Sci.*, **2012**, *3*, 25. [<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2012.00025>] [PMID: 22639643]
- [6] Rodríguez-Rosales, M.P.; Gálvez, F.J.; Huertas, R.; Aranda, M.N.; Baghour, M.; Cagnac, O.; Venema, K. Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signal. Behav.*, **2009**, *4*(4), 265-276. [<http://dx.doi.org/10.4161/psb.4.4.7919>] [PMID: 19794841]
- [7] Pardo, J.M.; Cubero, B.; Leidi, E.O.; Quintero, F.J. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J. Exp. Bot.*, **2006**, *57*(5), 1181-1199. [<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erj114>] [PMID: 16513813]

- [8] Bassil, E.; Coku, A.; Blumwald, E. Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in plant growth and development. *J. Exp. Bot.*, **2012**, *63*(16), 5727-5740. [http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers250] [PMID: 22991159]
- [9] Dong, W.; Li, D.-L.; Qiu, N.-W.; Song, Y.-G. J. B. P. The functions of plant cation/proton antiporters. **2018**, *62*(3), 421-427.
- [10] RATNER, A.; JACOBY, B., Effect of K<sup>+</sup>, its Counter Anion, and pH on Sodium Efflux from Barley Root Tips12. *J. Exp. Bot.*, **1976**, *27*(5), 843-852. [http://dx.doi.org/10.1093/jxb/27.5.843]
- [11] Gaxiola, R.A.; Rao, R.; Sherman, A.; Grisafi, P.; Alper, S.L.; Fink, G.R. The Arabidopsis thaliana proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*(4), 1480-1485. [http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.4.1480] [PMID: 9990049]
- [12] Bhadauria, V. Next-generation Sequencing and Bioinformatics for Plant Science. **2017**.
- [13] Khan, M.S.; Ahmad, D.; Khan, M.A. Trends in genetic engineering of plants with (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) antiporters for salt stress tolerance. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **2015**, *29*(5), 815-825. [http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1060868]
- [14] Saier, M.H., Jr A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2000**, *64*(2), 354-411. [http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.64.2.354-411.2000] [PMID: 10839820]
- [15] Ye, C.Y.; Yang, X.; Xia, X.; Yin, W. Comparative analysis of cation/proton antiporter superfamily in plants. *Gene*, **2013**, *521*(2), 245-251. [http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.104] [PMID: 23562718]
- [16] Deinlein, U.; Stephan, A.B.; Horie, T.; Luo, W.; Xu, G.; Schroeder, J.I. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends Plant Sci.*, **2014**, *19*(6), 371-379. [http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.02.001] [PMID: 24630845]
- [17] Almeida, D.M.; Oliveira, M.M.; Saibo, N.J.M. Regulation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> homeostasis in plants: towards improved salt stress tolerance in crop plants. *Genet. Mol. Biol.*, **2017**, *40*(1)(Suppl. 1), 326-345. [http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0106] [PMID: 28350038]
- [18] Assaha, D.V.M. Ueda, A.; Saneoka, H.; Al-Yahyai, R.; Yaish, M. W., The Role of Na<sup>(+)</sup> and K<sup>(+)</sup> Transporters in Salt Stress Adaptation in Glycophytes. *Front. Physiol.*, **2017**, *8*, 509. [http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2017.00509] [PMID: 28769821]
- [19] Pires, I. S.; Negrão, S.; Pentony, M. M.; Abreu, I. A.; Oliveira, M. M.; Purugganan, M. D. J. B. P. B. Different evolutionary histories of two cation/proton exchanger gene families in plants. **2013**, *13*(1), 97.
- [20] Bassil, E.; Ohto, M.A.; Esumi, T.; Tajima, H.; Zhu, Z.; Cagnac, O.; Belmonte, M.; Peleg, Z.; Yamaguchi, T.; Blumwald, E. The Arabidopsis intracellular Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. *Plant Cell*, **2011**, *23*(1), 224-239. b [http://dx.doi.org/10.1105/tpc.110.079426] [PMID: 21278129]
- [21] Xu, Y.; Zhou, Y.; Hong, S.; Xia, Z.; Cui, D.; Guo, J.; Xu, H.; Jiang, X. Functional characterization of a wheat NHX antiporter gene TaNHX2 that encodes a K<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger. *PLoS One*, **2013**, *8*(11), e78098. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0078098] [PMID: 24223765]
- [22] Aharon, G. S.; Apse, M. P.; Duan, S.; Hua, X.; Blumwald, E. J. P. Soil, Characterization of a family of vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in Arabidopsis thaliana. **2003**, *253*(1), 245-256.
- [23] Yokoi, S.; Quintero, F.J.; Cubero, B.; Ruiz, M.T.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M.; Pardo, J.M. Differential expression and function of Arabidopsis thaliana NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *Plant J.*, **2002**, *30*(5), 529-539. [http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01309.x] [PMID: 12047628]
- [24] Leidi, E.O.; Barragán, V.; Rubio, L.; El-Hamdaoui, A.; Ruiz, M.T.; Cubero, B.; Fernández, J.A.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M.; Quintero, F.J.; Pardo, J.M. The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant J.*, **2010**, *61*(3), 495-506. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04073.x] [PMID: 19912566]
- [25] Bassil, E.; Tajima, H.; Liang, Y.C.; Ohto, M.A.; Ushijima, K.; Nakano, R.; Esumi, T.; Coku, A.; Belmonte, M.; Blumwald, E. The Arabidopsis Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K<sup>+</sup> homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *Plant Cell*, **2011**, *23*(9), 3482-3497. a [http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.089581] [PMID: 21954467]
- [26] Apse, M.P.; Sottosanto, J.B.; Blumwald, E. Vacuolar cation/H<sup>+</sup> exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the Arabidopsis vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Plant J.*, **2003**, *36*(2), 229-239. [http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01871.x] [PMID: 14535887]
- [27] Apse, M. P.; Aharon, G. S.; Snedden, W. A.; Blumwald, E. Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter in Arabidopsis. **1999**, *285*(5431), 1256-1258.
- [28] Barragán, V.; Leidi, E.O.; Andrés, Z.; Rubio, L.; De Luca, A.; Fernández, J.A.; Cubero, B.; Pardo, J.M. Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in Arabidopsis. *Plant Cell*, **2012**, *24*(3), 1127-1142. [http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.095273] [PMID: 22438021]
- [29] Andrés, Z.; Pérez-Hormaeche, J.; Leidi, E.O.; Schlücking, K.; Steinhorst, L.; McLachlan, D.H.; Schumacher, K.; Hetherington, A.M.; Kudla, J.; Cubero, B.; Pardo, J.M. Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2014**, *111*(17), E1806-E1814. [http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1320421111] [PMID: 24733919]
- [30] Yamaguchi, T.; Apse, M. P.; Shi, H.; Blumwald, E. Topological analysis of a plant vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. **2003**, *100*(21), 12510-12515.
- [31] Orłowski, J.; Grinstein, S. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *Compr. Physiol.*, **2011**, *1*(4), 2083-2100. [PMID: 23733698]
- [32] Wakabayashi, S.; Pang, T.; Su, X.; Shigekawa, M. A novel topology model of the human Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger isoform 1. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*(11), 7942-7949. [http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.11.7942] [PMID: 10713111]
- [33] Landau, M.; Herz, K.; Padan, E.; Ben-Tal, N. Model structure of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 (NHE1): functional and clinical implications. *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*(52), 37854-37863. [http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M705460200] [PMID: 17981808]
- [34] Hunte, C.; Screpanti, E.; Venturi, M.; Rimon, A.; Padan, E.; Michel, H. Structure of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature*, **2005**, *435*(7046), 1197-1202. [http://dx.doi.org/10.1038/nature03692] [PMID: 15988517]
- [35] Yun, C.H.C.; Little, P.J.; Nath, S.K.; Levine, S.A.; Pouyssegur, J.; Tse, C.M.; Donowitz, M. Leu143 in the putative fourth membrane spanning domain is critical for amiloride inhibition of an epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform (NHE-2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1993**, *193*(2), 532-539. [http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1993.1656] [PMID: 8512555]
- [36] Harris, C.; Fliegel, L. Amiloride and the Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger protein: mechanism and significance of inhibition of the Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger (review). *Int. J. Mol. Med.*, **1999**, *3*(3), 315-321. [http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.3.3.315] [PMID: 10028059]
- [37] Reguera, M.; Bassil, E.; Blumwald, E. Intracellular NHX-type cation/H<sup>+</sup> antiporters in plants. *Mol. Plant*, **2014**, *7*(2), 261-263. [http://dx.doi.org/10.1093/mp/sst091] [PMID: 23956073]
- [38] Li, H.; Liu, W.; Yang, Q.-S.; Lin, J.; Chang, Y.-H. Isolation and Comparative Analysis of Two Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter NHX2 Genes from *Pyrus betulaefolia*. *Plant Mol. Biol. Report.*, **2018**, *36*(3), 439-450. [http://dx.doi.org/10.1007/s11105-018-1089-8]
- [39] Yarra, R.; Kirti, P.B. Expressing class I wheat NHX (TaNHX2) gene in eggplant (*Solanum melongena* L.) improves plant performance under saline condition. *Funct. Integr. Genomics*, **2019**,

- 19(4), 541-554.  
[http://dx.doi.org/10.1007/s10142-019-00656-5] [PMID: 30673892]
- [40] Bulle, M.; Yarra, R.; Abbagini, S. Enhanced salinity stress tolerance in transgenic chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) plants over-expressing the wheat antiporter (TaNHX2) gene. *Mol. Breed.*, **2016**, *36*(4)  
[http://dx.doi.org/10.1007/s11032-016-0451-5]
- [41] Zhang, Y.M.; Zhang, H.M.; Liu, Z.H.; Li, H.C.; Guo, X.L.; Li, G.L. The wheat NHX antiporter gene TaNHX2 confers salt tolerance in transgenic alfalfa by increasing the retention capacity of intracellular potassium. *Plant Mol. Biol.*, **2015**, *87*(3), 317-327.  
[http://dx.doi.org/10.1007/s11103-014-0278-6] [PMID: 25549607]
- [42] Yarra, R.; He, S.; Abbagini, S.; Ma, B.; Bulle, M.; Zhang, W. Overexpression of a wheat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene (TaNHX2) enhances tolerance to salt stress in transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **2012**, *111*(1), 49-57. [PCTOC].  
[http://dx.doi.org/10.1007/s11240-012-0169-y]
- [43] Cao, D.; Hou, W.; Liu, W.; Yao, W.; Wu, C.; Liu, X.; Han, T. Overexpression of TaNHX2 enhances salt tolerance of 'composite' and whole transgenic soybean plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **2011**, *107*(3), 541-552. [PCTOC].  
[http://dx.doi.org/10.1007/s11240-011-0005-9]
- [44] Zhang, G.H.; Su, Q.; An, L.J.; Wu, S. Characterization and expression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from the monocot halophyte *Aeluropus litoralis*. *Plant Physiol. Biochem.*, **2008**, *46*(2), 117-126.  
[http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.10.022] [PMID: 18061467]
- [45] Venier, M.; Agüero, C.B. BerMejillo, A.; Filippini, M. F.; Hanana, M.; Walker, M. A.; Blumwald, E.; Dandekar, A. M., Analysis of salinity tolerance of *Vitis vinifera* 'Thompson Seedless' transformed with AtNHX1. *Vitis*, **2018**, *57*, 143-150.
- [46] Charfeddine, S.; Charfeddine, M.; Hanana, M.; Gargouri-Bouزيد, R. Ectopic expression of a grape vine vacuolar NHX antiporter enhances transgenic potato plant tolerance to salinity. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, **2018**, *28*(1), 50-62.  
[http://dx.doi.org/10.1007/s13562-018-0462-x]
- [47] Jiang, X.; Leidi, E.O.; Pardo, J.M. How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? *Plant Signal. Behav.*, **2010**, *5*(7), 792-795.  
[http://dx.doi.org/10.4161/psb.5.7.11767] [PMID: 20495345]
- [48] Adem, G.D.; Roy, S.J.; Zhou, M.; Bowman, J.P.; Shabala, S. Evaluating contribution of ionic, osmotic and oxidative stress components towards salinity tolerance in barley. *BMC Plant Biol.*, **2014**, *14*(1), 113.  
[http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-14-113] [PMID: 24774965]
- [49] Venema, K.; Quintero, F.J.; Pardo, J.M.; Donaire, J.P. The Arabidopsis Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in reconstituted liposomes. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*(4), 2413-2418.  
[http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M105043200] [PMID: 11707435]
- [50] Quintero, F.J.; Blatt, M.R.; Pardo, J.M. Functional conservation between yeast and plant endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *FEBS Lett.*, **2000**, *471*(2-3), 224-228.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01412-5] [PMID: 10767428]
- [51] Yue, Y.; Zhang, M.; Zhang, J.; Duan, L.; Li, Z. SOS1 gene overexpression increased salt tolerance in transgenic tobacco by maintaining a higher K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratio. *J. Plant Physiol.*, **2012**, *169*(3), 255-261.  
[http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2011.10.007] [PMID: 22115741]
- [52] Chen, L.H.; Zhang, B.; Xu, Z.Q. Salt tolerance conferred by overexpression of Arabidopsis vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene AtNHX1 in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Transgenic Res.*, **2008**, *17*(1), 121-132.  
[http://dx.doi.org/10.1007/s11248-007-9085-z] [PMID: 17541720]
- [53] Zhang, H-X.; Blumwald, E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotechnol.*, **2001**, *19*(8), 765-768.  
[http://dx.doi.org/10.1038/90824] [PMID: 11479571]
- [54] Hanana, M.; Cagnac, O.; Zarrouk, M.; Blumwald, E. Rôles biologiques des antiports vacuolaires NHX: acquis et perspectives d'amélioration génétique des plantes. *Botany*, **2009**, *87*(11), 1023-1035.  
[http://dx.doi.org/10.1139/B09-073]
- [55] Dragwidge, J.M.; Scholl, S.; Schumacher, K.; Gendall, A.R. NHX-type Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporters are required for TGN/EE trafficking and endosomal ion homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Sci.*, **2019**, *132*(7), jcs226472.  
[http://dx.doi.org/10.1242/jcs.226472] [PMID: 30837286]
- [56] Shen, J.; Zeng, Y.; Zhuang, X.; Sun, L.; Yao, X.; Pimpl, P.; Jiang, L. Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Mol. Plant*, **2013**, *6*(5), 1419-1437.  
[http://dx.doi.org/10.1093/mp/sst079] [PMID: 23702593]
- [57] Martinière, A.; Bassil, E.; Jublanc, E.; Alcon, C.; Reguera, M.; Sentenac, H.; Blumwald, E.; Paris, N. *In vivo* intracellular pH measurements in tobacco and Arabidopsis reveal an unexpected pH gradient in the endomembrane system. *Plant Cell*, **2013**, *25*(10), 4028-4043.  
[http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.116897] [PMID: 24104564]
- [58] Schumacher, K. Endomembrane proton pumps: connecting membrane and vesicle transport. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2006**, *9*(6), 595-600.  
[http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2006.09.001] [PMID: 17008121]
- [59] Yamaguchi, T.; Fukada-Tanaka, S.; Inagaki, Y.; Saito, N.; Yonekura-Sakakibara, K.; Tanaka, Y.; Kusumi, T.; Iida, S. Genes encoding the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and flower coloration. *Plant Cell Physiol.*, **2001**, *42*(5), 451-461.  
[http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pce080] [PMID: 11382810]
- [60] Yoshida, K.; Miki, N.; Momono, K.; Kawachi, M.; Katou, K.; Okazaki, Y.; Uozumi, N.; Maeshima, M.; Kondo, T. Synchrony between flower opening and petal-color change from red to blue in morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.*, **2009**, *85*(6), 187-197.  
[http://dx.doi.org/10.2183/pjab.85.187] [PMID: 19521056]
- [61] Ohnishi, M.; Fukada-Tanaka, S.; Hoshino, A.; Takada, J.; Inagaki, Y.; Iida, S. Characterization of a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene InNHX2 and comparison of InNHX2 with InNHX1, which is responsible for blue flower coloration by increasing the vacuolar pH in the Japanese morning glory. *Plant Cell Physiol.*, **2005**, *46*(2), 259-267.  
[http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pci028] [PMID: 15695437]
- [62] Fukuda, A.; Nakamura, A.; Tanaka, Y. Molecular cloning and expression of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1446*(1-2), 149-155.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4781(99)00065-2] [PMID: 10395929]
- [63] Jurgens, G. Membrane trafficking in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2004**, *20*, 481-504.  
[http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.082503.103057] [PMID: 15473849]
- [64] Samaj, J.; Read, N.D.; Volkmann, D.; Menzel, D.; Baluska, F. The endocytic network in plants. *Trends Cell Biol.*, **2005**, *15*(8), 425-433.  
[http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2005.06.006] [PMID: 16006126]
- [65] Otegui, M.S.; Spitzer, C. Endosomal functions in plants. *Traffic*, **2008**, *9*(10), 1589-1598.  
[http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00787.x] [PMID: 18627577]
- [66] Han, L.; Li, G.J.; Yang, K.Y.; Mao, G.; Wang, R.; Liu, Y.; Zhang, S. Mitogen-activated protein kinase 3 and 6 regulate Botrytis cinerea-induced ethylene production in Arabidopsis. *Plant J.*, **2010**, *64*(1), 114-127.  
[http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04318.x] [PMID: 20659280]
- [67] Geldner, N. The plant endosomal system-its structure and role in signal transduction and plant development. *Planta*, **2004**, *219*(4), 547-560.  
[http://dx.doi.org/10.1007/s00425-004-1302-x] [PMID: 15221385]
- [68] Ebine, K.; Inoue, T.; Ito, J.; Ito, E.; Uemura, T.; Goh, T.; Abe, H.;

- Sato, K.; Nakano, A.; Ueda, T. Plant vacuolar trafficking occurs through distinctly regulated pathways. *Curr. Biol.*, **2014**, *24*(12), 1375-1382. [http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.004] [PMID: 24881878]
- [69] Ali, R.; Brett, C.L.; Mukherjee, S.; Rao, R. Inhibition of sodium/proton exchange by a Rab-GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*(6), 4498-4506. [http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M307446200] [PMID: 14610088]
- [70] Bowers, K.; Levi, B.P.; Patel, F.I.; Stevens, T.H. The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **2000**, *11*(12), 4277-4294. [http://dx.doi.org/10.1091/mbc.11.12.4277] [PMID: 11102523]
- [71] Qiu, Q.S.; Fratti, R.A. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Nhx1p regulates the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuole fusion. *J. Cell Sci.*, **2010**, *123*(Pt 19), 3266-3275. [http://dx.doi.org/10.1242/jcs.067637] [PMID: 20826459]
- [72] Brett, C.L.; Tukaye, D.N.; Mukherjee, S.; Rao, R. The yeast endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell*, **2005**, *16*(3), 1396-1405. [http://dx.doi.org/10.1091/mbc.e04-11-0999] [PMID: 15635088]
- [73] Nass, R.; Rao, R. Novel localization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*(33), 21054-21060. [http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.33.21054] [PMID: 9694857]
- [74] Reguera, M.; Bassil, E.; Tajima, H.; Wimmer, M.; Chanoca, A.; Otegui, M.S.; Paris, N.; Blumwald, E. pH Regulation by NHX-Type Antiporters Is Required for Receptor-Mediated Protein Trafficking to the Vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **2015**, *27*(4), 1200-1217. [http://dx.doi.org/10.1105/tpc.114.135699] [PMID: 25829439]
- [75] Hamaji, K.; Nagira, M.; Yoshida, K.; Ohnishi, M.; Oda, Y.; Uemura, T.; Goh, T.; Sato, M.H.; Morita, M.T.; Tasaka, M.; Hasezawa, S.; Nakano, A.; Hara-Nishimura, I.; Maeshima, M.; Fukaki, H.; Mimura, T. Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, **2009**, *50*(12), 2023-2033. [http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pep143] [PMID: 19880402]
- [76] Sottosanto, J.B.; Saranga, Y.; Blumwald, E. Impact of AtNHX1, a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, upon gene expression during short- and long-term salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.*, **2007**, *7*, 18. [http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-7-18] [PMID: 17411438]
- [77] Wu, S. J.; Ding, L.; Zhu, J. K. SOS1, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition. **1996**, *8*(4), 617-627.
- [78] Shi, H.; Ishitani, M.; Kim, C.; Zhu, J.K. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*(12), 6896-6901. [http://dx.doi.org/10.1073/pnas.120170197] [PMID: 10823923]
- [79] Martínez-Atienza, J.; Jiang, X.; Garcíadeblas, B.; Mendoza, I.; Zhu, J.K.; Pardo, J.M.; Quintero, F.J. Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiol.*, **2007**, *143*(2), 1001-1012. [http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.092635] [PMID: 17142477]
- [80] Olias, R.; Eljakaoui, Z.; Pardo, J.M.; Belver, A. The Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger SOS1 controls extrusion and distribution of Na<sup>(+)</sup> in tomato plants under salinity conditions. *Plant Signal. Behav.*, **2009**, *4*(10), 973-976. [http://dx.doi.org/10.4161/psb.4.10.9679] [PMID: 19826225]
- [81] Tang, R.J.; Liu, H.; Bao, Y.; Lv, Q.D.; Yang, L.; Zhang, H.X. The woody plant poplar has a functionally conserved salt overly sensitive pathway in response to salinity stress. *Plant Mol. Biol.*, **2010**, *74*(4-5), 367-380. [http://dx.doi.org/10.1007/s11103-010-9680-x] [PMID: 20803312]
- [82] Yoshida, K. Plant biotechnology-genetic engineering to enhance plant salt tolerance. *J. Biosci. Bioeng.*, **2002**, *94*(6), 585-590. [http://dx.doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80199-2] [PMID: 16233354]
- [83] Mushke, R.; Yarra, R.; Kirti, P.B. Improved salinity tolerance and growth performance in transgenic sunflower plants via ectopic expression of a wheat antiporter gene (TaNHX2). *Mol. Biol. Rep.*, **2019**, *46*(6), 5941-5953. [http://dx.doi.org/10.1007/s11033-019-05028-7] [PMID: 31401779]
- [84] Li, N.; Wang, X.; Ma, B.; Du, C.; Zheng, L.; Wang, Y. Expression of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter RtNHX1 from a recretohalophyte *Reaumuria trigyna* improved salt tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.*, **2017**, *218*, 109-120. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2017.07.015] [PMID: 28818757]
- [85] Wang, H.; Ding, Q.; Wang, H. A new Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene KvNHX1 isolated from the halophyte *Kosteletzkya virginica* improves salt tolerance in transgenic tobacco. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **2018**, *32*(6), 1378-1386. [http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2018.1522972]
- [86] Nouaim, R.; Mangin, G.; Breuil, M.C.; Chaussod, R. The argan tree (*Argania spinosa*) in Morocco: Propagation by seeds, cuttings and *in-vitro* techniques. *Agrofor. Syst.*, **2002**, *54*(1), 71-81. [http://dx.doi.org/10.1023/A:1014236025396]
- [87] Msanda, F.; El Aboudi, A.; Peltier, J.P. Biodiversité et biogéographie de l'arganeraie marocaine. *Cah. Agric.*, **2005**, *14*, 8.
- [88] Khayi, S.; Azza, N.; Gaboun, F.; Pirro, S.; Badad, O.; Claros, M.; Lightfoot, D.; Unver, T.; Chaouni, B.; Merrouch, R.; Rahim, B.; Essayeh, S.; Ganoudi, M.; Abdelwahd, R.; Diria, G.; Mdarhi, M.; Labhili, M.; Iraqi, D.; Mouhaddab, J.; Sedrati, H.; Memari, M.; Hamamouch, N.; Alché, J.; Boukhatem, N.; Mrabet, R.; Dahan, R.; Legssyer, A.; Khalfou, M.; Badraoui, M.; Van de Peer, Y.; Tatusova, T.; El Mousadik, A.; Mentag, R.; Ghazal, H. First draft genome assembly of the Argane tree (*Argania spinosa*) [version 1; peer review: 1 approved, 1 approved with reservations]. **2018**, *7*(1310)
- [89] Wu, G.Q.; Wang, Q.; Bao, A.K.; Wang, S.M. Amiloride reduces sodium transport and accumulation in the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* under salt conditions. *Biol. Trace Elem. Res.*, **2011**, *139*(3), 356-367. [http://dx.doi.org/10.1007/s12011-010-8662-9] [PMID: 20352373]
- [90] Wu, G.Q.; Wang, J.L.; Li, S.J. Genome-Wide Identification of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter (NHX) Genes in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) and Their Regulated Expression under Salt Stress. *Genes (Basel)*, **2019**, *10*(5), E401. [http://dx.doi.org/10.3390/genes10050401] [PMID: 31137880]
- [91] Tian, F.; Chang, E.; Li, Y.; Sun, P.; Hu, J.; Zhang, J. Expression and integrated network analyses revealed functional divergence of NHX-type Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger genes in poplar. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*(1), 2607. [http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-02894-8] [PMID: 28572621]
- [92] Hima Kumari, P.; Anil Kumar, S.; Ramesh, K.; Sudhakar Reddy, P.; Nagaraju, M.; Bhanu Prakash, A.; Shah, T.; Henderson, A.; Sri-vastava, R.K.; Rajashekar, G.; Chitikaneni, A.; Varshney, R.K.; Rathnagiri, P.; Lakshmi Narasu, M.; Kavi Kishor, P.B. Genome-Wide Identification and Analysis of *Arabidopsis* Sodium Proton Antiporter (NHX) and Human Sodium Proton Exchanger (NHE) Homologs in *Sorghum bicolor*. *Genes (Basel)*, **2018**, *9*(5), E236. [http://dx.doi.org/10.3390/genes9050236] [PMID: 29751546]
- [93] Cao, B.; Long, D.; Zhang, M.; Liu, C.; Xiang, Z.; Zhao, A. Molecular characterization and expression analysis of the mulberry Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger gene family. *Plant Physiol. Biochem.*, **2016**, *99*, 49-58. [http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.12.010] [PMID: 26730882]
- [94] Zhang, H.X.; Hodson, J.N.; Williams, J.P.; Blumwald, E. Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*(22), 12832-12836. [http://dx.doi.org/10.1073/pnas.231476498] [PMID: 11606781]
- [95] Xue, Z.-Y.; Zhi, D.-Y.; Xue, G.-P.; Zhang, H.; Zhao, Y.-X.; Xia, G.-M. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Sci.*, **2004**, *167*(4), 849-859.

- [96] [http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.034] Yin, X.; Yang, X.; Zhang, K.; Zhang, J. Production and analysis of transgenic maize with improved salt tolerance by the introduction of AtNHX1 gene. *Exp. Cell Res.*, **2004**, *46*, 321-326.
- [97] He, C.; Yan, J.; Shen, G.; Fu, L.; Holaday, A.S.; Auld, D.; Blumwald, E.; Zhang, H. Expression of an Arabidopsis vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field. *Plant Cell Physiol.*, **2005**, *46*(11), 1848-1854. [http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pci201] [PMID: 16179357]
- [98] Yang, A.F.; Duan, X.G.; Gu, X.F.; Gao, F.; Zhang, J.R. Efficient transformation of beet (*Beta vulgaris*) and production of plants with improved salt-tolerance. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **2005**, *83*(3), 259-270. [http://dx.doi.org/10.1007/s11240-005-6670-9]
- [99] Chen, H.; An, R.; Tang, J.-H.; Cui, X.-H.; Hao, F.-S.; Chen, J.; Wang, X.-C. Over-expression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice. *Mol. Breed.*, **2007**, *19*(3), 215-225. [http://dx.doi.org/10.1007/s11032-006-9048-8]
- [100] Zhao, J.; Zhi, D.; Xue, Z.; Liu, H.; Xia, G. Enhanced salt tolerance of transgenic progeny of tall fescue (*Festuca arundinacea*) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from Arabidopsis. *J. Plant Physiol.*, **2007**, *164*(10), 1377-1383. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2007.04.001] [PMID: 17561307]
- [101] Liu, H.; Wang, Q.; Yu, M.; Zhang, Y.; Wu, Y.; Zhang, H. Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively expressing an Arabidopsis thaliana vacuolar Na/H antiporter gene, AtNHX3, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots. *Plant Cell Environ.*, **2008**, *31*(9), 1325-1334. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01838.x] [PMID: 18518917]
- [102] Zhou, S.; Zhang, Z.; Tang, Q.; Lan, H.; Li, Y.; Luo, P. Enhanced V-ATPase activity contributes to the improved salt tolerance of transgenic tobacco plants overexpressing vacuolar Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> antiporter AtNHX1. *Biotechnol. Lett.*, **2011**, *33*(2), 375-380. [http://dx.doi.org/10.1007/s10529-010-0418-2] [PMID: 20882319]
- [103] Banjara, M.; Zhu, L.; Shen, G.; Payton, P.; Zhang, H. Expression of an Arabidopsis sodium/proton antiporter gene (AtNHX1) in peanut to improve salt tolerance. *Plant Biotechnol. Rep.*, **2011**, *6*(1), 59-67. [http://dx.doi.org/10.1007/s11816-011-0200-5]
- [104] Jiang, C.; Zheng, Q.; Liu, Z.; Xu, W.; Liu, L.; Zhao, G.; Long, X. Overexpression of Arabidopsis thaliana Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene enhanced salt resistance in transgenic poplar (*Populus × euramericana* 'Neva'). *Trees (Berl.)*, **2011**, *26*(3), 685-694. [http://dx.doi.org/10.1007/s00468-011-0635-x]
- [105] Tian, N.; Wang, J.; Xu, Z.Q. Overexpression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene AtNHX1 from Arabidopsis thaliana improves the salt tolerance of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *S. Afr. J. Bot.*, **2011**, *77*(1), 160-169. [http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2010.07.010]
- [106] Li, M.; Li, Y.; Li, H.; Wu, G. Overexpression of AtNHX5 improves tolerance to both salt and drought stress in *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. *Tree Physiol.*, **2011**, *31*(3), 349-357. [http://dx.doi.org/10.1093/treephys/tpq003] [PMID: 21512100]
- [107] Asif, M.A.; Zafar, Y.; Iqbal, J.; Iqbal, M.M.; Rashid, U.; Ali, G.M.; Arif, A.; Nazir, F. Enhanced expression of AtNHX1, in transgenic groundnut (*Arachis hypogaea* L.) improves salt and drought tolerance. *Mol. Biotechnol.*, **2011**, *49*(3), 250-256. [http://dx.doi.org/10.1007/s12033-011-9399-1] [PMID: 21455815]
- [108] Li, M.; Lin, X.; Li, H.; Pan, X.; Wu, G. Overexpression of AtNHX5 improves tolerance to both salt and water stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **2011**, *107*(2), 283-293. [PCTOC]. [http://dx.doi.org/10.1007/s11240-011-9979-6]
- [109] Brini, F.; Hanin, M.; Mezghani, I.; Berkowitz, G.A.; Masmoudi, K. Overexpression of wheat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter TNHX1 and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in Arabidopsis thaliana plants. *J. Exp. Bot.*, **2007**, *58*(2), 301-308. [http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erl251] [PMID: 17229760]
- [110] Wu, L.; Chen, W.; Zhao, Y.; Feng, S.; Ying, Q.; Liu, J.; Wang, H. Salt-tolerance enhancement of transgenic rice with Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene driven by root-specific promoter PmPgPR10. *Zhongguo Shuidao Kexue*, **2012**, *26*(6), 643-650.
- [111] Zhang, Y.-M.; Liu, Z.-H.; Wen, Z.-Y.; Zhang, H.-M.; Yang, F.; Guo, X.-L. The vacuolar Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiporter gene TaNHX2 confers salt tolerance on transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Funct. Plant Biol.*, **2012**, *39*(8), 708-716. [http://dx.doi.org/10.1071/FP12095] [PMID: 32480822]
- [112] Lu, W.; Guo, C.; Li, X.; Duan, W.; Ma, C.; Zhao, M.; Gu, J.; Du, X.; Liu, Z.; Xiao, K. Overexpression of TaNHX3, a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene in wheat, enhances salt stress tolerance in tobacco by improving related physiological processes. *Plant Physiol. Biochem.*, **2014**, *76*, 17-28. [http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.013] [PMID: 24448321]
- [113] Zhang, H.; Liu, Y.; Xu, Y.; Chapman, S.; Love, A.J.; Xia, T. A newly isolated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene, DmNHX1, confers salt tolerance when expressed transiently in *Nicotiana benthamiana* or stably in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **2012**, *110*(2), 189-200. [PCTOC]. [http://dx.doi.org/10.1007/s11240-012-0142-9]
- [114] Rajagopal, D.; Agarwal, P.; Tyagi, W.; Singla-Pareek, S.L.; Reddy, M.K.; Sopory, S.K. Pennisetum glaucum Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter confers high level of salinity tolerance in transgenic Brassica juncea. *Mol. Breed.*, **2006**, *19*(2), 137-151. [http://dx.doi.org/10.1007/s11032-006-9052-z]
- [115] Verma, D.; Singla-Pareek, S. L.; Rajagopal, D.; Reddy, M. K.; Sopory, S. K. J. o. B. Functional validation of a novel isoform of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from Pennisetum glaucum for enhancing salinity tolerance in rice. **2007**, *32*(3), 621-628.
- [116] Fukuda, A.; Nakamura, A.; Tagiri, A.; Tanaka, H.; Miyao, A.; Hirochika, H.; Tanaka, Y. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> antiporter from rice. *Plant Cell Physiol.*, **2004**, *45*(2), 146-159. [http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pch014] [PMID: 14988485]
- [117] Wu, Y.-Y.; Chen, Q.-J.; Chen, M.; Chen, J.; Wang, X.-C. Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene. *Plant Sci.*, **2005**, *169*(1), 65-73. [http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.030]
- [118] Wang, B.; Zhai, H.; He, S.; Zhang, H.; Ren, Z.; Zhang, D.; Liu, Q. A vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene, IbNHX2, enhances salt and drought tolerance in transgenic sweetpotato. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, **2016**, *201*, 153-166. [http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.027]
- [119] Liu, J.; Zhang, S.; Dong, L.; Chu, J. Incorporation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Aeluropus litoralis* confers salt tolerance in soybean (*Glycine max* L. *Indian J. Biochem. Biophys.*, **2014**, *51*(1), 58-65. [PMID: 24791418]
- [120] Yadav, N.S.; Shukla, P.S.; Jha, A.; Agarwal, P.K.; Jha, B. The SbSOS1 gene from the extreme halophyte *Salicornia brachiata* enhances Na<sup>(+)</sup> loading in xylem and confers salt tolerance in transgenic tobacco. *BMC Plant Biol.*, **2012**, *12*(1), 188. [http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-12-188] [PMID: 23057782]
- [121] Chen, X.; Bao, H.; Guo, J.; Jia, W.; Li, Y. Overexpression of SeNHX1 improves both salt tolerance and disease resistance in tobacco. *Plant Signal. Behav.*, **2015**, *10*(4), e993240. [http://dx.doi.org/10.4161/15592324.2014.993240] [PMID: 25875967]
- [122] Zhang, L.Q.; Niu, Y.D.; Huridu, H.; Hao, J.F.; Qi, Z.; Hasi, A. *Salicornia europaea* L. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Genet. Mol. Res.*, **2014**, *13*(3), 5350-5360. [http://dx.doi.org/10.4238/2014.July.24.14] [PMID: 25078591]
- [123] Guan, B.; Hu, Y.; Zeng, Y.; Wang, Y.; Zhang, F. Molecular characterization and functional analysis of a vacuolar Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> antiporter gene (HcNHX1) from *Halostachys caspica*. *Mol. Biol. Rep.*, **2011**, *38*(3), 1889-1899. [http://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-0307-8] [PMID: 20886297]

- [124] Wang, J.; Zuo, K.; Wu, W.; Song, J.; Sun, X.; Lin, J.; Li, X.; Tang, K. J. B. P. Expression of a Novel Antiporter Gene from *Brassica napus* Resulted in Enhanced Salt Tolerance in Transgenic Tobacco Plants. **2004**, *48*(4), 509-515. [http://dx.doi.org/10.1023/B:BIOP.0000047145.18014.a3]
- [125] Zhao, F.-Y.; Zhang, X.-J.; Li, P.-H.; Zhao, Y.-X.; Zhang, H. Co-expression of the Suaeda salsa SsNHX1 and Arabidopsis AVP1 confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single SsNHX1. *Mol. Breed.*, **2006**, *17*(4), 341-353. [http://dx.doi.org/10.1007/s11032-006-9005-6]
- [126] Li, J.; Jiang, G.; Huang, P.; Ma, J.; Zhang, F. Overexpression of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from Suaeda salsa confers cold and salt tolerance to transgenic Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **2007**, *90*(1), 41-48. [http://dx.doi.org/10.1007/s11240-007-9246-z]
- [127] Li, W.; Wang, D.; Jin, T.; Chang, Q.; Yin, D.; Xu, S.; Liu, B.; Liu, L. The Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter Gene SsNHX1 from the Halophyte Salsola soda Confers Salt Tolerance in Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol. Biol. Report.*, **2010**, *29*(2), 278-290. [http://dx.doi.org/10.1007/s11105-010-0224-y]
- [128] Mishra, S.; Alavilli, H.; Lee, B.H.; Panda, S.K.; Sahoo, L. Cloning and functional characterization of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from mungbean (VrNHX1) and its ectopic expression enhanced salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *PLoS One*, **2014**, *9*(10), e106678. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0106678] [PMID: 25350285]
- [129] Ohta, M.; Hayashi, Y.; Nakashima, A.; Hamada, A.; Tanaka, A.; Nakamura, T.; Hayakawa, T. Introduction of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Lett.*, **2002**, *532*(3), 279-282. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03679-7] [PMID: 12482579]
- [130] An, B.-Y.; Luo, Y.; Li, J.-R.; Qiao, W.-H.; Zhang, X.-S.; Gao, X.-Q. Expression of a Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter Gene of Alfalfa Enhances Salinity Tolerance in Transgenic Arabidopsis. *Zuo Wu Xue Bao*, **2008**, *34*(4), 557-564. [http://dx.doi.org/10.3724/SP.J.1006.2008.00557]
- [131] Lan, T.; Duan, Y.; Wang, B.; Zhou, Y.; Wu, W.-r. Molecular cloning and functional characterization of a Na<sup>+</sup> antiporter gene from halophyte *Spartina anglica*. *Turk. J. Agric. For.*, **2011**, *35*, 535-543.
- [132] Rodríguez-Rosales, M.P.; Jiang, X.; Gálvez, F.J.; Aranda, M.N.; Cubero, B.; Venema, K. Overexpression of the tomato K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytol.*, **2008**, *179*(2), 366-377. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02461.x] [PMID: 19086176]
- [133] Lu, S.-Y. JING, Y.-X.; SHEN, S.-H.; ZHAO, H.-Y.; MA, L.-Q.; ZHOU, X.-J.; REN, Q.; LI, Y.-F., Antiporter Gene from *Hordium brevisubulatum* (Trin.). *Link and Its Overexpression in Transgenic Tobaccos.*, **2005**, *47*(3), 343-349.
- [134] Wu, C.; Gao, X.; Kong, X.; Zhao, Y.; Zhang, H. Molecular Cloning and Functional Analysis of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter Gene ThNHX1 from a Halophytic Plant *Thellungiella halophila*. *Plant Mol. Biol. Report.*, **2008**, *27*(1), 1-12. [http://dx.doi.org/10.1007/s11105-008-0048-1]
- [135] Maughan, P. J. M. J.; Turner, T. B. T. B.; Coleman, C. E. C. E.; Elzinga, D. B. E. B.; Jellen, E. N. J. N.; Morales, J. A. M. A.; Udall, J. A. U. A.; Fairbanks, D. J. F. J.; Bonifacio, A. B. Characterization of Salt Overly Sensitive 1 (SOS1) gene homoeologs in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **2009**, *52*(7), 647-657.
- [136] Wang, X.; Yang, R.; Wang, B.; Liu, G.; Yang, C.; Cheng, Y. Functional characterization of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from alkali grass (*Puccinellia tenuiflora*). *Mol. Biol. Rep.*, **2011**, *38*(7), 4813-4822. [http://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-0624-y] [PMID: 21153767]
- [137] Yang, Y.; Tang, R.J.; Jiang, C.M.; Li, B.; Kang, T.; Liu, H.; Zhao, N.; Ma, X.J.; Yang, L.; Chen, S.L.; Zhang, H.X. Overexpression of the PtSOS2 gene improves tolerance to salt stress in transgenic poplar plants. *Plant Biotechnol. J.*, **2015**, *13*(7), 962-973. [http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12335] [PMID: 25641517]
- [138] HUERTAS, R.; OLÍAS, R.; ELJAKAOUI, Z.; GÁLVEZ, F. J.; LI, J.; DE MORALES, P. A.; BELVER, A.; RODRÍGUEZ-ROSALES, M. P., Overexpression of SISOS2 (SICIP-K24) confers salt tolerance to transgenic tomato. **2012**, *35*(8), 1467-1482.

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

### III.2.3. Synthèse

La récente publication du génome de l'arganier (Khayri *et al.*, 2018) a généré de nouvelles opportunités pour des études précises à l'échelle de son génome et a ouvert la piste vers une identification des gènes ou des protéines candidats *via* des études *In silico*. Ces candidats peuvent ensuite être utilisés à des fins d'amélioration de la tolérance de cette espèce face aux conditions stressantes telles que le stress hydrique et le stress salin.

La salinité provoque une toxicité ionique et une sécheresse physiologique, limitant ainsi la croissance et la productivité des plantes (Munns et Tester, 2008). Les gènes NHXs font partie des gènes impliqués dans la régulation du stress salin. Ils sont présents dans les cellules végétales et maintiennent l'homéostasie ionique en jouant un rôle dans l'extrusion des ions Na<sup>+</sup> hors de la cellule et la compartimentation des ions Na<sup>+</sup> dans la vacuole (Munns et Tester, 2008).

En adoptant l'approche gène candidat, nous avons identifié quatre gènes codant des protéines antiporteurs NHX chez *Argania spinosa* L. qui sont désignés comme AsNHX1, AsNHX2, AsNHX3 et AsNHX4 sur la base de la nomenclature proposée dans la classification des gènes d'autres plantes comme *A. thaliana* L. et *P. trichocarpa* L. Ces gènes prédits ont été distribués sur quatre *scaffolds* et les informations détaillées sur les séquences codantes et leurs correspondances en acide aminés sont listées dans l'annexe 3. À titre de comparaison avec d'autres plantes, le nombre de NHXs identifiés dans l'*Argania spinosa* L. était proche de celui de *Beta vulgaris* L. (5 membres) (Wu *et al.*, 2019) et de *Vitis vinifera* L. (6 membres) (Ayadi *et al.*, 2020). Cependant, il était significativement inférieur à celui présent chez *Populus trichocarpa* L. (8 membres) (Tian *et al.*, 2017) et *Punica granatum* L. (10 membres) (Dong *et al.*, 2021). La présence du nombre assez réduit de gènes NHX codés chez l'arganier pourrait être due en partie à l'absence d'événements de duplication au cours de l'évolution de son génome.

La longueur de la séquence génomique des quatre séquences varie de 732 à 2166 pb, correspondant à des séquences protéiques de 243 à 721 aa, avec une masse moléculaire de 26,87 (AsNHX4) à 80,39 kD (AsNHX3). De plus, l'analyse des hélices transmembranaires a montré une variation dans leurs nombres allant de 5 à 11 hélices transmembranaires (Annexe 4). Il a été démontré que le site putatif de liaison à l'amiloride et le pore traversant la membrane sont hautement conservés dans les familles de gènes NHX (Brett *et al.*, 2005 ; Rodríguez *et al.*, 2009 ; Bassil *et al.*, 2012), qui possèdent une séquence d'acide aminée composée de "FFIYLLPPI" (Bassil *et al.*, 2012). Ce domaine sert à inhiber l'échange Cation/Proton en présence de la substance 'amiloride' et/ou de ses dérivés (Wu *et al.*, 2011).

Dans la présente étude, le site de liaison à l'amiloride est situé dans TM3 de l'extrémité N-terminale et se trouve dans tous les gènes AsNHX. Des domaines similaires ont été observés chez diverses espèces telles que *A. thaliana*, *P. trichocarpa*, *V. vinifera* et *S. bicolor* (Tian *et al.*, 2017 ; Ayadi *et al.*, 2020 ; Hima Kumari *et al.*, 2018).

Pour mieux comprendre les relations phylogénétiques entre les gènes AsNHX, nous avons généré un arbre phylogénétique à partir des séquences d'acides aminés déduites de l'*Argania spinosa* L. (4 AsNHX) ainsi que celles des espèces modèles *Arabidopsis thaliana* L. (8 AtNHX) et *Populus trichocarpa* L. (8 PtNHX). L'analyse phylogénétique a révélé que tous les gènes ont été réparties en trois classes : vacuolaire, endoplasmique et membrane plasmique. Par ailleurs, les quatre NHXs d'*Argania spinosa* étaient regroupés dans une seule classe selon leurs localisations vacuolaires (AsNHX1, AsNHX2, AsNHX3 et AsNHX4). En outre, l'analyse de localisation subcellulaire prédite a montré l'emplacement de tous les AsNHX au niveau vacuolaire. Contrairement à l'*Arabidopsis* et le peuplier, aucun membre localisé au niveau des compartiments endosomale ou membrane plasmique n'ont été identifiés chez l'espèce *Argania*. Des études antérieures ont prouvé que les protéines NHX de la classe vacuolaire peuvent être significativement induites par le stress salin et peuvent augmenter la tolérance des plantes au Na<sup>+</sup> (Liu *et al.*, 2008 ; Xu *et al.*, 2013 ; Sun *et al.*, 2017). Cela pourrait indiquer que le mécanisme de tolérance au NaCl de l'arganier était principalement dû à la compartimentation du sodium dans les vacuoles. La diversité structurelle exon/intron, un élément important dans l'évolution des familles de gènes, fournit des preuves supplémentaires à l'appui des classes phylogénétiques. Il est intéressant de noter que, chez l'arganier, le nombre d'intron et la longueur d'exon était relativement diversifié entre les séquences NHXs de la même classe. Ces séquences contiennent entre 6 et 19 exons. Le plus faible nombre est observé dans le NHX4 (6 exons), tandis que le NHX3 possède le nombre le plus élevé avec 19 exons. Tian *et al.*, (2017) ont recensé les membres de la famille NHX chez le peuplier et ont montré qu'ils possèdent entre 14 et 22 exons. Chez d'autres espèces comme *Punica granatum* L. (Dong *et al.*, 2021) et *Beta vulgaris* L. (Wu *et al.*, 2019) possèdent 13 à 23 et 14 à 26 exons, respectivement.

L'ensemble des données générés *In silico* a fait l'objet d'une deuxième publication et peut constituer une base pour les recherches futures notamment la caractérisation moléculaire et l'étude de l'expression des gènes NHX prédits sous différentes conditions, afin de pouvoir l'exploiter efficacement dans un programme d'amélioration génétique de la tolérance aux stress abiotiques chez l'arganier.

### **III.3. Étude de l'expression des gènes Aquaporines impliqués dans la tolérance au stress hydrique chez *Argania spinosa* L.**

#### **III.3.1. Contexte**

*Argania spinosa* L. est largement distribuée dans les régions arides et semi-arides. Elle est connue par sa capacité à croître et à se développer dans ces conditions stressantes, car elle peut supporter de longues périodes de stress hydrique. Cette faculté adaptative de l'arganier peut être liée au contrôle du transport de l'eau au niveau des membranes. Dans la plante, le mouvement de l'eau a lieu à travers trois grandes voies possibles : apoplastique, symplastique et transcellulaire (Johansson *et al.*, 2001). Au niveau de ce dernier, c'est les petites protéines membranaires intégrées appelées aquaporines (AQPs) qui assurent le passage de l'eau (entrée et sortie) au travers des membranes (Li *et al.*, 2014). Elles jouent des rôles importants dans les relations sol-eau et sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques, notamment la germination, la photosynthèse, le mouvement stomatique et la réponse au stress abiotique (Kapilan *et al.*, 2018), en particulier le stress hydrique.

Dans la littérature, aucune étude n'a été menée sur les aquaporines de l'arganier, bien que le draft du génome était séquencé et disponible dans la base de donnée NCBI. Dans ce contexte, cette étude visait à identifier et caractériser tous les gènes codant des aquaporines de l'arganier en utilisant des méthodes *In silico*. De plus, les propriétés structurelles telles que les relations phylogénétiques, la structure exon/intron, la localisation subcellulaire, les motifs et les domaines conservés et la simulation 3D de différents gènes prédits ont été analysés. Une intention particulière sera portée sur l'étude de profil l'expression des gènes d'aquaporines au niveau des feuilles de jeunes plants d'arganier sous trois traitements hydriques d'eau (100% CC, 50% CC et 25% CC) et un arrêt total d'irrigation. En outre, des trait physiologiques et biochimiques ont été examinés.

Les travaux de ce chapitre font l'objet d'une publication en cours de préparation. Ils sont ainsi présentés en anglais dans le format de la publication.

### III.3.2. Article 3: en cours de préparation

#### **Genome-wide identification and analysis of the AQP gene family in Argan tree (*Argania spinosa* L.)**

##### III.3.3. Abstract

The Aquaporin (AQP) gene family constitutes a large and diverse family of protein channel transporter in plant and plays a key role of regulation and movement of water and other small molecules across membranes. However, the information concerning this protein family in **Argan** tree (*Argania spinosa* L.), is not yet been reported. In the present study, a genome-wide analysis was carried out to identify AQP genes in *Argania spinosa* L, an endemic species of Morocco perfectly adapted to aridity and drought stress, and plays an important major ecological and socio-economical role. A total of 23 non-redundant AQP genes were retrieved from Argan genome. Conserved motif analysis showed that all of the identified AsAQPs had the conserved MIP domain and two motifs NPA. Based on the phylogenetic analysis results, AsAQP candidate genes could be assigned into five subfamilies including, 9 of plasma membrane (PIPs), 7 of tonoplast (TIPs), 5 of NOD26-like (NIPs), 1 of small basic (SIPs), and 2 of x-intrinsic proteins (XIPs). Additionally, gene structure analysis was generally conserved with each subfamily, and suggested that the number of the exons in AsAQP genes ranging from 2 to 5. The deferential expression of all candidate AsAQPs will be studied in leaves of young seedlings of Argan under different stress treatments.

Overall, this was a first study systematically analyses the Argan AQP gene family and these findings could provide valuable recourse for the further functional studies of AQP genes towards understanding their role in stress adaptation.

**Key words:** Argan tree, AQP, drought stress, genome wide analysis

### III.3.4. Introduction

Aquaporins (AQPs), are integral membrane proteins that facilitate selective transport of water and many other solutes including urea, ammonia, silicic acid, carbon dioxide and boric acid across biological membranes (Deshmukh and Bélanger, 2016) and/or (Groszmann *et al.*, 2017). They are belonging to a large family of channel proteins called Major Intrinsic Protein (MIPs), and are found in almost all living organisms from archae to eukaryotes (Gomes *et al.*, 2009). The Plant kingdom harbors a remarkable AQP abundance and diversity, which can be traditionally classified into five major subfamilies, according to their sequence similarities and phylogenetic distribution, including plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), tonoplast intrinsic proteins (TIPs), Nod26-like intrinsic proteins (NIPs), small and basic intrinsic proteins (SIPs), and uncharacterized X intrinsic proteins (XIPs) (Bienert *et al.*, 2011; Maurel *et al.*, 2015). Additionally, three subfamilies were also found in primitive plants including, glycerol GlpF-like intrinsic proteins (GIPs) and LIPs (large intrinsic proteins) have been isolated from algae and mosses, respectively (Gustavsson *et al.*, 2005; Khabudaev *et al.*, 2014) and the hybrid intrinsic proteins (HIPs) from lycophytes and mosses (Anderberg *et al.*, 2012). Aquaporins, small membrane proteins (21-34 kD), are constituted by four monomers, that together occur as stable tetramers in which each monomer act independently as functional water channel (Maurel *et al.*, 2008). Each monomer is configured by six transmembrane (TM) domains ( $\alpha$ -helices, H1 to H6) that are connected by five short loops (LA-LE). Two highly conserved NPA “Asparagine-Proline-Alanine” motifs, located in LB and LE loop, which has the primary function of forming water-selective channels (Bansal and Sankararamakrishnan 2007). An additional important constriction referred as the aromatic/arginine (ar/R) selectivity filter is formed at the extracellular side of the pore by four amino acid residues contributed by transmembrane helices H2/H5 and the loop LE (Hove and Bhave, 2011). Variability at the ar/R selectivity filter is thought to transport a great diversity of solutes in plant aquaporins (Azad *et al.*, 2012). Also, five relatively conserved amino acid residues known as the Froger’s residues (P1-P5), play critical roles in the discrimination between the transport of molecules (Heymann, and Engel, 2000 ; Froger *et al.*, 1998).

Structural and functional information of aquaporins that were validated experimentally has led to identification of their orthologs in various plants including model species, *Arabidopsis thaliana* (Johanson *et al.*, 2001) and *Populus trichocarpa* (Gupta and Sankararamakrishnan, 2009), and in other woody plant like *Acacia auriculiformis* (Zhang *et al.*, 2021), *citrus sinensis* (Wei *et al.*, 2019), *coffea canephora* (Yaguinuma *et al.*, 2021), *Betula pendula*

(Venisse *et al.*, 2021). Previous reports have demonstrated the extensive involvement of aquaporins in physiological process under environmental conditions such as drought stress (Zhu *et al.*, 2019) and they may be linked to greater adaptability to local conditions.

Argan (*Argania spinosa* L.) is an endemic species Southwestern Morocco, and it is the only representative of the tropical family of Sapotaceae. The great importance of Argan is not due not only to its socio-economic and ecological importance but also to its contribution to preserve the biodiversity of the forest's ecosystem (Msanda *et al.*, 2005). Argan tree, known by their ability to growth and develop in arid areas, has developed a series of physiological and biochemical mechanisms to adapt under drought stress conditions (Chakhchar *et al.*, 2016). This adaption may be related to the control of water and others solutes transport in membranes, pointing to aquaporins as one of the most interesting targets in these endemic species.

Until today, no study has been conducted on genome-wide identification, sequence characterization or the functional prediction of aquaporins in Sapotaceae, especially *Argania spinosa* L. To investigate the role of *A. spinosa* AQPs in response to drought stress, in this study we computationally identified AQP encoding genes according to the availability of draft genome sequence data for *A. spinosa*. We also investigated the structural properties, phylogenetic relationships, exon/intron structure, subcellular localization, 3D structures and protein motifs of AQPs in *A. spinosa*. Additionally, biochemical traits and the expression profiles of AQPs genes in leaves of *A. spinosa* under drought stress were examined. Collectively, the knowledge obtained from this study provide key fundamentals for exploring the functions and mechanisms of *A. spinosa* AQP proteins.

### III.3.5. Materials and Methods

#### Identification of *Argania spinosa* L. AQPs

##### Downloaded

To identify putative aquaporin (AQP) genes, BLAST homology search was adopted to search for the genes of *Argania spinosa* L. The aquaporin sequences (nucleotide and amino acid) of *Arabidopsis thaliana* and *Populus trichocarpa* were retrieved from TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>) and Phytozome databases (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) respectively. The 35 know AQP genes of *A. thaliana* and 54 of *P. trichocarpa* were used as probe sequences for searching predicted genes in *Argania spinosa* L. genome, available at the NCBI ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid85884\[orgn\]/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid85884[orgn]/)), using Tblastn programs.

The accession numbers of corresponding proteins used in the study are listed in supplementary table (Table S1). Then, the Pfam tool (<http://pfam.xfam.org/search/sequence/>) was used to examine if all obtained protein sequences were a member of the AQP gene family, and they were considered as potential AQP genes, if it encoding complete MIP domain and contain two NPA motifs. Additionally, the molecular weights (MW), theoretical isoelectric point (pI) for the predicted proteins were calculated by an Internet server, ExPasy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)). Transmembrane domains (TMs) of the AsAQPs were assessed by MEMSAT-SVM prediction method available in Phyre2 server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelly *et al.*, 2015), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh *et al.*, 2001), and their subcellular localization were predicted through Plant-mPLoc5 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) and WolfPsort.

### **Phylogenetic analysis and multiple sequence alignments**

The obtained amino acid sequences from Argan genome and those of Arabidopsis and the model tree plant popular were used to understand the evolutionary of the *Argania spinosa* L. AQP genes. Multiple sequence alignment of all sequences was performed using Clustal Omega program (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) and a phylogenetic tree was generated by MEGA-X program using Maximum Likelihood tree method, with the bootstrap test replicated 1000 times.

### **Conserved motifs and gene structures of Argan AQP genes**

To identify the conserved motifs, the deduced AsAQP protein sequences were analyzed with the MEME online program (<http://meme-suite.org/tools/meme/>, Bailey *et al.*, 2009). The parameters of MEME as follows: maximum number of motifs set at 10, a minimum width of 6 and a maximum width of 20. The other parameter setting were default values. Furthermore, conserved NPA motifs, air/R selectivity filter (H2, H5, LE1, and LE2), and analysis of Froger's positions were identified by visual alignment inspection compared with *Arabidopsis thaliana* and *Populus trichocarpa* AQPs.

Diverse exon-intron organization of AsAQP genes were analyzed with Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) based on genes coding sequences and their corresponding genomic DNA sequences.

### **Tertiary protein structure prediction**

The three-dimensional (3D) structure of protein sequences of AsAQPs were generated by server Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelly *et al.*, 2015) with 'Normal' mode. The result generated in the form of PDB files from Phyre2 were

then uploaded to the PoreWalker server to predict tertiary protein structure (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PoreWalker/>) (Pellegrini-Calace *et al.*, 2009).

### Plant material and drought treatment

Argan ecotypes (Rbai, Admin, Aoulouz and Lkhsass), from four contracting habitats were subject to water regimes: 100 % Failed Capacity (FC), 50% FC, 25 % FC, and one not undergoes any irrigation (0% FC) for 45 days. During the experiment, the pots were weighted and were re-watered daily to different FC by adding the amount of water transpired every day to maintain requisite field capacity.

A total of 48 samples plant (12 samples per ecotype) were collected (Figure 1) in triplicate from the young leaves of Argan seedling. Two biological replicates per sample were used for RNA expression study, and each biological replicate consisted of a pool of three plant RNAs.

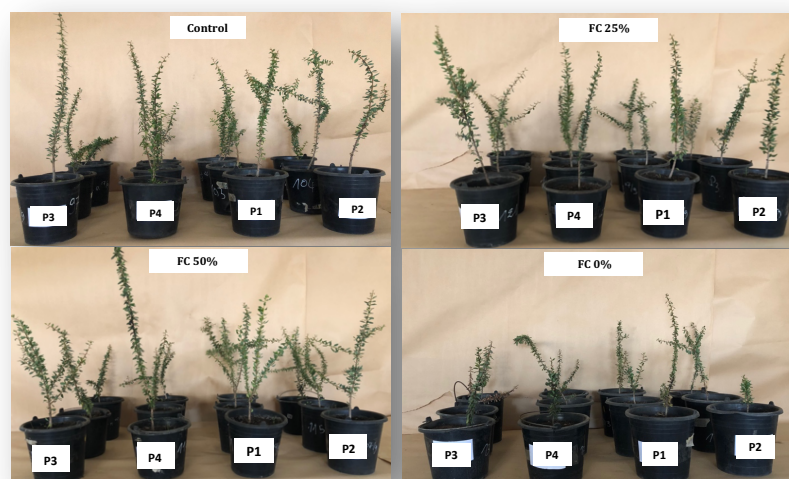


Figure 1: Seedling of *Argania spinosa* L. ecotypes under drought stress (45 days). P1: Rbai; P2: Admin; P3: Aoulouz; P4: Lkhsass; FC100%: Control; FC 0%, FC25% and FC50%: Drought stress

### RNA isolation and qRT-PCR analysis

After stress treatment, leaf samples were sampled and immediately frozen in liquid nitrogen than stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , until RNA extraction. Total RNA was isolated from leaf tissue from stressed and control plants of all ecotypes using RNeasy® Plant Mini Kit following the manufacturer's guidelines. After extraction, approximately  $1\ \mu\text{g}$  of total RNA was treated with DNase I (RNase-free) in order to remove contaminating genomic DNA. Purity and integrity of RNA were estimated by calculating A260/A280, A260/A230 absorbance ratios and agarose gel (1.5%) electrophoresis analysis respectively. The RNA was then reverse transcribed to complementary DNA (cDNA) using QuantiTect Reverse Transcription Kit. All

specific primers for the target genes and Argan ACT, were designed with the Primer3 software (Untergasser *et al.*, 2007) to amplify 102–193 bp PCR products specific for each *AQP* gene (Table 1).

Table 1: qRT-PCR primers of the 23 AsAQP and 3 housekeeping genes

Gene names	Sequences (5'→3')	Length (pb)	Tm	%GC	Amplicon size (pb)
PIP1F	TCAGCGGCATGATCTTTACC	20	58	50	102pb
PIP1R	ACAACCTCCTCTCCAGAAGCAG	22	60	50	
PIP1F	CGTAACGCTAGGGACTTCCA	20	60,2	55	159pb
PIP1R	CCAGGCGTGTCCTTATTGT	20	59,9	50	
PIP2F	TTGGCGGCATGATCTTCATC	20	58,7	50	186pb
PIP2R	TCTGGAATGCCTTCACCAAC	20	58,1	50	
PIP2F	TTCATCCTCGTCTACTGCACAG	22	59,1	50	124pb
PIP2R	ACTGCGCTATCATGTAAGCC	20	58,1	50	
TIP1F	TCGCAATTGGGTTTCATCGTC	20	58	50	144
TIP1R	TGAAGACTAGCTCGTAGACGAC	22	60	50	
TIP3F	ACACGCCTTAGGTCTGTTTG	20	58,1	50	128pb
TIP3R	AGTAGTACAAGGCACGGATGAG	22	59,6	50	
TIP4F	TTTGTTCGCGCGGTGTTGG	20	60,2	50	130pb
TIP4R	CCATCGACACACCAACAAAGAG	22	59,8	50	
SIP2F	AAGGGGAAGCGATCAAATGC	20	58,9	50	142pb
SIP2R	AAGAGGAAGCGGCTGAAATC	20	58,3	50	
SIP2F	TCGGGCTTTCAAGAAACATC	20	60	45	171pb
SIP2R	TGTGCTCCTTGGTGGTATGA	20	60	50	
ACTF	TGGGTTGCTGGTGATGATG	20	58,5	50	193pb
ACTR	TTCCATGTCATCCAGTTGC	20	58,2	50	
UBQF	ATTTGGTGCTGCGTTTGAGG	20	59,7	50	169pb
UBQR	TTGCCAGCGAAGATCAGACG	20	60,7	55	
TUBF	TAAAGCTCAGCAACCCAACC	20	58,4	50	182pb
TUBR	AGAAGTGAGCGGTGCAAAAC	20	59,3	50	

For qRT-PCR analysis, the reactions were performed in 20  $\mu$ L volume using SYBER Green PCR on Noun System (made in) according to the manufacturer's instructions.

### ***Biochemical and enzymatic parameters***

#### ***Extraction and enzyme activity assay***

Crude extract was prepared by homogenization of the Argan plant leaf powder (100mg) by adding 3ml of 100 mM of PBS (Sodium Phosphate Buffer) (pH 7.8), containing 5mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 5mM EDTA and 2% PVP. The homogenate was transferred to two 1.5ml centrifuge tubes and then centrifuged at 10.000g for 20min at 4°C. The upper phase, which contains the proteins was collected and then used for the determination of proline and MDA activities (Chen and Zhang (2016)). The concentration of protein ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) was assayed according to the Bradford (1976) method using BSA (Bovine Serum Albumin) as a standard.

### Proline content

Proline content was determined spectrophotometrically at 560nm using described method with L-proline as standard (Chen and Zhang (2016). Briefly, 50µl crude enzyme extract into 1ml reaction solution which contain 10 mL 3% sulphosalicylic, 10 mL acetic acid and 20 mL 2.5% acid-ninhydrin. The mixed solutions were boiled at 100°C for 15mn. After incubate in water-ice bath for 5 min, the absorbance of organic phase was read at 520 nm and the concentration pf proline was determined using L-proline curve as standard. Proline level was expressed as “µg\*g<sup>-1</sup> of fresh weight.

### Soluble sugar

Total sugar was extracted by homogenizing 30mg fresh leaves in 80% (v/v) ethanol as previously described ( Dubois *et al.*, 1956). The homogenate was incubated at 80°C for 1h, and centrifugate at 5000g. The supernatant (10 µl) was mixed with 5% phenol (200 µl) then added 1ml sulphuric acid. The reaction mixture was left to stand for 10 min, vortexed (30s) then placed at room temperature for 20 min. The absorbance was read spectrophotometrically at 490 nm and D-glucose was used as the external standard. The total sugar content was expressed in mg g<sup>-1</sup> of fresh material plant.

### Total phenolic content

The total phenols were determined according to Ainsworth and Gillespie (2007). Briefly, 20 mg of the tissue was mixed with 2 ml ice-cold 95% (vol/vol) methanol and incubated at room temperature for 48h in the dark. After centrifugation (13.000g/5min), 25 µl of extract was mixed with 200 µl of Folin-Ciocalteu reagent (10%). The solution was shaken vigorously by vortex then 800 µl of NaCo<sub>3</sub> (700mM) was added and incubated at ambient temperature for 2h. Absorbance was measured at 765nm and the total phenolic content was calculated using the standard gallic acid curve. Total phenolics was expressed as gallic acid equivalents (mg of FM).

### Chlorophyll content

The content of the chlorophyll a, b and carotenoid were determined spectrophotometrically in 80% acetone (v/v) and 0,1% CaCo<sub>3</sub> (w/v). The extract was centrifugate at 3000 rpm for 10 min and the solution was recorded at 663, 645 and 470 nm for chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid respectively. The proportion among pigments were calculated according to the equations proposed by Lichtenthaler (1987).

MDA assay

Lipid peroxidation was quantified by the thiobarbituric acid test for malondialdehyde (MDA) according (Chen and Zhang (2016). 100 µl of crude enzyme was added into 1ml 0,25% TBA solution. The reaction mixture was boiled in a boiling bath for 15 min and coul down reaction mixture on ice for 5 min MDA was measured using thiobarbituric acid with absorbance measured at 532 and 600 nm.

**Statistical analysis**

All data were subjected to two-way analysis of variance (ANOVA) using Prism to test the effect of drought stress and ecotypes. the mean was compared using Dunnet's test.

**III.3.6. Results****Genome-wide identification of AQPs in *Argania spinosa* L.**

In the current study, to acquire probable AQP genes, the nucleotide and amino acid sequences of 35 AtAQP and 54 PtAQP were used to carry out Blast alignment against the *Argania spinosa* L. reference genome. After removal of the sequence's redundancies and incomplete AQP domain, a total of 23 gene sequences, encoding putative *loci* of the AQP family, were identified in *A. spinosa* L., which were designated as AsPIP, AsTIP, AsNIP, AsSIP and AsXIP based on nomenclature propose in gene classification of other plants like Arabidopsis and guided by similarity and phylogenetic analysis. The identified genes had amino acid lengths in varying from 232 amino acid residues (AsTIP2, 1) to 311 amino acid residues (AsPIP2, 7). The great majority of AQPs were predicted have six transmembrane helices (TMHs), while the rest have only five TMHs. Characteristic analysis indicated that the molecular mass ranged from 21.9kD (TIP1, 3) to 33.5kD (PIP2,7), with theoretical isoelectric points from 5 (TIP1,3) to 9 (SIP2,1). Furthermore, the predicted subcellular localization analysis showed the location of all AsAQP between the cell membrane and vacuole (Table 2).

Table 2: Identification of aquaporin genes in *Argania spinosa* L. genome data.

Sub-Family	Putative name	Locus/Contig ID	Protein (aa)	CDS (pb)	gDNA (pb)	PI	MW (KD)	TM	Subcellular Localization
<b>PIP</b>	AsPIP1.1	QLOD01071110.1	284	855	1692	7	30.6	5	Cell membrane
	AsPIP1.5	QLOD01074664.1	286	861	2718	8.29	30.57	5	Cell membrane
	AsPIP1.4	QLOD01025087.1	286	861	1567	7.70	30.52	6	Cell membrane
	AsPIP2.6	QLOD01018981.1	293	882	1572	8.20	30.8	6	Cell membrane
	AsPIP2.2	QLOD01063671.1	280	843	1234	9.0	29.82	6	Cell membrane
	AsPIP2.7	QLOD01072183.1	311	936	2976	8.55	33.5	6	Cell membrane
	AsPIP2.5	QLOD01074450.1	287	864	2412	7.65	30.6	6	Cell membrane
	AsPIP2.4	QLOD01003762.1	289	870	3376	8.6	30.6	6	Cell membrane
	AsPIP2.3	QLOD01063582.1	297	894	6623	9.16	31.8	6	Cell membrane
<b>TIP</b>	AsTIP3.2	QLOD01003778.1	264	795	1035	6.8	28	6	Vacuole
	AsTIP1.3	QLOD01030464.1	212	639	1562	5	21.9	5	Vacuole
	AsTIP2.3	QLOD01016044.1	250	753	4312	4.9	25.3	6	Vacuole
	AsTIP2.1	QLOD01000771.1	232	699	1517	5.9	24.06	5	Vacuole
	AsTIP4.1	QLOD01061678.1	249	750	2984	6.3	25.8	6	Vacuole
	AsTIP5.2	QLOD01006593.1	268	807	1989	7.01	27.4	6	Cell membrane
	AsTIP1.1	QLOD01024703.1	256	771	1785	5.56	26.38	6	Vacuole
<b>NIP</b>	AsNIP1.5	QLOD01023144.1	279	840	3613	6.05	29.7	6	Cell membrane
	AsNIP1.2	QLOD01007643.1	281	846	3688	9.19	29.44	6	Cell membrane
	AsNIP1.1	QLOD01007643.1	293	882	5833	5.34	31.49	6	Cell membrane
	AsNIP7.1	QLOD01064041.1	303	912	4430	7.74	32	6	Cell membrane
	AsNIP5	QLOD01062335.1	299	900	3221	8.88	30.86	5	Cell membrane
<b>XIP</b>	AsXIP1.2	QLOD01026343.1	309	930	1643	7.08	33.2	6	Cell membrane
<b>SIP</b>	AsSIP2.1	QLOD01019018.1	241	725	2806	9.34	26.14	5	Cell membrane

aa, amino acid; MW, molecular weight; pI, isoelectric point, TM, transmembrane helices.

In this work, to determine the evolutionary relationship of aquaporin gene families in Argan tree, the AsAQP with AQP from two others species are compared (Table S1). Of these, based on amino acid sequences, a phylogenetic tree was constructed using 112 genes from three species (*Argania*, 23; *Arabidopsis*, 35 and *Populus*, 54) by MEGA-X. As shown in Fig. 2, that AQP genes of *A. spinosa* L. were clearly classified into five distinct subfamilies (PIPs, TIPs, NIPs, SIPs, and XIPs). Interestingly, PIPs had the largest subfamily and contained 9 members, while the numbers of members in TIPs and NIPs subfamilies was 7 and 5, respectively. The XIPs and SIPs subfamilies had only one member for each one. In addition, PIPs, TIPs and NIPs subfamilies could be further clustered into different subgroups (Table 2, Fig. 2).

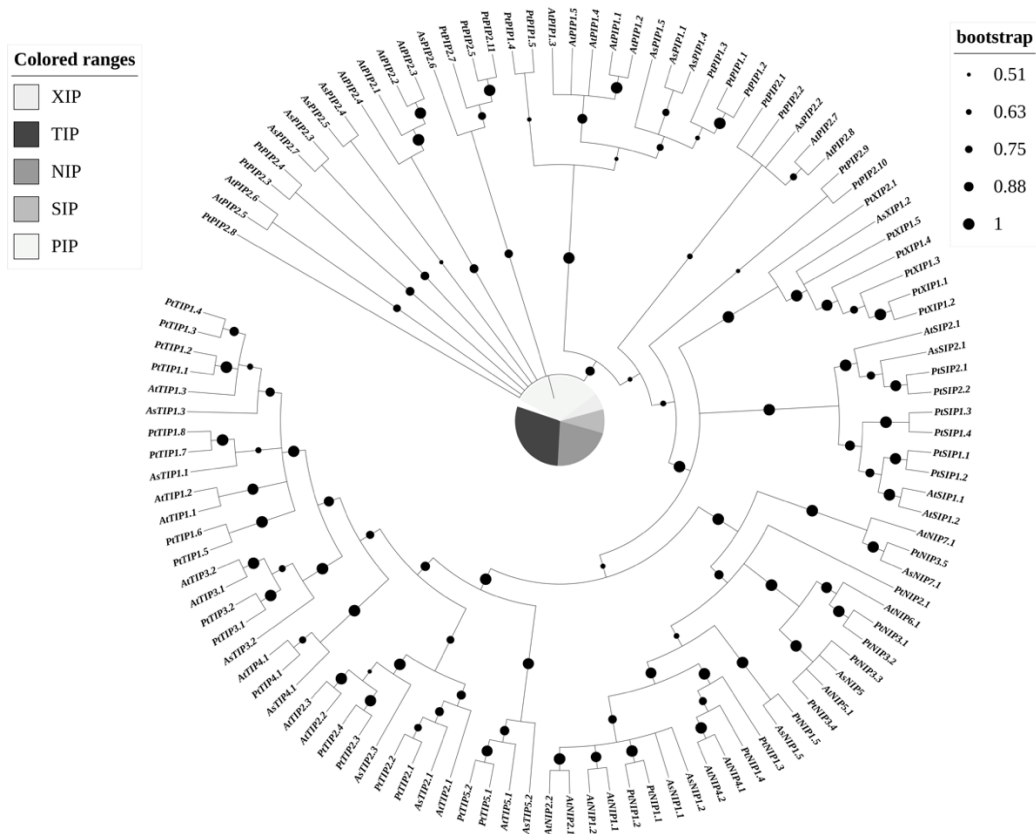


Figure 2: Phylogenetic tree of the Argan AQP family. The Maximum Likelihood phylogenetic tree was constructed based on the amino acid sequence alignments of Argan (23), Arabidopsis (35), Populus (54), using the MEGAX.0 software, with 1000 replicates

### Exon-Intron structure analysis

The exon-intron organizations of AsAQPs were obtained by the GSDS and were showed less variation among subfamilies but were relatively conserved within the same subfamily. The number of introns in Argan AQPs ranged from one (AsTIP1.1, AsTIP1.3) to four (AsNIP1.5, AsNIP1.2, AsNIP1.1, AsNIP7.1) introns, and all AsAQPs weren't revealed upstream and downstream except for AsPIP1.1 and AsTIP4.1. The most PIP subfamily was characterized by three introns with the exception AsPIP1.1 had two introns. In the TIP subfamily, four members had two introns and two members had 1 intron, but only one gene had three introns. The majority of AsNIP had four introns, while AsNIP5 had three. AsSIP2.1 and AsXIP1.1 formed small subfamilies in which each member had 2 introns (Fig. 3).

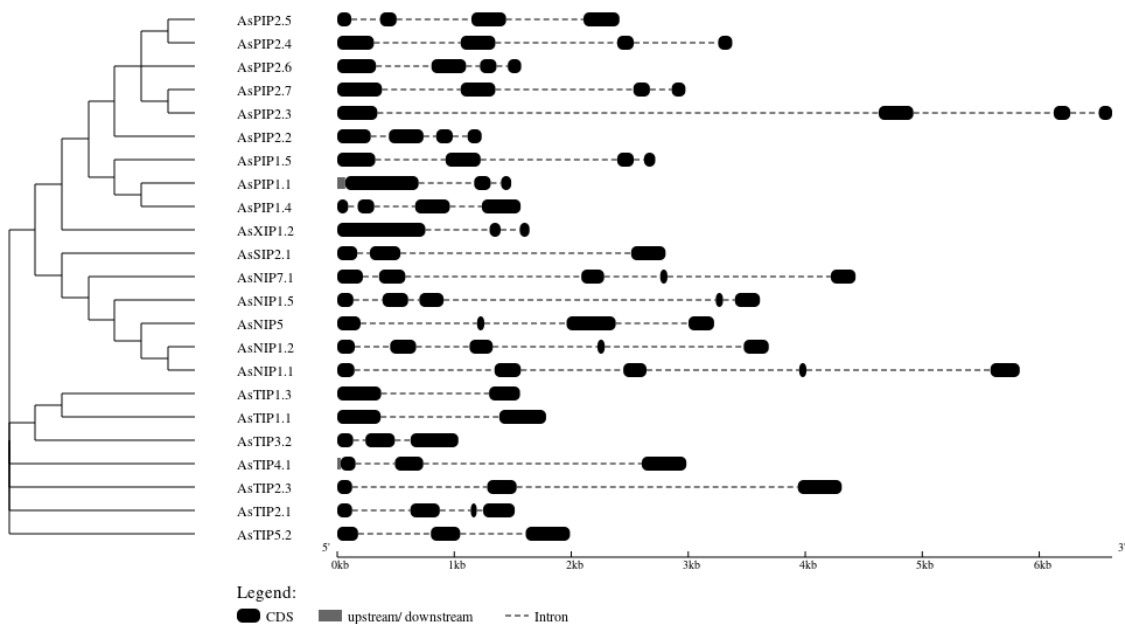


Figure 3: Exon-Intron structures of all Argan AQPs members

### Analysis of conserved, substrate determining amino acid residues

Ten conserved motifs were predicted as shown in Figure 4. The motifs 1, 2, 3 and 5 were widely found in all genes of aquaporins. The motif 4 was common with all genes, except for AsTIP2.1, AsSIP2.1 and AsXIP1.2. Motifs 6, 9 and 10 were limited in PIP subfamily members. The motif 7 was present in the PIP subfamily, 6 TIP members and 3 NIP members, while motif 8 was not detected in TIP2.1, SIP2.1, XIP2.1 and NIP7.1 (Fig. 4).

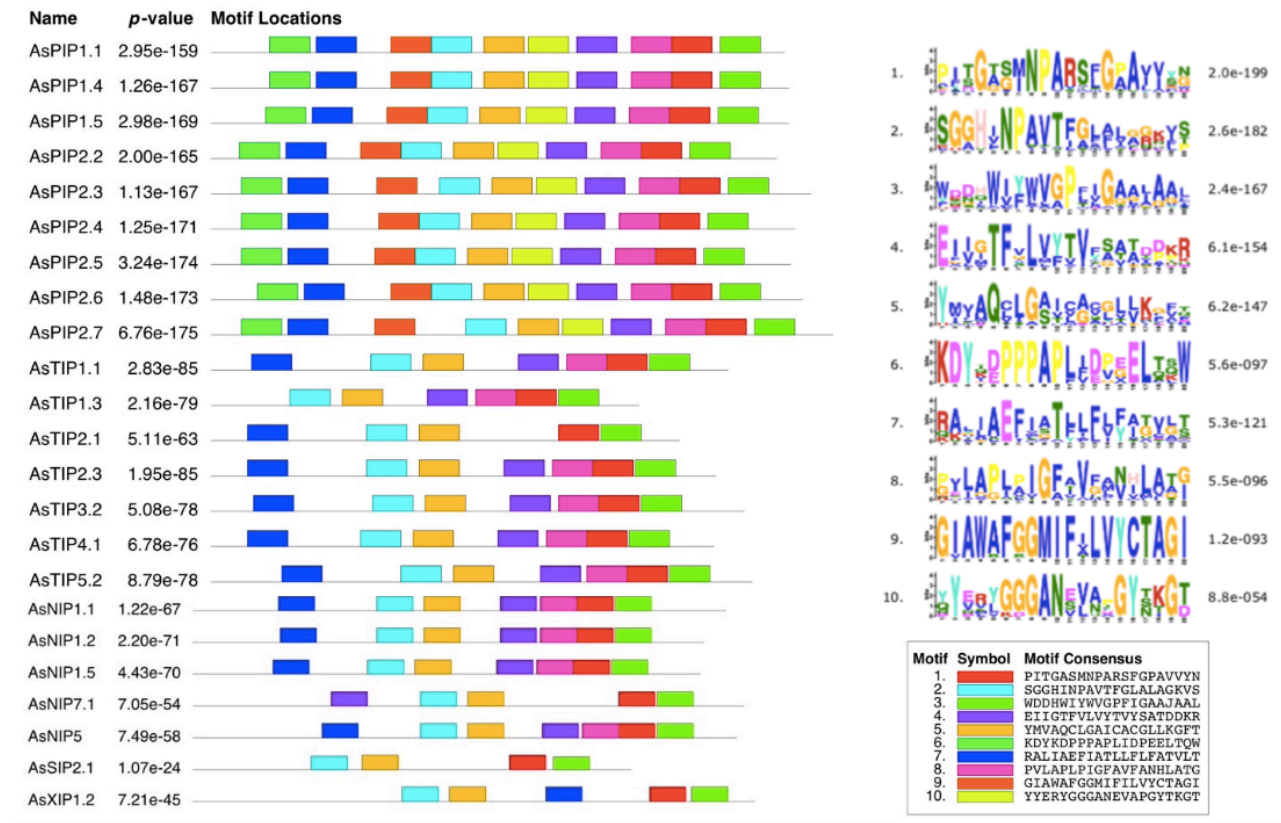


Figure 4: Distribution of conserved motifs in 23 *Argania spinosa* L. AaQP proteins based on the results of MEME analysis. Different color blocks represent different motifs

The Argan AQPs displayed differences in the residues at the NPA motifs, ar/R selectivity filter, and Froger's positions (Table 3). All AsPIPs and TIPs sub-families had two conserved NPA domains and showed the typical Asp-Pro-Ala residues of aquaporins. In the NIPs sub-family, the both sequence NPAs had conserved, except for AsNIP5, where the third residue A (Alanine) was replaced by a S (Serine) residue for the first motif, while in the second motif, the third position residue A (Alanine) was replaced by V (Valine). XIP and SIP aquaporins showed a second NPA motif completely conserved with the other sub-families, while the first NPA motif showed a replacement of Alanine (A) by Isoleucine (I) (AsXIP1.2) and Alanine (A) by Leucine (L) (AsSIP2.1).

Table 3: Comparison of functional residues among members of AsAQPs and number of introns and exons.

Gene name	Introns	Exons	Dual NPAs		Ar/R selectivity filter				Froger's position				
			1 <sup>st</sup> NPA	2 <sup>nd</sup> NPA	H2	H5	LE1	LE2	P1	P2	P3	P4	P5
AsPIP1.1	2	3	NPA	NPA	F	H	T	R	E	S	A	F	W
AsPIP1.5	3	4	NPA	NPA	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
AsPIP1.4	3	4	NPA	NPA	F	H	T	R	F	S	A	F	W
AsPIP2.6	3	4	NPA	NPA	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
AsPIP2.2	3	4	NPA	NPA	F	H	T	R	M	S	A	F	W
AsPIP2.7	3	4	NPA	NPA	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
AsPIP2.5	3	4	NPA	NPA	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
AsPIP2.4	3	4	NPA	NPA	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
AsPIP2.3	3	4	NPA	NPA	F	I	T	R	Q	S	A	F	W
AsTIP3.2	2	3	NPA	NPA	H	I	A	R	T	A	A	Y	W
AsTIP1.3	1	2	NPA	NPA	H	I	A	V	T	S	A	Y	W
AsTIP2.3	2	3	NPA	NPA	H	I	G	R	T	S	A	Y	W
AsTIP2.1	3	4	NPA	NPA	H	-	G	R	A	S	A	Y	W
AsTIP4.1	2	3	NPA	NPA	H	I	A	R	T	S	A	Y	W
AsTIP5.2	2	3	NPA	NPA	N	V	G	Y	T	S	S	Y	W
AsTIP1.1	1	2	NPA	NPA	H	I	A	V	T	S	A	Y	W
AsNIP1.5	4	5	NPA	NPA	G	A	A	R	F	S	A	Y	V
AsNIP1.2	4	5	NPA	NPA	W	V	A	R	F	S	A	Y	L
AsNIP1.1	4	5	NPA	NPA	W	V	A	R	F	S	A	Y	M
AsNIP7.1	4	5	NPA	NPA	G	V	G	R	Y	S	A	Y	I
AsNIP5	3	4	NPS	NPV	A	I	A	R	T	S	A	Y	W
AsXIP1.2	2	3	NPI	NPA	I	T	A	R	V	C	A	F	W
AsSIP2.1	2	3	NPL	NPA	A	I	G	S	F	V	A	Y	W

As shown in Table 3, different combinations of ar/R selectivity filters existed in different AsAQPs sub-families. The ar/R selectivity filter in all PIPs showed a conserved ar/R filter residue with Phenylalanine in H2, Histidine/Isoleucine at H5, Threonine at LE1 and Arginine at LE2. In TIP sub-family, H2 and H5 positions of ar/R filter were comprised of Histidine and Isoleucine, respectively, except for AsTIP5.2, which contains 'N' and 'V' residues, respectively. LE1 was constituted by Alanine/Arginine and LE2 was formed by R/Valine/H. The NIPs sub-family showed Glycine/W/Alanine in H2, Alanine/Valine/Isoleucine in H5, Alanine/Glycine in LE1 and Arginine in LE2. In AsXIP1.2 sub-group, the arR filter was comprised by Isoleucine (H2), Threonine (H5), Alanine (LE1) and Arginine (LE2), whereas AsSIP2.1 sub-group was characterized by Alanine (H2), Isoleucine (H5), Glycine (LE1) and S (LE2). Analysis of five Froger's positions, revealed that all of the AsPIP members exhibited highly conserved residues at the all five positions, while the usual 'Q' residue at the P1 position was replaced by an 'E', 'M' or 'F'. The TIP subfamily showed H at P4, 'W' at P5, 'A/T' at P1 and 'A/S' at both P2 and P3. In the AsNIP subfamily, the Froger's positions were

formed by 'F/Y/T', 'S', 'A', 'Y', 'I/L/M/V/W'. the P3 and P5 positions in the AsSIP and AsXIP subfamilies were constituted by 'A-W', while the position P1(F/V), P2 (C/V) and P4 (F/W) possessed variable residues.

### **Sequence similarities and Homology modeling of AsAQP proteins**

Sequence homology analysis of AsAQPs protein sequences reveals an immense diversity within and between the five subfamilies (Table S2). The highest sequence similarity of 63-88.7% was found within AsPIPs, and the lowest sequence similarity of 37.2-63.1% was found within AsNIPs. Thus, AsTIPs displayed high sequence similarity with AsPIPs and low with AaSIPs. Argan PIPs showed 28.8-43.1%, 28.2-33.3%, 23.2-32.3 and 21-28.8% sequence similarities with TIPs, XIPs, NIPs and SIPs, respectively. AsNIPs revealed sequence similarity of 23-32.8% with AsSIPs and 26.4-29.7% with AsXIPs. AsSIPs and AsXIPs shared sequence similarity of 40.6.

To understand their structural characteristics, AsAQP protein sequences were 3D modelled using phyre2 server, and the results are shown in Figure S2. All three-dimensional protein models were built with 100% confidence, and structural coverage varied from 82-99%, thus suggesting that the Argan aquaporins structure prediction are highly reliable and provides a preliminary basis to understand the molecular function of Aquaporin genes in *Argania spinosa* L. Further, the AsAQPs tertiary protein structure analysis confirmed the typical hour-glass model structure formed with six TM domains (H1 to H6) for all proteins analyzed except PIP1.1, PIP1.5, TIP1.3, TIP2.1, NIP5 and SIP2.1 (Table S2).

### **Physiological traits**

Proline and total sugar contents in *A. spinosa* were significantly influenced by both drought stress and ecotype (Table 4). Their content increased significantly only under 0% FC treatment compared to the control (100%FC) in all four ecotypes, except Admin, but in 50%FC and 25 %FC treatment did not show a significant difference (Fig. 5-A,B). The content of total phenolic content was not significantly different in Admin and Lkhssas ecotypes at all levels of drought stress (50%, 25% and 0% FC) in comparison with 100% FC (Control). Nevertheless, drought stress increased significantly the total phenolic content between control and 0% FC treatment in both ecotypes Rbai and Aoulouz (Fig. 5-C).

Table 4: Two-way ANOVA for the traits measured in Argan plant ecotypes under three drought stress treatments

Parameters	Ecotype (E)		Treatment (T)		E * T	
	F-value	Significance	F-value	Significance	F-value	Significance
Protein	10.04	NS	9.18	NS	11.43	NS
Chl a	26.84	**	4.16	NS	12.11	NS
Chl b	15.64	NS	2.46	NS	14.49	NS
Carot	9.65	NS	4.58	NS	20.63	NS
MDA	31.01	**	5.81	NS	13.86	NS
Total sugar	47.01	****	9.40	*	18.28	*
Total phenolic	22.25	**	12.34	NS	15.28	NS
Proline	52.25	****	7.47	*	21.78	**

\*, \*\*, \*\*\*, and \*\*\*\* indicate significance at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , and  $p < 0.0001$ , respectively. NS: non-significant.

The photosynthetic pigments (Chl a, Chl b and Carot) showed a not significant variation among ecotypes, both in control and drought treatments, but drought (0% FC) induced a significant increase of Chl a only in plants from Aoulouz ecotype (Fig. 5-F). Chl b showed non-significant variations in all analyzed ecotypes (Fig. 5-G).

MDA remained unchanged as the drought increased. In fact, is not a significant statistical difference between controls and plants under different water deficit treatments in all studied ecotypes. As similar to MDA, protein content in stressed plantlets recorded not significant changes, as compared to the corresponding non-stressed controls, in all four ecotypes (Fig. 5-D,E).

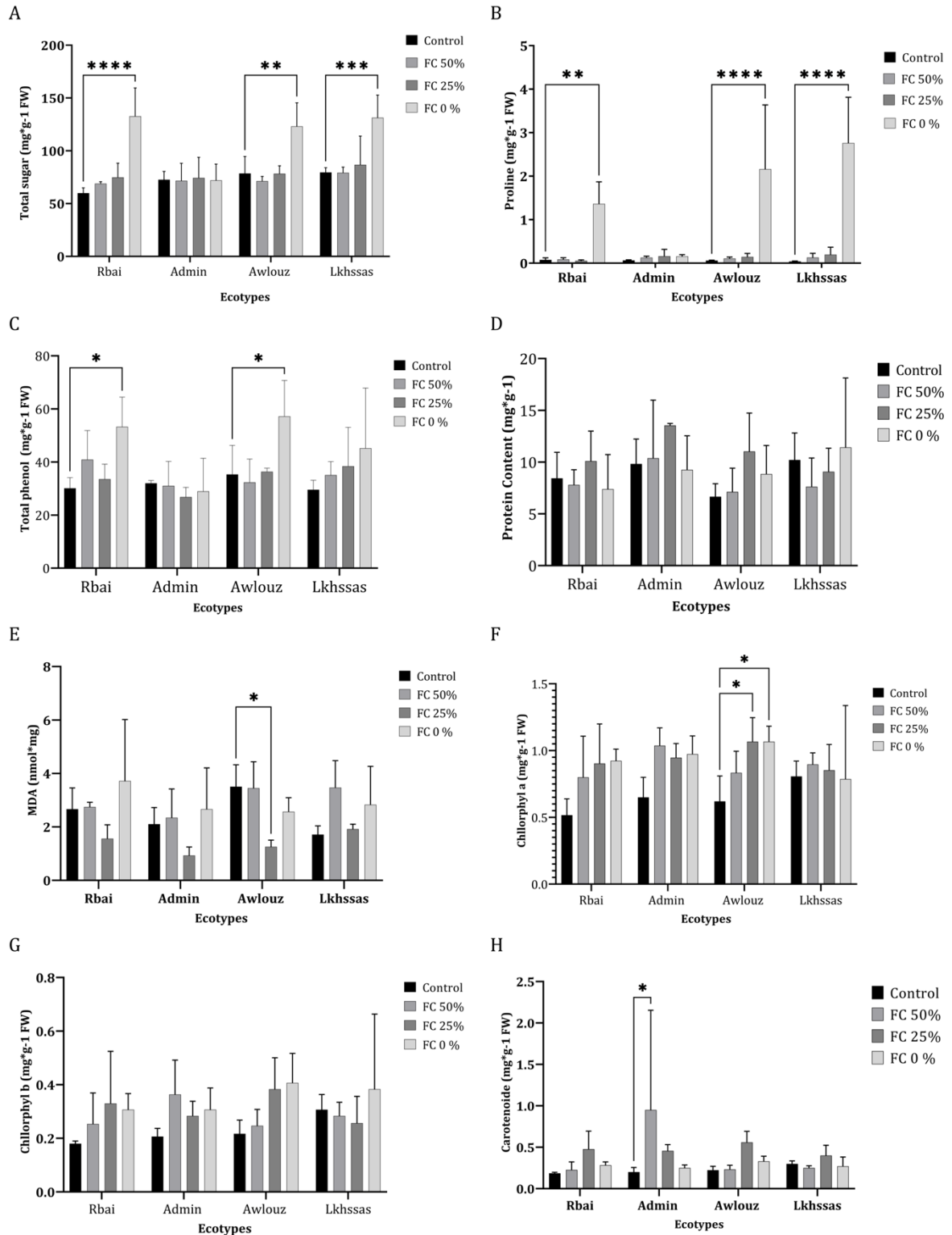


Figure 5: Physiological index of *AsAQP* genes in *Argania spinosa* L. plantlets exposed to different drought stresses (100 FC%, 50 %FC, 25% FC and 0% FC). Contents of total sugar (A), proline content (B), total phenol content (C), protein content (D), MDA (E), chlorophyll a content (F) chlorophyll b content (G), and carotenoides content (H) in plantlets exposed to drought stress for 45 days. Data are the means of three biological replicates; error bars indicate SD. Asterisks indicate significant differences between the control and Drought stressed plants using the Dunnett's test (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001)

## Expression profiles of AsAQP genes in response to drought treatments

### III.3.7. Discussion

Aquaporins, membrane transport proteins, involved in transport of water and/or small neutral solutes in plants (Maurel *et al.*, 2015), and exhibited a high diversity and abundance of isoforms. They are recognized to play a crucial function in varied physiological processes, and it is implicated in regulating plant growth and development. Also, several studies reported that plant aquaporins play a central role in plant stress response (Javot and Maurel 2002; Li *et al.*, 2014). With the rapid development of technologies in plant genome sequencing and the availability of the draft genome sequence of Argan would facilitate genome-wide analysis to identify the complete set of AQPs. The recent reports have been established on AQPs in plants, such as in *Coffea canephora* (Yaguinuma *et al.*, 2021), *Capsicum annum* (Uppuluri *et al.*, 2021) *Cucumis melo* (Lopez-Zaplana *et al.*, 2020), *Citrus sinensis* (Wei *et al.*, 2019) and *Betula pendula* (Venisse *et al.*, 2021). In this regard, understanding the distribution, phylogeny, structural features, and expression profiles of AQPs in an endemic plant species of Morocco, *A. spinosa* is of great importance.

In the present work, a first investigation of AQPs in *Argania spinosa* L. was performed to identify all the AQP members and perform their expression profiling. Herein, a total of twenty-three non-redundant aquaporin genes were identified from *A. spinosa*. The number of AQP identified in the Argan is comparable with other plants species, such as *Acacia auriculiformis* (21 members) (Zhang *et al.*, 2021), *Dianthus caryophyllus* L. (26 members) (Morita *et al.*, 2017), *Beta vulgaris* (28 members) (Kong *et al.*, 2017), grapevine (23 members) (Shelden *et al.*, 2009). However, it was significant lower than that observed for woody plants such as wild Olive (52 members) (Faize *et al.*, 2020), Sweet orange (34 members) (Wei *et al.*, 2019), Coffee (33 members) (Yaguinuma *et al.*, 2021), Silver birch (33 members) (Venisse *et al.*, 2021), Poplar (55 members) (Gupta and Sankararamakrishnan 2009), Rubber tree (51 members) (Zou *et al.*, 2015a), grapevine (23) (Shelden *et al.*, 2009) and physic nut (32 members) (Zou *et al.*, 2016). The relatively small number of AQP genes encoded in *Argania spinosa* L. could be due to the incomplete genome sequencing or might have resulted from the absence of either genomic or random duplication events during their genome evolution, as opposed in Poplar, Flax and Olive for which experienced many such duplication events (Cohen *et al.*, 2013, Shivaraj *et al.*, 2017, Faize *et al.*, 2020). The increase of AQP members is most likely related to whole-genome duplication events (Abascal *et al.*, 2014). The AQP gene families may have expanded through duplication (Abascal *et al.*, 2014 and Deshmukh *et al.*, 2016), although variations in the number of genes between species may

be related to the size of their genomes and/or evolutionary processes for adaption in the natural environment.

Overall, Argan aquaporins are clustered into five distinct subfamilies: AsPIP (9), AsTIP (7), NIP (5), SIP (1) and XIP (1) (Figure 2). Although, most of plant species (Monocots) lack the XIP sub-family (Venkatech *et al.*, 2015), members of XIP subfamily have been found in few dicotyledonous plants including *Argania spinosa* L. Our finding is consistent with previous reports that showed that the number of aquaporins and diversity in each subfamily was highly specific in plants (Venisse *et al.*, 2021, Yaguinuma *et al.*, 2021).

Plant PIPs were classified into two subgroups: PIP1 and PIP2 which has five isoforms (PIP1.1-PIP1.5) and eight isoforms (PIP2.1- PIP2.8) respectively (Maurel, 2007). Accordingly, AsPIPs were also grouped into two subgroups PIP1 (AsPIP1.1, AsPIP1.4, AsPIP1.5) and PIP2 (AsPIP2.2- AsPIP2.7). In PIPs, dual NPA motifs and ar/R selective filter (F-H-T-R) are highly conserved across various plant species. Similarly, all of Argan PIP members contain two NPA motifs, and represent the F-H-T-R ar/R filter (Table 4), which was also observed in the PIP family of AQPs in other plant species such as Poplar, Sweet orange, Coffee and Silver birch (Gupta and Sankararamakrishnan 2009, Wei *et al.*, 2019, Yaguinuma *et al.*, 2021, Venisse *et al.*, 2021). PIPs not only recognized by their high permeability to water, but also reported to transport urea, boric acid, CO<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bienert *et al.*, 2014). Most AsPIP members contained highly conserved amino acid in the ar/R selectivity filter (F-H-T-R) with the exception of AsPIP2.3 where His (H) was replaced by Iso (I) in the H5 position. As to forger's positions, the position "P1" is more variable and occupied Q/E/F/M, while the position "P2" to "P5" are highly conserved (Table 4). Similarly, AsPIP indicate identical amino acids in the forger's positions (Q-S-A-F-H), except for AsPIP1.1, AsPIP1.4 and AsPIP2.2 showed replacement of "Q" by "E", "F" and "M" respectively.

Members of TIP subfamily were branched into five subgroups based on the sequence homology which include TIP1, TIP2, TIP3, TIP4, TIP5 (Johanson *et al.*, 2001). Similarly, AsTIP were also divided into five subgroups including TIP1 (AsTIP1.1, AsTIP1.3), TIP2 (AsTIP2.1, AsTIP2.3), AsTIP3.2, AsTIP4.1 and AsTIP5.2. All *A. spinosa* TIP AQPs showed two identical NPA motifs and some of them showed a difference in ar/R selectivity filter. Among AsTIP, AsTIP1.3 were found to have residues (H-I-A-V) forming more hydrophobic ar/R filter compared to AsTIP2.1/2.3, AsTIP5.2 and AsTIP3.2/4.1 which contained ar/R filter with "H-I-G-R", "N-V-G-H" and "H-I-A-R" residues respectively. The residues in ar/R selectively filter of AsTIP were similar to TIP1 from other plant species, such as *G. raimondii*

(Li *et al.*, 2019). The forger's positions were also conserved among members, mainly composed of (T-S-A-H-H), except for AsTIP2.3 with (V-A-A-H-H) residues. Previous reports proved that TIPs were mainly located in the vacuole membrane and acted as functional small solutes transporters such as  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and urea (Deshmukh *et al.*, 2017). Additionally, the ar/R selectivity filter (H-I-G-R) and forger's positions (T-S-A-H-H) present in the TIP aquaporins may play a role in the transport of a variety of molecules, including formamide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and urea (Hove and Bhave, 2011 and Venkatesh *et al.*, 2013). The similar sequences were observed in Argan TIP2 subgroup of aquaporins (AsTIP2.3), indicating similar functionality.

Concerning the NIP subfamily, the two NPAs have the identical sequence as the PIPs and TIPs, with the exception of the AsNIP5 where the Alanine (A) is substituted by a Serine (S) residue in the first NPA motif and a Valine (V) in the second NPA motif. Plant NIPs were classified into NIP I and NIP II subgroups based on the homology of the selectivity filter (Wallace *et al.*, 2006). Accordingly, the AsNIPs may be classified into two ar/R subgroups. The Argan NIP I subgroup include two members (AsNIP1.2 and AsNIP1.1) that harbor the typical (H-V-A-R) residues, and the subgroup II composed of three members (AsNIP1.5, AsNIP7.1 and AsNIP5) shown a divergence in ar/R selectivity filter, "G-A-A-R", "G-V-G-R" and "A-I-A-R". AsNIP I was found to be more hydrophobic (H-V-A-R) compared to AsNIP II (G-A-A-R), AsNIP7.1(G-V-G-R) and AsNIP5 (A-I-A-R). These variations in residues could potentially have an impact on the protein's transport ability, suggesting that each subgroup of NIPs has its unique function. In addition, NIPs with the ar/R signature (A-I-G/A-R) and the dual NPS/NPV motifs may transport arsenite, boric acid, and silicic acid in *Betula pendula* and *Arabidopsis thaliana* (Venisse *et al.*, 2021 and Takano *et al.*, 2006). Our analysis shows that AsNIP5 have the same signature and motifs, which suggest to have a similar function.

Considering the structure, SIPs were clustered in two SIP1 and SIP2 subgroups. AsSIP subfamily had one member AsSIP2.1 and revealed that the first NPA motif less conserved with replacement of Ala (A) residue by Ala (L), whereas the second NPA motif is perfectly conserved. A previous study in *Arabidopsis*, revealed that SIP1 subgroup had a water channel activity while SIP2 did not (Ishikawa *et al.*, 2005). The absence of water channel activity suggests that the SIP2 subgroup may have other functions. In plants, the ar/R selectivity filters of XIPs are more hydrophobic, which is attributed to the enhancement of hydrophobicity with Valine/Isoleucine at "H5" position. Here, Threonine occupied "H5" position of the AsXIP1.2.

The hydrophobicity of XIPs contributes to the transport of small neutral molecules such as glycerol, urea and boric acid in plant (Bienert *et al.*, 2011).

The exon-intron organization was conserved within each member of AsAQP subfamilies, with some exceptions. Except AsPIP1.1 (two introns and three exons), all AsPIPs contained three introns and four exons, as reported for *Citrus sinensis*, *Coffea canephora* and *Malus domestica* (Wei *et al.*, 2019, Yaguinuma *et al.*, 2021, Liu *et al.*, 2019). The majority of AsTIPs presented two introns and three exons, with exception of AsTIP1.1/1.3 and AsTIP2.1 which showed one and three introns, respectively. Similar exon-intron pattern was observed in TIP subfamily of *Ricinus communis* and *Hevea brasiliensis* (Zou *et al.*, 2015b, Zou *et al.*, 2015a). Four members of AsNIP subfamily contain four introns (AsNIP1.5, AsNIP1.2, AsNIP1.1 and AsNIP7.1) and three (AsNIP5) introns. The AsSIP2.1 and XIP1.2 featured two introns and three exons, which were similar to situations reported in *Coffea canephora* and *Betula pendula* (Yaguinuma *et al.*, 2021, Venisse *et al.*, 2021). Overall, the conserved exon-intron arrangement among AsAQP subfamilies suggested the conserved evolution and supported the classification result.

Plants exposed to drought stress have developed various mechanisms including morphological, physiological and biochemical changes. Based on our experiment, when comparing to the control (100% FC), the treatment “0% FC” induced considerable differences in proline, total sugar and total phenolic contents among ecotypes. The two osmolytes (proline and total soluble sugar) known to play a key role in abiotic stress responses. During stressful conditions, proline is produced and accumulated in plants (Franzoni *et al.*, 2021). Besides its important role in regulating osmotic pressure, proline is provided in the stabilization of proteins and membranes during stress (Chaeikara *et al.*, 2020). In the present work, it was noted that proline concentration was increased significantly in four ecotypes only under “0% FC” treatment. Comparable results have already been reported in many species, and they have shown high proline content under drought stress (Babaei *et al.*, 2021, Zhang *et al.*, 2021). Soluble sugars are common and functional osmolytes in many plant species, and their concentration was reported to increase in response to different abiotic stress conditions (Plesa *et al.*, 2019, Zhang *et al.*, 2021). Our study showed that they significantly increased in the three of studied ecotypes, but not in Admin, and suggested that playing a relevant role in Argan tree in response to drought stress. High accumulation of those compatible solutes may be considered an indicator of stress tolerance. To counteract and prevent the negative effects

of oxidative stress caused by drought, plants simulate non-enzymatic antioxidant activities, such as phenolic compounds (Chaeikara *et al.*, 2020). In our case, the total phenolic content was also affected by drought stress. Compared to the control, we found a significant enhancement of total phenolic content in Rbai and Aoulouz ecotypes under “0% FC” treatment. The accumulation of this phenolic compound could be explained by the prevention of lipide peroxidation and stabilization of cell members. Results presented in Olive (Abdallah *et al.*, 2017) and Larch (Plesa *et al.*, 2019) are consistent with those obtained in the present work.

### **III.3.8. Conclusion**

To the best of our knowledge, this study presented a first transcriptome-wide analysis of the AQP gene families in *A. spinosa* L. We identified 23 non-redundant AQP genes, which were further assigned into five distinct subfamilies (PIPs, TIPs, NIPs, SIPs and XIPs), based on the sequence similarity and phylogenetic relationship with their poplar and Arabidopsis counterparts. Additionally, the gene structure and functional properties were characterized, and the results indicated that AsAQPs are abundance and diverse.

## References

- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.
- Abascal, F., Irisarri, I., & Zardoya, R. (2014). Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(5), 1468-1481.
- Abdallah, M. B., Methenni, K., Nouairi, I., Zarrouk, M., & Youssef, N. B. (2017). Drought priming improves subsequent more severe drought in a drought-sensitive cultivar of olive cv. Chétoui. *Scientia horticulturae*, 221, 43-52.
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877
- Anderberg HI, Kjellbom P, Johanson U (2012) Annotation of *Selaginella moellendorffii* major intrinsic proteins and the evolution of the protein family in terrestrial plants. *Front Plant Sci* 3:33
- Azad AK, Yoshikawa N, Ishikawa T, Sawa Y, Shibata H (2012) Substitution of a single amino acid residue in the aromatic/arginine selectivity filter alters the transport profiles of tonoplast aquaporin homologs. *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes* 1818: 1–11.
- Babaei, K., Moghaddam, M., Farhadi, N., & Pirbalouti, A. G. (2021). Morphological, physiological and phytochemical responses of Mexican marigold (*Tagetes minuta* L.) to drought stress. *Scientia Horticulturae*, 284, 110116.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., ... & Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*, 37(suppl\_2), W202-W208.
- Bansal, A., Sankararamkrishnan, R., 2007. Homology modeling of major intrinsic proteins in rice, maize and *Arabidopsis*: comparative analysis of transmembrane helix association and aromatic/arginine selectivity filters. *BMC Struct. Biol.* 7, 27.
- Bienert GP, Bienert MD, Jahn TP, Boutry M, Chaumont F. (2011). Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates.
- Bienert GP, Heinen RB, Berny MC, Chaumont F. (2014). Maize plasma membrane aquaporin ZmPIP2;5, but not ZmPIP1;2, facilitates transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*.1838(1PtB):216–22.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254 (1976).
- Chaeikar, S. S., Marzvan, S., Khiavi, S. J., & Rahimi, M. (2020). Changes in growth, biochemical, and chemical characteristics and alteration of the antioxidant defense system in the leaves of tea clones (*Camellia sinensis* L.) under drought stress. *Scientia Horticulturae*, 265, 109257.
- Chakhchar, A., Lamaoui, M., Aissam, S., Ferradous, A., Wahbi, S., El Mousadik, A., ... & El Modafar, C. (2016). Differential physiological and antioxidative responses to drought stress and recovery among four contrasting *Argania spinosa* ecotypes. *Journal of Plant Interactions*, 11(1), 30-40. <https://doi.org/10.1080/17429145.2016.1148204>.
- Chen, T., & Zhang, B. (2016). Measurements of proline and malondialdehyde content and antioxidant enzyme activities in leaves of drought stressed cotton. *Bio-protocol*, 6(17), e1913-e1913.
- Cohen, D., Bogeat-Triboulot, M. B., Vialet-Chabrand, S., Merret, R., Courty, P. E., Moretti, S., ... & Hummel, I. (2013). Developmental and environmental regulation of Aquaporin gene expression across *Populus* species: divergence or redundancy?. *PloS one*, 8(2), e55506

- Deokar, A. A., & Tar'an, B. (2016). Genome-wide analysis of the aquaporin gene family in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Frontiers in plant science*, 7, 1802.
- Deshmukh, R. K., Nguyen, H. T., & Belanger, R. R. (2017). Aquaporins: dynamic role and regulation. *Frontiers in plant science*, 8, 1420.
- Deshmukh, R., & Bélanger, R. R. (2016). Molecular evolution of aquaporins and silicon influx in plants. *Functional Ecology*, 30(8), 1277-1285.
- Deshmukh, R. K., Sonah, H., & Singh, N. K. (2016). Intron gain, a dominant evolutionary process supporting high levels of gene expression in rice. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 25(2), 142-146.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Faize, M., Fumanal, B., Luque, F., Ramírez-Tejero, J. A., Zou, Z., Qiao, X., ... & Venisse, J. S. (2020). Genome Wild Analysis and Molecular Understanding of the Aquaporin Diversity in Olive Trees (*Olea Europaea* L.). *International journal of molecular sciences*, 21(11), 4183.
- Franzoni, G., Cocetta, G., & Ferrante, A. (2021). Effect of glutamic acid foliar applications on lettuce under water stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(5), 1059-1072.
- Froger A, Thomas D, Delamarque C, Tallur B (1998) Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Science* 7: 1458–1468. pmid:9655351
- Groszmann, M., Osborn, H. L., & Evans, J. R. (2017). Carbon dioxide and water transport through plant aquaporins. *Plant, Cell & Environment*, 40(6), 938-961.
- Gomes, D.; Agasse, A.; Thiébaud, P.; Delrot, S.; Gerós, H.; Chaumont, F. (2009). Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1788, 1213–1228.
- Gupta, A. B., & Sankararamakrishnan, R. (2009). Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC plant biology*, 9(1), 1-28.
- Gupta, A. B., & Sankararamakrishnan, R. (2009). Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC plant biology*, 9(1), 1-28.
- Gustavsson, S., Lebrun, A. S., Nordén, K., Chaumont, F., & Johanson, U. (2005). A novel plant major intrinsic protein in *Physcomitrella patens* most similar to bacterial glycerol channels. *Plant physiology*, 139(1), 287-295.
- Heymann JB, Engel A (2000) Structural clues in the sequences of the aquaporins. *Journal of Molecular Biology* 295: 1039–1053. pmid:10656809
- Hove, R.M., Bhave, M., 2011. Plant aquaporins with non-aqua functions: deciphering the signature sequences. *Plant Mol. Biol.* 75, 413–430.
- Hu, W., Hou, X., Huang, C., Yan, Y., Tie, W., Ding, Z., ... & Jin, Z. (2015). Genome-wide identification and expression analyses of aquaporin gene family during development and abiotic stress in banana. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 19728-19751.
- Hussain A, Tanveer R, Mustafa G, Farooq M, Amina I, Mansoor S (2019). Comparative phylogenetic analysis of aquaporins provides insight into the gene family expansion and evolution in plants and their role in drought tolerant and susceptible chickpea cultivars. *Genomics* 112:263–275.
- Ishikawa, F., Suga, S., Uemura, T., Sato, M.H., Maeshima, M., (2005). Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 579, 5814–5820.
- Javot H, Maurel C (2002). The role of aquaporins in root water uptake. *Ann Bot* 90:301–313. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf199>

- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Fraysse, L., ... & Kjellbom, P. (2001). The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant physiology*, 126(4), 1358-1369.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845-858.
- Khabudaev, K. V., Petrova, D. P., Grachev, M. A., & Likhoshway, Y. V. (2014). A new subfamily LIP of the major intrinsic proteins. *BMC genomics*, 15(1), 1-7.
- Kong, W., Yang, S., Wang, Y., Bendahmane, M., & Fu, X. (2017). Genome-wide identification and characterization of aquaporin gene family in *Beta vulgaris*. *PeerJ*, 5, e3747.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, 305(3), 567-580.
- Li G, Santoni V, Maurel C (2014) Plant aquaporins: roles in plant physiology. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1840:1574–1582. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.004>
- Li, W., Zhang, D., Zhu, G., Mi, X., & Guo, W. (2019). Combining genome-wide and transcriptome-wide analyses reveal the evolutionary conservation and functional diversity of aquaporins in cotton. *BMC genomics*, 20(1), 1-17.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, 148, 350-382
- Liu, H., Yang, L., Xin, M., Ma, F., & Liu, J. (2019). Gene-wide analysis of aquaporin gene family in *Malus domestica* and heterologous expression of the gene *MpPIP2; 1* confers drought and salinity tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3710.
- Lopez-Zaplana, A., Nicolas-Espinosa, J., Carvajal, M., & Bárzana, G. (2020). Genome-wide analysis of the aquaporin genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Scientific reports*, 10(1), 1-19.
- Maurel, C., 2007. Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Lett.* 581, 2227–2236.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D. T., & Santoni, V. (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 595-624.
- Maurel C, Boursiac Y, Luu DT, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucp L (2015). Aquaporins in plants. *Physiol Rev* 95:1321–1358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2015>
- Morita S, Sugiyama S, Tateishi A, Satoh S. (2017). Identification and characterization of plasma membrane intrinsic protein (PIP) aquaporin genes in petals of opening carnation flowers. *Horticulture Journal* 86:78–86 DOI 10.2503/hortj.MI-127.
- Pellegrini-Calace, M., Maiwald, T., & Thornton, J. M. (2009). PoreWalker: a novel tool for the identification and characterization of channels in transmembrane proteins from their three-dimensional structure. *PLoS computational biology*, 5(7), e1000440.
- Plesa, I. M., Al Hassan, M., González-Orenga, S., Sestras, A. F., Vicente, O., Prohens, J., ... & Sestras, R. E. (2019). Responses to drought in seedlings of European larch (*Larix decidua* Mill.) from several Carpathian provenances. *Forests*, 10(6), 511
- Reddy, P. S., Rao, T. S. R. B., Sharma, K. K., & Vadez, V. (2015). Genome-wide identification and characterization of the aquaporin gene family in *Sorghum bicolor* (L.). *Plant Gene*, 1, 18-28.
- Shelden, M. C., Howitt, S. M., Kaiser, B. N., & Tyerman, S. D. (2009). Identification and functional characterisation of aquaporins in the grapevine, *Vitis vinifera*. *Functional Plant Biology*, 36(12), 1065-1078.

- Shivaraj, S. M., Deshmukh, R. K., Rai, R., Bélanger, R., Agrawal, P. K., & Dash, P. K. (2017). Genome-wide identification, characterization, and expression profile of aquaporin gene family in flax (*Linum usitatissimum*). *Scientific reports*, 7(1), 1-17.
- Takano, J.; Wada, M.; Ludewig, U.; Schaaf, G.; von Wirén, N.; Fujiwara, T. The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 2006, 18, 1498–1509.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research*, 35(suppl\_2), W71-W74.
- Uppuluri, L. S., Motukuri, S. K., & Kumar, D. (2021). Genome-wide identification, characterization of aquaporin gene family and understanding aquaporin transport system in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 286, 110206.
- Venisse, J. S., Öunapuu-Pikas, E., Dupont, M., Gousset-Dupont, A., Saadaoui, M., Faize, M., ... & Label, P. (2021). Genome-Wide Identification, Structure Characterization, and Expression Pattern Profiling of the Aquaporin Gene Family in *Betula pendula*. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7269.
- Venkatesh, J., Yu, J. W., & Park, S. W. (2013). Genome-wide analysis and expression profiling of the *Solanum tuberosum* aquaporins. *Plant physiology and biochemistry*, 73, 392-404.
- Venkatesh, J., Yu, J. W., Gaston, D., & Park, S. W. (2015). Molecular evolution and functional divergence of X-intrinsic protein genes in plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(2), 443-460.
- Wallace, I. S., Choi, W. G., & Roberts, D. M. (2006). The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(8), 1165-1175.
- Wei, Q., Ma, Q., Ma, Z., Zhou, G., Feng, F., Le, S., ... & Gu, Q. (2019). Genome-wide identification and characterization of sweet orange (*Citrus sinensis*) aquaporin genes and their expression in two citrus cultivars differing in drought tolerance. *Tree Genetics & Genomes*, 15(2), 17.
- Yaguinuma, D. H., dos Santos, T. B., de Souza, S. G. H., Vieira, L. G. E., & Ribas, A. F. (2021). Genome-Wide Identification, Evolution, and Expression Profile of Aquaporin Genes in *Coffea canephora* in Response to Water Deficit. *Plant Molecular Biology Reporter*, 39(1), 146-162.
- Zhang, G., Yu, Z., da Silva, J. A. T., & Wen, D. (2021). Identification of aquaporin members in *Acacia auriculiformis* and functional characterization of AaPIP1-2 involved in drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 185, 104425.
- Zou, Z., Gong, J., An, F., Xie, G., Wang, J., Mo, Y., & Yang, L. (2015a). Genome-wide identification of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) aquaporin genes and their response to ethephon stimulation in the laticifer, a rubber-producing tissue. *BMC genomics*, 16(1), 1-18.
- Zou, Z., Gong, J., Huang, Q., Mo, Y., Yang, L., & Xie, G. (2015b). Gene structures, evolution, classification and expression profiles of the aquaporin gene family in castor bean (*Ricinus communis* L.). *PloS one*, 10(10), e0141022.
- Zou, Z., Yang, L., Gong, J., Mo, Y., Wang, J., Cao, J., ... & Xie, G. (2016). Genome-wide identification of *Jatropha curcas* aquaporin genes and the comparative analysis provides insights into the gene family expansion and evolution in *Hevea brasiliensis*. *Frontiers in plant science*, 7, 395.

### III.3.9. Synthèse

Dans ce chapitre, la même démarche *In silico* dans le chapitre trois est employée dans le but d'identifier les gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique. La grande famille des aquaporines fournit un point d'entrée moléculaire, afin d'étudier les relations hydriques au niveau des plantes et établir des connexions entre le transport de l'eau, le développement ainsi que les réponses adaptatives des plantes à leur environnement changeant (Maurel et Chrispeels., 2001). En tant que des transporteurs transmembranaires représentatifs, les aquaporines ont été largement étudiés chez diverses espèces végétales en raison de leur rôle prédominant dans le transport de l'eau de petits solutés (Chaumont et Tyerman, 2014 ; Groszmann *et al.*, 2017). Ainsi, ils sont connus par leur rôle important dans la tolérance aux stress chez les plantes (Deshmukh *et al.*, 2017).

L'étude actuelle sur les AQP de l'arganier est la première, à notre connaissance, qui s'est intéressée à l'échelle du génome à l'identification, à la caractérisation des séquences et à la prédiction fonctionnelle des aquaporines chez la famille des sapotaceae. En effet, la compréhension de la distribution, de la phylogénie, des caractéristiques structurelles et des profils d'expression des AQP chez l'espèce *A. spinosa* L. est d'une grande importance. L'analyse des gènes AQP à l'échelle du génome de l'arganier et des deux espèces modèles *Arabidopsis* et Peuplier, a été effectuée à l'aide des bases de données NCBI et Phytozome. Nous avons identifié 23 gènes d'aquaporines non-redondants chez l'arganier, nommés AsAQP (*Argania spinosa* L. AQP), dont leurs séquences (acide aminé et CDS) sont répertoriées dans l'Annexe 7. Le nombre de gènes AsAQPs était plus ou moins comparable avec d'autres espèces végétales notamment, *Acacia auriculiformis* L. (21 membres) (Zhang *et al.*, 2021), *Dianthus caryophyllus* L. (26 membres) (Morita *et al.*, 2017) et *Vitis vinifera* (23 membres) (Shelden *et al.*, 2009). Cependant, était légèrement inférieur par rapport à ce qui a déjà observé chez plusieurs espèces ligneuses, telles que *Olea europea* (52 membres) (Faize *et al.*, 2020), *Citrus sinensis* (34 membres) (Wei *et al.*, 2019), *Coffea canephora* (33 membres) (Yaguinuma *et al.*, 2021) et *Populus trichocarpa* (55 membres) (Gupta and Sankararamakrishnan 2009). Le nombre élevé de gènes d'AQP est très probablement lié à des événements de duplication du génome (Abascal *et al.*, 2014), ainsi les variations de gènes intra-espèces puissent être associées à la taille du génome et/ou processus évolutifs adaptatifs au milieu naturel (Maurel *et al.*, 2015).

L'ensemble des gènes AsAQPs déduits sont constitués de 232 aa (AsTIP2.1) à 311 aa (AsPIP2.7), avec un poids moléculaire de 21,9 kD (TIP1.3) à 33,5 kD (PIP2.7) et une valeur

de pi de 5 (TIP1.3) à 9 (SIP2.1). L'analyse d'homologie de ces protéines putatives a révélé une diversité de leurs séquences au sein et entre les sous-familles.

L'analyse de la localisation subcellulaire prédite des AsAQP a montré que tous les AsPIP, AsNIP, AsSIP et AsXIP sont situés au niveau de la membrane plasmique. Cependant, les membres AsTIP, à l'exception AsTIP5.2, sont localisés dans la vacuole. AsTIP5.2 a été prédit pour une localisation au niveau de la membrane plasmique. La plupart des AsAQP ont montré six hélices transmembranaires (TMH) prédits, tandis que les six autres AsAQP possèdent cinq TMH. La similarité de séquence la plus élevée (63 à 88,7%) a été trouvée dans les AsPIPs, tandis que les AsNIPs partagent la similitude la plus faible (37,2 à 63,1%). Ainsi, les AsTIPs affichent une similarité de séquence élevée avec les AsPIPs et une similitude faible avec les AsSIPs. Les AsPIPs ont montré des similitudes de séquence de 28,8-43,1 %, 28,2-33,3 %, 23,2-32,3 et 21-28,8 % avec les TIPs, XIPs, NIPs et SIPs, respectivement. Les AsNIPs ont révélé une similarité de séquence de 23 à 32,8 % avec les AsSIPs et de 26,4 à 29,7 % avec les AsXIPs (Annexe 8).

Pour étudier la structuration de la famille AsAQP, un arbre phylogénétique a été construit à partir de la totalité des 112 séquences AQPs réparties entre trois espèces (*Argania*, 23 ; *Arabidopsis*, 35 et *Populus*, 54). Dans l'ensemble, les aquaporines de l'arganier sont regroupées en cinq sous-familles distinctes : AsPIP (9), AsTIP (7), AsNIP (5), AsSIP (1) et AsXIP (1) (voir figure 2 de l'article). Les PIPs et les TIPs sont considérés comme les membres les plus abondants et les plus étudiés dans des conditions normales et de stress, car ils ont une activité de transport d'eau plus élevée que les NIPs et les SIPs (Javot and Maurel, 2002). Chez les plantes, généralement la famille des PIPs ont été classés en deux sous-groupes PIP1 et PIP2, qui possèdent respectivement cinq isoformes (PIP1.1-PIP1.5) et huit isoformes (PIP2.1-PIP2.8) (Maurel, 2007). Par conséquent, le membre des AsPIPs ont été également regroupés en deux sous-groupes PIP1 (AsPIP1.1, AsPIP1.4, AsPIP1.5) et PIP2 (AsPIP2.2- AsPIP2.7). Les membres de la sous-famille TIP ont été divisés en cinq sous-groupes (TIP1, TIP2, TIP3, TIP4, TIP5), à la base de l'homologie de leurs séquences (Johanson *et al.*, 2001). De même, AsTIP a été également divisé en cinq sous-groupes comprenant TIP1 (AsTIP1.1, AsTIP1.3), TIP2 (AsTIP2.1, AsTIP2.3), AsTIP3.2, AsTIP4.1 et AsTIP5.2. Quant à la sous-famille NIP est composée de trois sous-groupes NIP1 ( NIP1.1, NIP1.2 ET NIP1.5), NIP5 et NIP7.1. Alors que les sous-familles XIP et SIP n'avaient qu'un seul membre pour chacune.

Par ailleurs, les motifs NPA, le filtre sélectif aromatique/arginine (ar/R) et la position de 'Froger' ont été signalés comme étant impliqués dans la sélection du substrat et l'activité de

transport. Au niveau des PIPs, les deux copies ‘NPA box’ et le filtre sélectif ar/R de type ‘F-H-T-R’ sont hautement conservés dans plusieurs espèces végétales. De même, tous les membres AsPIP contiennent deux motifs NPA conservés et possèdent une signature moléculaire de type ‘F-H-T-R’ au niveau de son filtre ar/R (voir tableau 3 de l’article), qui a également été observé dans la famille des PIPs des autres espèces de plantes notamment, le peuplier et le caféier (Gupta et Sankararamakrishnan, 2009, Yaguinuma *et al.*, 2021). Non seulement les PIPs sont reconnus par leur grande perméabilité à l'eau, mais ils jouent également un rôle dans le transportant de l'urée, de l'acide borique, du CO<sub>2</sub> et du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bienert *et al.*, 2014). La plupart des membres AsPIP contenaient des acides aminés hautement conservés dans le filtre sélectif ar/R de type ‘F-H-T-R’ à l'exception de AsPIP2.3 où le Histidine (H) a été remplacé par Isoleucine (I) en position H5. Quant aux positions de ‘forger’ P1-P5, la position P1 est plus variable et occupée Q/E/F/M, tandis que les positions P2 à P5 sont très conservées (voir tableau 2 de l’article). De même, les AsPIPs indiquent des résidus identiques dans ces positions (Q-S-A-F-H), sauf pour AsPIP1.1, AsPIP1.4 et AsPIP2.2 qui ont montré un changement du premier résidu "Q" par les résidus "E", "F" et "M" respectivement.

Tous les membres TIPs d'*A. spinosa* ont montré deux motifs ‘NPA box’ hautement conservés et une variation des résidus composés du filtre sélectif ar/R. Parmi AsTIP, AsTIP1.3 s'est avéré avoir des résidus (H-I-A-V) formant un filtre Ar/R plus hydrophobe par rapport à AsTIP2.1/2.3, AsTIP5.2 et AsTIP3.2/4.1 qui contenaient un filtre sélectif ar/R avec "H-I-G-R", "N-V-G-H" et "H-I-A-R" respectivement. Les résidus du filtre sélectif ar/R de AsTIP étaient similaires à TIP1 des autres espèces végétales, telles que *G. raimondii* (Li *et al.*, 2019). Les positions ‘forger’ composées principalement de (T-S-A-H-H) ont également été conservées entre les membres AsTIP, à l'exception de AsTIP2.3 constitué des résidus ‘V-A-A-H-W’. Des études précédentes ont prouvé que les TIPs étaient principalement situés dans la membrane de la vacuole et agissaient comme des transporteurs fonctionnels de petits solutés tels que NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'urée (Deshmukh *et al.*, 2017). De plus, la signature ‘H-I-G-R’ du filtre sélectif ar/R et les positions ‘forger’ de type ‘T-S-A-H-W’ présents dans les aquaporines TIPs peuvent jouer un rôle dans le passage de diverses molécules, notamment le formamide, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'urée (Hove et Bhave, 2011 et Venkatesh *et al.*, 2013). Dans notre analyse, des résidus similaires ont été également observés dans le gène d'AQP AsTIP2.3, indiquant la même fonctionnalité.

Les membres AsNIPs présentent deux signatures ‘NPA box’ conservées, à l'exception de l'AsNIP5. Généralement, les NIPs des plantes ont été classés en deux sous-groupes NIP1 et

NIP2, en fonction de l'homologie du filtre sélectif (Wallace *et al.*, 2006). En effet, les AsNIPs peuvent être classés en deux sous-groupes. Le premier sous-groupe comprend deux membres (AsNIP1.2 et AsNIP1.1) caractérisés par des résidus typiques 'H-V-A-R' et s'est avéré plus hydrophobe que le second sous-groupe qui, composé de trois membres (AsNIP1.5, AsNIP7.1 et AsNIP5), a montré une divergence dans le filtre sélectif ar/R, 'G-A-A-R', 'G-V-G-R' et 'A-I-A-R'. Ces variations de résidus pourraient potentiellement avoir une influence sur la capacité à transporter des substrats, suggérant que chaque sous-groupe de NIP a sa fonction unique. De plus, les NIPs présentant une signature ar/R de type 'A-I-G/A-R' et un dual motifs 'NPS/NPV' peuvent transporter de l'arsénite, de l'acide borique et de l'acide silicique, ce qui est été observé chez *Betula pendula* L. et *Arabidopsis thaliana* L. (Venisse *et al.*, 2021 ; Takano *et al.*, 2006). Ceci est observé pour le gène AsNIP5 qui a la même signature et les mêmes motifs, ce qui suggère d'avoir une fonction similaire. Un seul membre de SIP (AsSIP2.1) et de XIP (AsXIP1.2) a été détecté. Chacun a montré un premier motif NPA moins conservé, NPL (AsSIP2.1) et NPI (AsXIP1.2), tandis que le second motif NPA demeure conservé. Chez *Arabidopsis*, Ishikawa *et al.* (2005) ont rapporté que le sous-groupe AtSIP1, mais pas AtSIP2, avait une activité de canal d'eau, suggérant que SIP2 est impliqué dans le passage de solutés.

La majorité des membres AsAQP présentent une organisation génomique 'exon-intron' conservée au sein de chaque sous famille. À l'exception d'AsPIP1.1 (deux introns et trois exons), tous les AsPIPs possèdent trois introns et quatre exons, ce résultat a déjà été observé chez les PIPs du *Citrus sinensis* L., *Coffea canephora* L. et *Malus domestica* L. (Wei *et al.*, 2019, Yaguinuma *et al.*, 2021, Liu *et al.*, 2019). La plupart des AsTIPs présentaient deux introns et trois exons, à l'exception de AsTIP1.1/1.3 et AsTIP2.1 qui constituent respectivement un et trois introns. Une structuration exon-intron similaire a été détectée dans la sous-famille TIP de *Ricinus communis* L. et *Hevea brasiliensis* L. (Zou *et al.*, 2015b ; Zou *et al.*, 2015a).

Quatre membres de la sous-famille AsNIP contiennent quatre introns (AsNIP1.5, AsNIP1.2, AsNIP1.1 et AsNIP7.1) et trois introns marqués pour AsNIP5. Les AsSIP2.1 et XIP1.2 portent deux introns et trois exons, ceci a déjà été rapporté chez *Coffea canephora* L. et *Betula pendula* L. (Yaguinuma *et al.*, 2021 ; Venisse *et al.*, 2021). Dans l'ensemble, l'analyse de la structure des gènes a indiqué un modèle conservé d'intron-exon au sein des sous-familles de AaAQP suggérant l'évolution conservée et soutenant la classification de la famille AsAQP. Puisque *A. spinosa* est espèce connue pour sa tolérance au stress, la variation structurelle des hélices transmembranaires, des motifs NPA, du filtre sélectif ar/R et des positions 'Forger'

pourrait collectivement participer à la formation d'un canal de transport efficace de l'eau, permettant aux plantes de faire face au stress hydrique et salin.

En parallèle avec l'étude *in silico*, les différents écotypes d'arganier ont été étudiés pour leur tolérance au stress hydrique, en appliquant différents régimes d'eau. Un ensemble de caractères physiologiques et biochimiques ont été suivis dont l'accumulation des osmolytes (sucres solubles et proline) considérée comme l'un des indices de tolérance au stress hydrique.

Dans la présente étude, l'application d'un stress hydrique (0% CC) induit chez tous les écotypes (excepté Admin) une augmentation significative de la teneur en proline. L'augmentation de cet osmoticum corrobore les résultats de (Babaei *et al.*, 2021 ; Zhang *et al.*, 2021) qui notent une accumulation de cet osmolyte en condition de stress hydrique. Le même constat est observé pour la teneur en sucres solubles. La concentration de ce dernier a montré une accumulation significative chez les trois écotypes stressés (sauf Admin) en comparaison avec les écotypes témoins. En outre, l'analyse de variance indique qu'il existe une différence significative pour l'effet stress, l'effet écototype et l'effet interaction (Écotype x Traitement) (Voir tableau 4 article). Ces différences significatives indiquent que les écotypes étudiés réagissent différemment à la contrainte hydrique, en terme d'élévation de la teneur en proline et en sucres solubles. L'augmentation significative de ces solutés compatibles suggère qu'elles jouaient un rôle pertinent chez l'arganier en réponse au stress hydrique et elles peuvent être considérées comme des indicateurs de tolérance au stress.

Pour contrer et prévenir les effets négatifs du stress oxydatif causé par le stress hydrique, les plantes simulent des activités antioxydantes non enzymatiques, comme les composés phénoliques (Safaei *et al.*, 2020). Dans notre cas, le contenu en phénols totaux a également été affecté par le stress hydrique. Par rapport au témoin, nous avons constaté une accumulation significative du contenu phénolique dans les écotypes Rbai et Aoulouz sous un stress sévère '0% CC'. Cette accumulation pourrait s'expliquer par la prévention de la peroxydation des lipides et la stabilisation des membres cellulaires. L'augmentation de la composition phénolique en condition de stress hydrique a été signalée chez d'autres espèces tels l'Olivier (Abdallah, *et al.*, 2017) et le Mélèze (Plesa *et al.*, 2019). Quant aux taux de chlorophylle, MDA et la teneur en protéines observés, l'application du stress hydrique n'entraîne pas de différence significative marquée entre les écotypes stressés et témoins.

À l'instar des résultats obtenus dans la partie *In silico*, une liste intéressante de gènes candidats a été obtenue, qui pourrait être utiles pour diverses applications notamment la validation fonctionnelle et l'étude de l'expression différentielle de ces gènes en réponse au stress abiotique. À cette étape, différentes questions ont été soulevées, la principale étant : les gènes prédits sont-ils fonctionnels ? Pour répondre à cette question et aussi dans le but d'une caractérisation fonctionnelle, il semble nécessaire de développer des marqueurs moléculaires spécifiques à l'arganier. En effet, 26 couples d'amorces y compris trois gènes de ménages spécifiques à l'*Argania spinosa* L. ont été conçus pour étudier l'expression différentielle des transcrits AQPs suite à une exposition au stress hydrique. Ceci fera l'objet de travaux de recherche en perspective. Dans ce contexte, nous nous avons initié l'étude de l'expression des gènes d'aquaporines chez les quatre écotypes d'arganiers soumis à une contrainte hydrique (Arrêt d'arrosage : 0% CC).

Sur le plan pratique, différents protocoles d'extraction d'ARN ont été testés. Seule, la méthode CTAB, suivant un processus d'ajustement appropriés, a permis l'obtention d'un ARN propre et de bonne qualité pour la majorité des échantillons (Annexe 9). Quant à l'étude des profils d'expressions chez les écotypes contrastés (contrôle et stressé) est en cours d'optimisation.

### **III.4. Profilage métabolique des écotypes d'arganiers sous conditions de stress hydrique**

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'un article soumis dans la revue *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

#### **III.4.1. Contexte**

La sécheresse est une contrainte environnementale importante qui inhibe fortement la croissance et la productivité des plantes dans le monde. Pour surmonter les effets néfastes du stress hydrique, les plantes subissent une série de changements morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires qui nécessitent la participation de gènes, de protéines et de métabolites ( Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki 2007, Michaletti *et al.*, 2018 ). De nombreux travaux sur les réponses à la sécheresse chez les plantes ont été menés par des analyses transcriptomiques et/ou protéomiques, qui ne sont pas suffisamment complètes pour caractériser de manière approfondie les réseaux de réactions métaboliques (Kim *et al.*, 2007). La recherche en métabolomique est une option post-génomique pour élucider les changements induits par la sécheresse sur les activités métaboliques et la composition biochimique des plantes *via* l'analyse complète et quantitative de métabolites (Gargallo-Garriga *et al.*, 2015).

Ce travail permettra, *via* une analyse par GC-MS, une investigation du profil lipidomique dans les feuilles des quatre écotypes d'arganier en conditions contrastées (contrôlée : 100 % de la capacité au champ et stressée : Arrêt d'irrigation pendant 45 jours) et une identification des principaux métabolites impliqués dans des voies métaboliques clés pouvant éclairer les mécanismes de tolérance au stress hydrique chez les plantules d'arganier

Les travaux de ce chapitre sont rassemblés sous la forme d'une publication soumise à *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Manuscript ID: Ms. Ref.: Ms. No. ABAB-D-22-01183). Ils sont présentés en anglais dans le format de la publication.

### III.4.2. Article 3: Soumis au journal “Applied Biochemistry and Biotechnology”

#### Profiling lipid changes in *Argania spinosa* L. (Skeels) response to drought stress

RABEH Karim<sup>1</sup>, SBABOU Laila<sup>1</sup>, RACHIDI Farid <sup>1,2</sup>, FERRADOUSS Abderrahim<sup>4</sup>, LAGHMARI Ghizlan<sup>2</sup>, AASFAR Abderrahim<sup>2</sup>, EL ARROUSSI Hicham<sup>2,3</sup>, OUAJDI Mohamed<sup>5</sup>, EL ANTRY Salwa<sup>5</sup>, BELKADI Bouchra<sup>1</sup> and FILALI-MALTOUF Abdelkarim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Microbiology and Molecular Biology Team, Center of Plant and Microbial Biotechnologies, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Morocco.

<sup>2</sup>Green Biotechnology Laboratory, Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation and Research (MAScIR), Rabat Design Centre, Rabat, Morocco

<sup>3</sup>Agrobiosciences Program, University Mohammed 6 Polytechnic (UM6P), Benguerir, Morocco.

<sup>4</sup>Regional Center for Forestry Research (CRRF), Marrakech, Morocco.

<sup>5</sup>National Center for Forestry Research (CNRF), Rabat-Agdal, Morocco.

\* Corresponding author: [a.filalimaltouf@gmail.com](mailto:a.filalimaltouf@gmail.com)

#### III.4.3. Abstract

Argan tree is frequently constrained by environmental stresses, especially drought. Lipids play crucial roles in stress adaptation, but lipidomic profiles in *Argania spinosa* L. under drought stress is largely unknown. The aim of this study was to identify lipid components potentially responsive to drought stress from leaves in the four argan ecotypes. For this, non-polar metabolite profiling was carried out using gas chromatography–mass spectrometry. We identified 229 components, the majority of which belonging to fatty acids and prenol lipids classes. The principal component analysis and partial least-squares discriminant analysis were applied to the lipidomics data to determine the component changes between all ecotypes. Based on the common components present in all ecotypes under contrast conditions, 21 metabolites belong fatty acids were identified with significant change. It was concluded that the majority of these components show up-accumulation in their content and involve in different pathways, especially in alpha-Linolenic acid metabolism. The findings of this study provided new insights into the lipidomic study of argan leaves under drought stress and may be eventually contribute to overcome drought; in addition, could serve as a base for future studies on transcriptomic and proteomic to enhance the drought tolerance of forest trees.

**Key words:** *Argania spinosa* L, drought stress, lipidomic, fatty acids.

#### III.4.4. Introduction

Drought is one of the most crucial and common environmental factors that could influence the distribution, growth and development of plants (Tardieu *et al.*, 2018). To cope with drought, plants have developed a range of extensive structural, physiological, biochemical and molecular changes (Calvo-Polanco *et al.*, 2019). These changes comprise the expression of a set of genes, and the accumulation of small molecules (metabolites) and proteins specifically involved in stress tolerance that help plants adaptation to drought stress (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Many investigations of drought responses have been performed using transcriptomic and/or proteomic approaches. However, these approaches provide limited data and are not comprehensive enough to characterize the targeted metabolites and the related pathways (Kim *et al.*, 2007, Sussulini, 2017).

During drought stress, numerous cellular metabolites are altered such as soluble sugars, organic acids, amino acids, fatty acids, nucleotides, peptides, cofactors, and secondary metabolites (Das *et al.*, 2017). Lipid components are cell macromolecules with essential structural, energy storage and signaling roles in biological systems (Svenningsson *et al.*, 1986). They have two functions in the organism's response to stress. First, they serve as signaling mediators (Hubac *et al.*, 1989; Quartacci *et al.*, 1995); and second, they are vital in the process of alleviating the negative effects of stress (Bahl *et al.*, 1976; Eeastman *et al.*, 1998). Lipidome changes and membrane lipid remodelling are relevant strategies adopted by plant cells to counteract abiotic stresses such as drought. Lipid production and accumulation may influence cell membrane integrity, fluidity, permeability, and transport protein activity under environmental conditions (Mansour *et al.*, 2015). Some lipids are altered in response to these stresses, assisting in coping with unfavorable environmental conditions. In addition, the unsaturation level of lipids is also an adaptive strategy of plants to ameliorate the effects of environmental stresses (Sung *et al.*, 2003).

Various studies have employed lipidomics to analyze lipid changes in response to individual abiotic stresses (Narayanan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2006; Welti *et al.*, 2002). Gigon *et al.* (2004) reported the role of lipid metabolism under drought stress. Hence, information offered from lipidomic analysis about the component types and concentrations should be useful and good indicator to predict the plants' stress tolerance capability and unveil their mechanisms.

Contrary to herbaceous plants, vivacious forest trees are more frequently exposed to drought stress, which considerably decreases their productivity and survival (Williams *et al.*, 2013). Understanding and clarifying the drought adaptation mechanism of trees is an important step for afforestation and enhancement of ecological conditions in unfavorable environmental areas. The argan tree (*Argania spinosa* L.) is an important woody plant species that is ecologically, economically and socially valuable. It is the genus *Argania* belonging to the tropical family Sapotaceae in Morocco (Majourhat *et al.*, 2007). This species plays a crucial role in the biodiversity of the forest's ecosystem (Msanda *et al.*, 2005) and it is characterized by its endemism and its adaptive ability to arid and semi-arid environment in the southwest of Morocco. Previous studies have investigated argan's physiological and biochemical responses to drought stress and (Chakhchar *et al.*, 2015; Chakhchar *et al.*, 2016). Nevertheless, most of these studies focused on argan plant's physiological and biochemical attributes, whereas no studies to date reporting the analysis of drought response in leaves argan by lipidomic analysis using GC-MS technique. Thus, we investigated lipidomic profiling in four argan ecotypes under drought stress and identified key metabolic pathways that may shed light on the mechanisms of argan's drought tolerance and offer significant help in breeding the stress-tolerant argan ecotypes.

### III.4.5. Materials And Methods

#### Plant materials, growth conditions and drought treatments

In this study, the argan seeds were obtained from CRF (Forest Research Center of Marrakech), which were sampled from four regions of the argan tree forest in South-West Morocco. These four regions have a vastly different in climatic, geographical and hydrological conditions. We chose two different coastal ecotypes (Rabia (Rbi) and Admin (Adn)) as well as two different inland ecotypes (Aoulouz (Alz) and Lakhssas (Lks)). The seeds were sown in cell trays containing peat moss and irrigated daily during germination and seedling growth. 90 days after germination, they were transplanted into maintained plastic pots (1L), containing a mixture of 4:1 ration of forest soil: peat, and placed in greenhouse at semi-controlled conditions. After two-months of growth, the plants were transferred into individual plastic pots (15 cm higher and 15 cm diameter) filled with the same previous mixture and were irrigated daily until they have one-year old.

Uniform 24 young *A. spinosa* plants were selected for the experiment and were randomly divided into two blocks (12 Control "CK" and 12 Drought stress "DS") with 3 replicates for

each ecotype. The control group was daily watered (to maintain 100% of field capacity moisture), while the second group, subjected to drought stress treatment, was not watered for 45 days (Fig.1). After the stress exposure (one month and a half), all leaves of each plant from CK and DS were ground, frozen immediately in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Then, each plant was analyzed separately for lipid profiling.

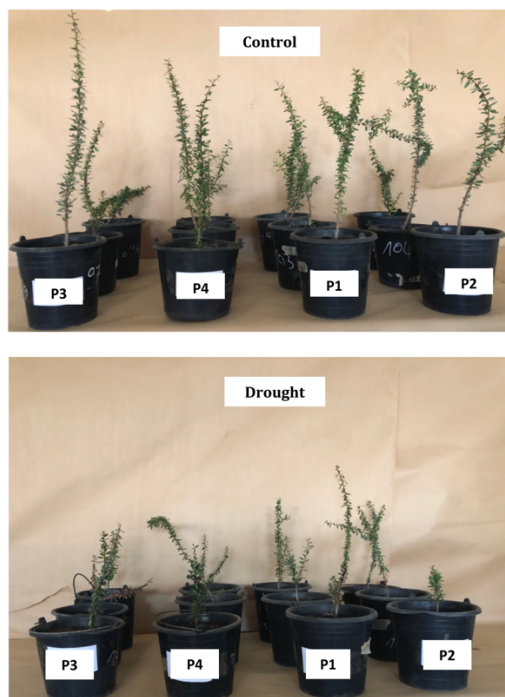


Fig.1. Phenotypic characteristics of *Argania spinosa* L. ecotypes under drought stress (45 days). P1: Rbai; P2: Admin; P3: Aoulouz; P4: Lkhssas; FC100%: Control; FC0%: Drought stress

### Lipidomic profiling analysis

*Sample preparation* Lipid extraction, GC-MS (Gas Chromatography–Mass Spectrometry) analysis and quantification were carried out according to the method of Kamthan *et al.* (2012) with some modification (Rachidi *et al.*, 2021). Briefly, for the extraction of lipophilic metabolites, 300 mg of grounded fresh material and 4 mL of chloroform: methanol (2:1, v/v) and 10  $\mu\text{L}$  of internal standard (Dodecane, 0.75 g/mL) were added. The samples were mixed by vortexing and incubated at  $85^{\circ}\text{C}$  for 2h, vortexed and then sonicated at  $60^{\circ}\text{C}$  in an ultrasound bath for 1h. Then, 2 ml of methanol was added and then sonicated at  $60^{\circ}\text{C}$  in an ultrasound bath for 2h. Finally, 1 mL of  $\text{H}_2\text{O}$  was added to the vials and the mixtures were thoroughly vortexed. Before acid transesterification, the organic phase was collected and dried under nitrogen stream, then 500  $\mu\text{L}$  of Methanol/sulfuric acid (6%, v/v) was added. Un incubation at  $85^{\circ}\text{C}$  for 2h, and then for 1 Aoulouz in an ultrasound bath was performed. The mixture was dried, then approximately 250  $\mu\text{l}$  of water and 750  $\mu\text{l}$  of chloroform were added,

and the lower phase was collected using separating funnel. The volatile metabolites were analyzed using the Gas Chromatography (GC) (Agilent 7890A Series) coupled to Mass Spectrometry (MS). 4  $\mu\text{L}$  of samples was injected into a column capillary (123-BD11, 15 m  $\times$  320  $\mu\text{m}$   $\times$  0.1  $\mu\text{m}$ ) using a splitless injection. The quadrupole temperature and ion source temperature were set at 280°C and 230°C, respectively. Helium gas was used as a carrier, with a flow rate of 3 mL min<sup>-1</sup>.

*Sample identification and quantification* Metabolites were putatively identified by similarity matching their mass spectra to spectra in the NIST 2014 MS library (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD), and the concentration (calculated using the peak area of the internal reference Dodecane) was expressed as  $\mu\text{g/g}$  of fresh weight.

Based on the chromatogram results, the peaks with similarity index higher than 75% were considered effective metabolites in the experiments, while those with a similarity index less than 70% similarity index were removed from the data.

Peak areas used to determine the concentration of metabolites in each sample are shown in Supplementary data (Table S3). The compounds were quantified by GC-MS using the internal standard (Dodecane: 0.75g/ml as initial concentration) to determine their concentrations. The average peak areas of the internal standard corresponding to the known concentration was used as reference to normalize peak areas of all compounds to the concentration, which further normalized by the fresh weight of each sample (expressed as  $\mu\text{g/g}$  of fresh weight).

#### **Data processing and statistical analysis**

Metabolomics data sets generated by GC-MS were carried out by Metabo-Analyst 5.0 (Pang *et al.*, 2021) software (<https://www.metaboanalyst.ca/>), an online statistical package. After normalized (Log transformation) and auto-scaled (unit variance scaling), the metabolites alterations among experimental groups were analyzed by multivariate tests, including principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA).

Differentially expressed metabolites, between the “DS” and “CK”, were detected by the first principal component of VIP (Variable Importance in the Projection) (Lin *et al.*, 2011). Variables with  $\text{VIP} \geq 1$ , Student’s t-test  $P < 0.05$  and fold-change  $\geq 1$  were considered significantly accumulated. The metabolites pathway was constructed by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <https://www.genome.jp/kegg/>) and the network analysis was performed using MetaboAnalyst (Xia *et al.*, 2010).

### III.4.6. Results

#### Lipid profile changes in leaves of Argan ecotypes under drought stress

In this study, lipidomic profiles of four agran ecotypes (Lks, Rbi, Aoz and Adn) were first investigated. The extracts argan leaves were analyzed via GC-MS analysis. Over 300 (Admin's ecotype), 400 (Rbai's ecotype), 600 (Aoulouz's ecotype) and 700 (Lkhssas's ecotype) peaks were manually assigned and quantified in each ecotype. At last, 229 of these peaks were structurally identified as metabolites in argan leaves and that were assigned to 14 classes (Table S1). The most abundant class was the prenol lipids (59 metabolites, 26%), followed by the fatty acids (43 metabolites, 19%), Alkenes and alkynes (28 metabolites, 12%), Benzene and substituted derivatives (18 metabolites, 8%), Alkanes (13 metabolites, 6%), Steroids and steroid derivatives (12 metabolites, 5%) and others (56 metabolites, 24%). The full information of 229 identified metabolites is shown in Table S1 in the Supporting Information.

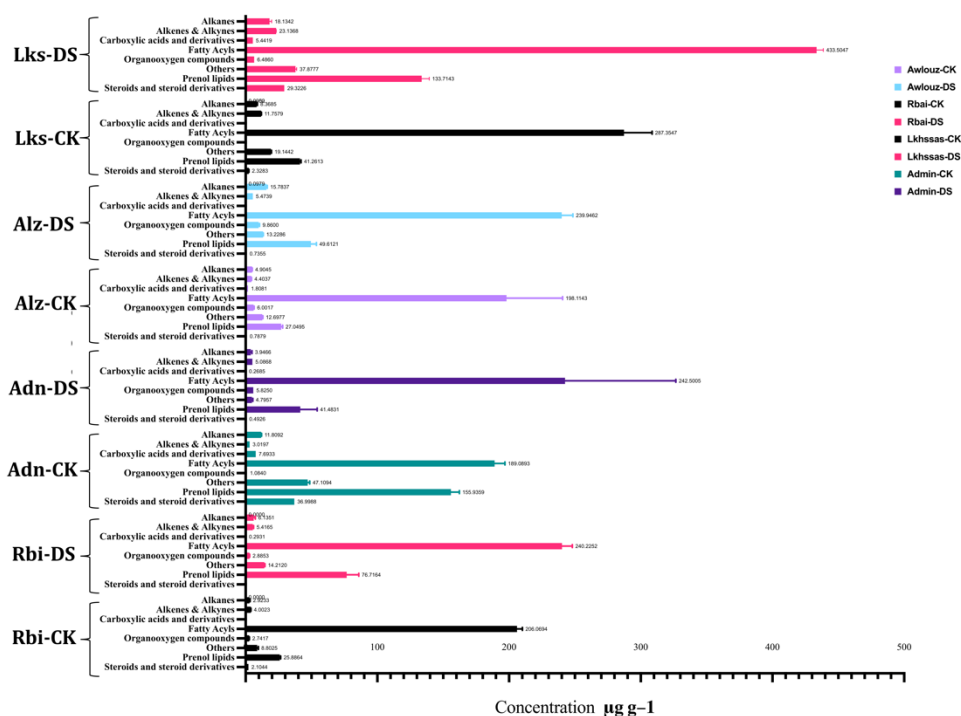


Fig. 2. A classification of all components detected by GC-MS in the four ecotypes under control (CK) and drought stress (DS). Each barre indicated the sum of each class ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ). The clustering results based on the sum of each class metabolites of GC-MS analysis.

The Fig. 2 shows the distribution of all metabolites for each ecotype under “CK” and “DS”. A significant change was observed in major lipid classes, especially fatty acids and prenol lipids. The content of total fatty acids was increased in “Alz”, “Rbi”, “Lks” and “Adn” ecotypes by 10%, 7%, 5% and 12%, respectively compared to “CK” ecotypes. The same results were

observed in prenol lipids, Alkanes, and alkenes and alkynes classes that increased in all ecotypes except “Adn”.

After normalizing the data based on the abundance of the 229 components detected, the PCA and PLS-DA were conducted. Fig. 3 showed the PCA and PLS-DA score plots of lipid profile changes in leaf tissues of the all ecotypes, exposed to drought stress. PCA revealed that 50.6 % of the observed variance was explained by the first two principal components, PC1 (23.8 %) and PC2 (18.8 %) (Fig. 3a). A visible segregation between CK and droughted plants was found, clearer in “Lks”, “Rbi” and “Adn”. The samples from the same ecotypes and treatments were grouped together, demonstrating the high quality of the data. This result indicated that drought stress and argan ecotypes had combinatory effect on metabolites variation of the samples, and both factors influenced metabolite variation significantly.

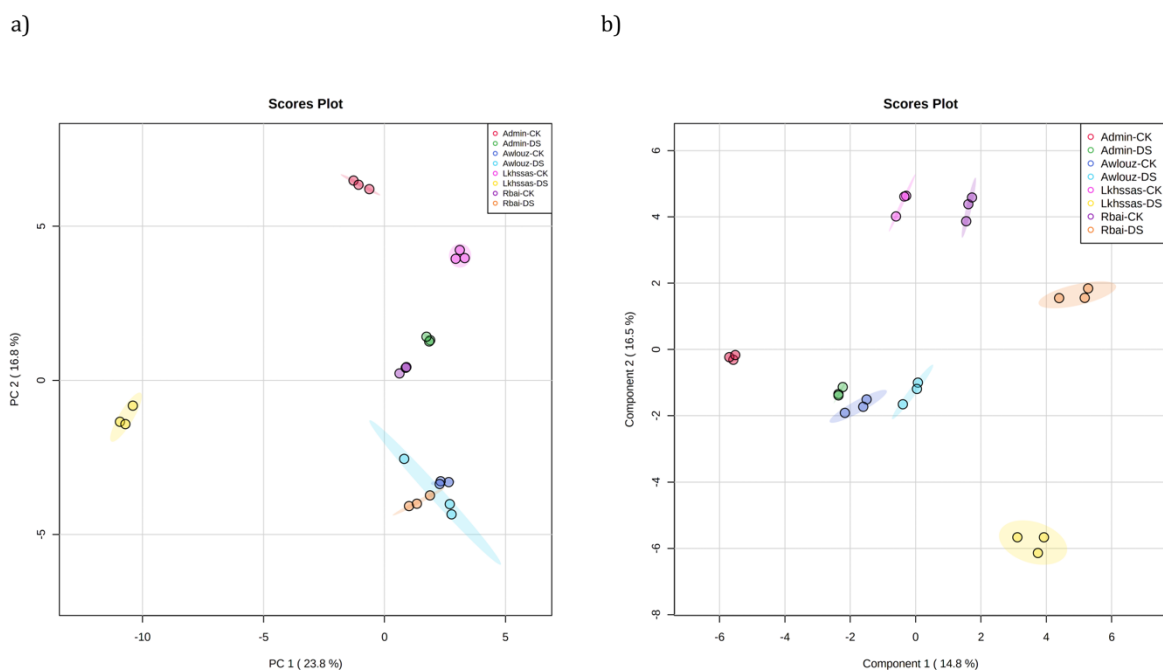


Fig. 3. PCA scores plot (a) and PLS-DA scores plot (b) on lipidomics dataset (229 components) in leaves of all ecotypes exposed to drought stress (three biological replicates). CK: control, DS: drought stress.

Therefore, a supervised PLS-DA was performed, aiming to determine the components or latent variables that discriminate as much as possible the group samples according to their maximum covariance. The score plots based on the PLS-DA model revealed a discriminative boundary between control and stressed plants from Lkhssas ecotype, whereas a very small discriminations were observed between each of remaining CK/DS ecotypes (Fig. 3b). In addition, eight distinct sample groups were established, which can be grouped in four sub-clusters based on their location in the dimension space of the PLS-DA score. The first four

groups were placed in the negative quadrant of the PLS-DA score plot, and represented the DS and CK plants of “Alz” and “Adn”. The second two groups were found in the positive quadrant of the PLS-DA score plot, and contained “Rbi” DS and CK. Finally, two other sample groups, including “Alz”-DS and “Alz”-CK plants were located in Aoulouz-/x+ and Aoulouz+/x- axis respectively.

PLS-DA analysis was also applied for each of the four ecotypes separately including Lks-CK vs Lks-DS, Rbi-CK vs Rbi-DS, Aoz-CK vs Aoz-DS and And-ck vs And-DS in order to contrast the datasets for better understanding. As given in Figure S1, the scot plots of PLS-DA demonstrated that the droughted samples were separated from the control samples along the first principal component, PCA1.

Given the large numbers of detected components which are distributed in Lkhssas, Rbai, Aoulouz and Admin with 126, 108, 101 and 84 components, respectively, we are focused only on the metabolites that identified in both treatment (“DS” and “CK”) of all ecotypes. To visualize the common metabolites in each contrast ecotype (DS vs CK), a venn diagrams were performed (Figure S2). Lkhssas ecotype have 36 components in common between CK/DS and 90 unique (for 26 CK and for 64 DS) (Figure S2-A), while Rbai ecotype show 41 common ones between CK/DS and 67 unique (for 20 CK and for 47 DS) (Figure S2-B). In Aoulouz ecotype 57 metabolites were specifically accumulated (for 23 CK and for 34 DS) and 44 are in common between CK/DS (Figure S2-C), whereas 30 metabolites were shared between DS and CK and 54 were exclusively identified in Admin ecotype (for 42 CK and for 12 DS) (Figure S2-D).

All the common components (Lks-DS/CK (37), Rbi-DS/CK (40), Alz-DS/CK (44) and Adn-DS/CK (30)) were analyzed via venn diagram to visualize the overlapping compounds between all the four ecotypes. The shared and specific metabolites for the different ecotypes under drought stress are presented in Fig. 4. It further confirms that specific metabolic adjustments occur at the different ecotypes under drought stress in argan leaves, though common metabolites were overlapped between two, three or four ecotypes. We identified 7, 6, 2 and 10 exclusive metabolites where levels have changed in Lks-DS/CK, Rbi-DS/CK, Adn-DS/CK and Alz-DS/CK, respectively. In particularly, we identified 21 compounds (core metabolites) commonly and constantly changed in all the four ecotypes exposed to drought stress (Fig. 4, Table 1). The major common metabolites were belonged fatty acid class. From the generated Venn Diagram, the metabolites with  $VIP \geq 1$  and  $p \text{ value} < 0.05$  were considered as differentially expressed metabolites. To elucidate the components responses at each

ecotype under drought, the pairwise PLS-DA analysis and VIP values (Alz-CK vs Alz-DS, Lks-CK vs Lks-DS, Rbi-CK vs Rbi-DS and Adn-CK vs Adn-DS) were separately conducted.

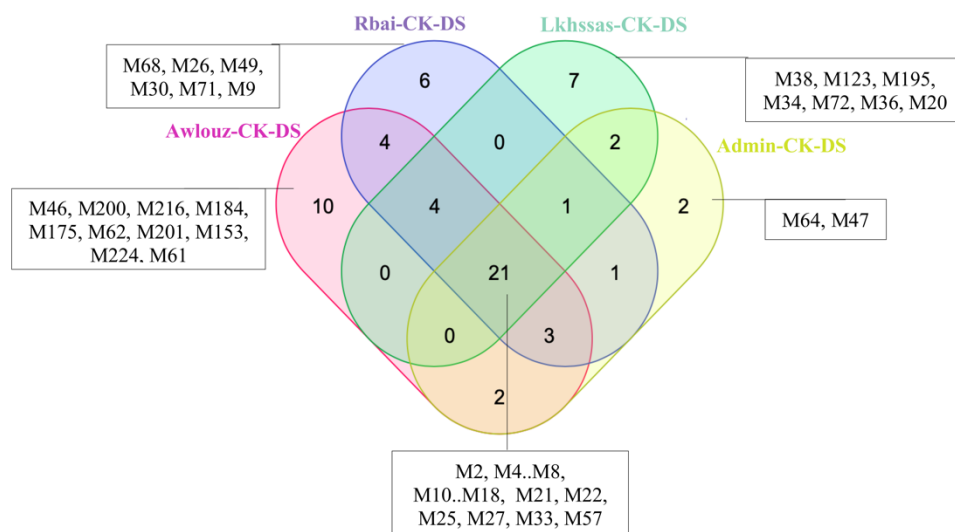


Fig. 4. Venn diagrams of common metabolites (between DS and CK ecotypes) revealing commonly or uniquely regulated metabolites under drought conditions and between four ecotypes of *Argania spinosa* L.

#### Analysis of the common metabolites for the four Argan ecotypes under drought stress

The PLS-DA analysis of the “CK” group and “DS” group of 21 metabolites in Aoulouz showed that the “CK” group could be completely separated from the drought stress group along the first component (Fig. 5a1). Also, the differential compounds between every two groups were screened by combining variable importance in the projection score (VIP) greater than 1, the value of  $VIP \geq 1$  were showed in Fig. 5a,2. In the drought stress the metabolites with the most significant change ( $p < 0.01$ ) in concentration were M7 (Margaric acid, C17:0), M6 (Palmitic acid, C16:0) M4 (Myristic acid, C14) and M18 (Melissic Acid, C30:0) which increased 2.7, 1.9, 1.8 and 1.7-fold, respectively compared to “CK”. The level of other metabolites such as M2 (Lauric acid,  $p < 0.05$ ), M22 (Alpha-Linolenic acid,  $P > 0.05$ ) and M25 (alpha-hydro-palmitic acid,  $P > 0.05$ ) were also increased under drought stress. In contrary, the contents of M13 (Lignoceric acid,  $P < 0.05$ ) and M14 (Heynic acid,  $P > 0.05$ ) were decreased in samples stressed.

Differentially to the changes observed in “Alz”, water stress altered other metabolite levels in “Rbi” ecotype (Fig. 5b,2). For example, the concentrations of some fatty acids and their derivatives such as M6 (Palmitic acid,  $p > 0.05$ ), M14 (Hyenic acid,  $P < 0.05$ ), M27 (Methyl 2-hydroxy-tetracosanoate), M33 (3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1ol) and M8 (Stearic acid,  $> 0.05$ ) were increased under drought stress. In addition, Alpha-tocopherol (Alpha-

tocopherol, M57) and Myristic acid (C14) were decreased significantly ( $p < 0.05$ ) and not significantly in alpha-hydro-palmitic acid (M25) under drought stress.

The relative contents of saturated fatty acid and unsaturated fatty acid showed a significant accumulation in stressed ecotype of Lkhssas (Fig. 5c1,2). In more detail, Carboxylic Acid (C27:0), Linolenic acid (C18:3), Margaric acid (C17:0), Stearic acid (C18:0), Cerotic Acid (C26:0) and Arachidic acid (C20:0) were increased significantly ( $p < 0.05$ ) under drought stress, while Lauric acid (C12:0) showed an insignificant increase ( $p > 0.05$ ).

In Admin ecotype (Fig. 5d1,2), a total of five metabolites were up- and down-accumulated under water stress. M2 Lauric acid ( $p < 0.001$ ), M12 Tricosylic Acid ( $p < 0.05$ ) and M6 Palmitic acid ( $p > 0.05$ ) were increased, while M5 C15:0 and M22 Linolenic acid were decreased in stressed ecotype of Admin.

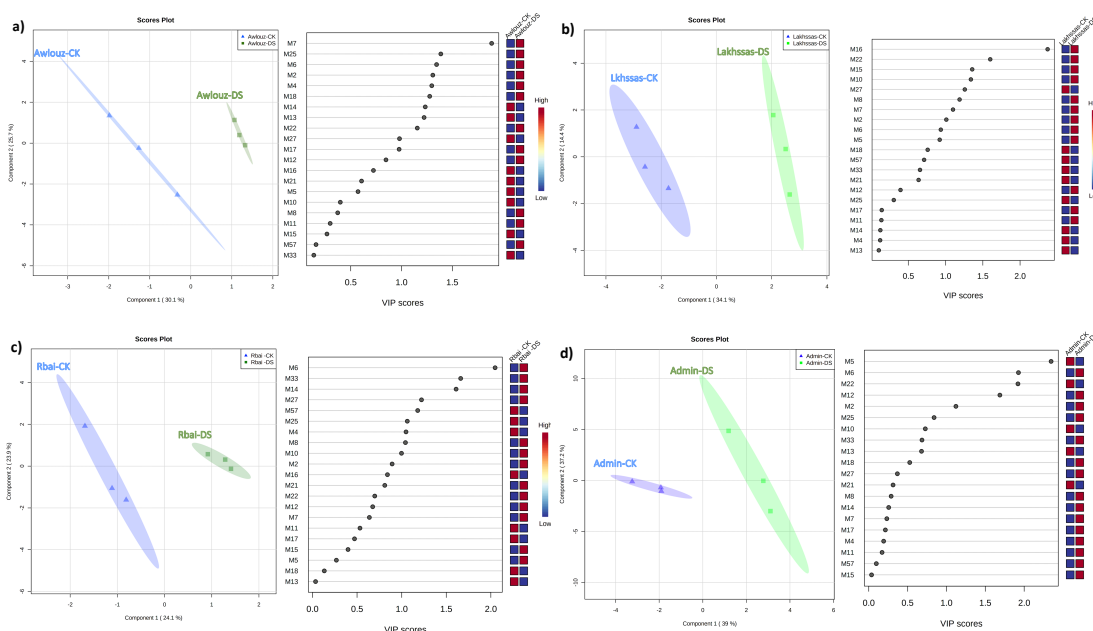


Fig. 5. VIP scores from PLS-DA analysis showing the discriminating metabolites leading to the separation between control and drought. a) Aoulouz b) Lkhssas c) Rbai d) Admin. Red means the metabolite was up-regulated and blue indicates that the metabolite was down-regulated

### Metabolic pathways enrichment analysis

To better investigate the biological functions of identified metabolites, a pathway enrichment analysis for each ecotype was performed using *Arabidopsis thaliana* as the pathway library (Fig. 6a-d). Among the metabolic pathways that were significantly enriched with differentially expressed metabolites, we have fatty acid biosynthesis, fatty acid elongation, fatty acid degradation, linoleic acid metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acid and alpha-linolenic acid metabolism, suggesting that these metabolic pathways play important roles in adaptive response to drought stress in *Argania spinosa* L. Table 2 shows the

metabolites involved in each pathway, number of hit metabolites and false discord rate (FDR) of the pathway. Based on the enrichment analysis, 5, 4, 2 and pathways were significantly enriched in “Adn”, “Alz”, “Lks” and “Rbi” respectively, with p value less than 0.05, as shown in Fig. 6a-d (Table 2).

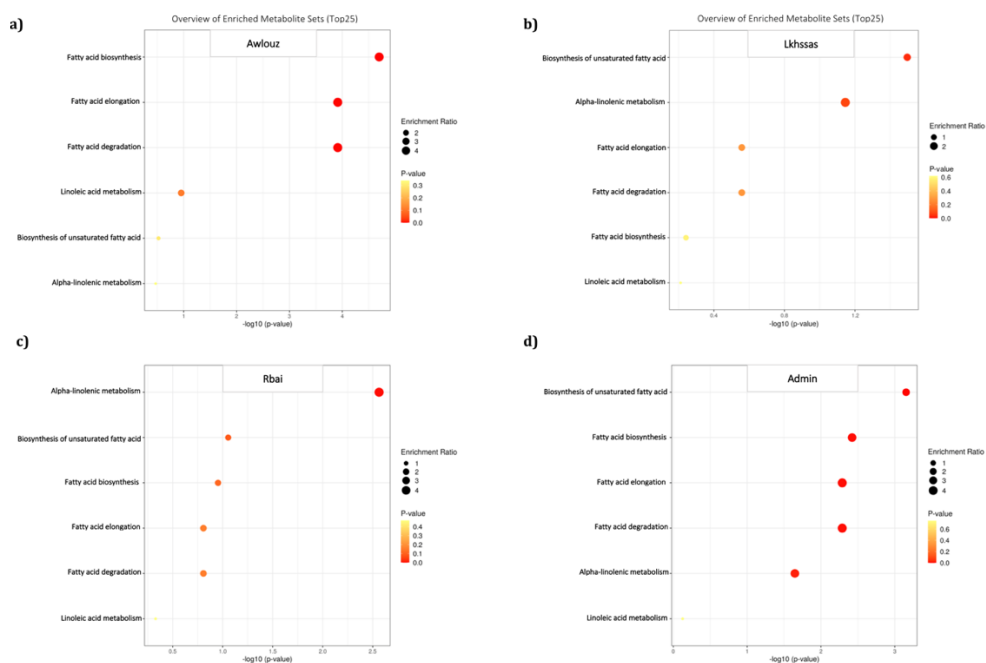


Fig. 6. Pathway enrichment analysis of the differentially expressed metabolites of *Argania spinosa* L. ecotypes. a) Enriched KEGG pathways for Aoulouz, b) Enriched KEGG pathways for Lkhssas, c) Enriched KEGG pathways for Rbai, d) Enriched KEGG pathways for Admin

### III.4.7. Discussion

Drought is one of the major environmental constraints limiting plant performance, development, and affects yield throughout the world. This factor causes the damaging effects in all plant organs at the morphological, physiological, and biochemical level (Michaletti *et al.*, 2018). Thus, plants achieve sophisticated responses and adaptations to drought stress, to maintain optimal growth under stress conditions. For these complex responses in plants, several genes, proteins and metabolites are involved; however, lipids play vital roles in cellular functions, such serving as structural molecules in membrane and affecting the function of membrane proteins (Liu *et al.*, 2021). Therefore, understanding plant's lipid profile variations could help identify the components that will shed light on the mechanisms involved in the adaptation of drought stress.

Mediterranean region, including Morocco, faces diverse climatic conditions especially drought (Nogués and Baker, 2000). Some endemic species are well adapted to these

conditions like the argan tree (Msanda *et al.*, 2005; Diaz Baradas *et al.*, 2010). *Argania spinosa* L. is an example of an avoider tree growing under arid and semi-arid conditions. It is still unclear lipidomic profiling in argan tree under of drought stress. In this study, plant of *Argania spinosa* L. ecotype, “Alz”, “Lks”, “Rbi” and “Adn” were subjected to 6 weeks of drought stress to investigate, for the first time, the variation of compounds under drought using lipidomic profiling analysis in argan ecotypes via GC-MS technique.

Dataset from GC-MS results in this study (229 components including common and unique ones) show that the fatty acids and prenol lipids were more abundant in the four ecotypes and could be related to drought stress. Various plants have shown changes in lipid profiles in responses to abiotic stress (Chen *et al.*, 2006; Gasulla *et al.*, 2013; Narayanan *et al.*, 2016). It is also reported that lipid preserves cell compartmentation, during drought stress (Gigon *et al.*, 2004). Many reports have shown that stress can lead to the variations of total lipids and plastid lipids in different plant species with known contrasting tolerance (Zhang *et al.*, 2005; Toumi *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011).

The total number of metabolites produced in each ecotype (CK and DS) was previously described and given in the supporting information (Table S1). The total amount of each class in stressed versus the control is reported in Table 4. Major classes of lipids level reveal an increase under drought stress leaves in all ecotypes, except Admin, compared to “CK”. The content of *A. spinosa* foliar fatty acids which is the most abundant lipid classes present an increase in all stressed plant ecotypes. Nevertheless, it enhances sharply in Lkhssas. Despite the levels of major lipids increased in stressed ecotypes, indicating an increase in lipid biosynthesis and/or a decrease in lipid degradation. This trend was prevalent for all other classes in Aoulouz, Lkhssas and Rbai ecotypes, whereas for Admin, a decrease trend was observed for prenol lipids, alkanes, steroids and carboxylic acids. This result was similar to those reported by Moradi and their colleagues, that noted an increase in steroids and fatty acids content in stressed plants compared to the watered ones (Moradi *et al.*, 2017). Even though this result is in contrast with those obtained in other plants such as *Salvia officinalis* (Bettaieb *et al.*, 2009) and *Arbidopsis thaliana* (Gigon *et al.*, 2004).

As the main component of membrane lipids, fatty acids play an important role in different biological functions, like a potential source of reserve energy and essential components of membrane lipids in living organisms and has a crucial role in plant resistance (Upchurch, 2008). For this reason, our interest will focus on the common fatty acids showed by venn diagram (Fig. 4) which accumulated in both stressed and control of each ecotype.

Comparing the four ecotypes and based on VIP score ( $\geq 1$ ), fold change ( $> 1$ ) and p value ( $< 0.05$ ), 6 metabolites were identified as most significant in “Alz” and “Lks” due to drought conditions. Otherwise, only 3 metabolites were accumulated significantly in both ecotypes “Rbi” and “Adn” (Table S2). In general, 5 metabolites were positively accumulated and 1 was decreased in “Alz”. However, in “Lks” 4 metabolites showed increased accumulation and 2 were decreased due to drought stress. The present study reported a significant accumulation of fatty acids and their constitutive composition was affected by ecotypes. Under well-watered conditions, Linolenic acid (18:3) was the most abundant fatty acid in these four ecotypes, ranging from 25.4 to 47.2%, followed by Stearic acid (18:0) that accounted for 3.7 to 6.2 % of total fatty acids. The sum of other fatty acids was less than 7.5% of the total fatty acids. Linolenic acid, the unsaturated fatty acid, is essential component for membrane integrity and the functionality of important membrane proteins (Sánchez-Martín *et al.*, 2018). It has been reported that, during drought stress, Linoleic acid was the most important fatty acid in different plant species, and their accumulation prevents membrane rigidification and maintains membrane structural and functional integrity in plants (Mikami and Murata 2003, Upchurch 2008, Zhang *et al.*, 2010).

Comparing to “CK”, the composition of fatty acid showed an alteration under drought conditions. All ecotypes demonstrated an increase in unsaturated Linolenic acid with 2.7, 8, 44.7, and 16.7% in “Alz”, “Rbi”, “Lks” and “Adn”, respectively (Table 3). Increasing the contents of unsaturated fatty acids in argan leaves under drought stress is an effective way to cope with stress. These increases were significant only in “Lks”. Our result is similar to other studies, in which relative content of Linolenic acid increased by drought in *Thymus serpyllum* L. (Moradi *et al.*, 2017) and *Arabidopsis thaliana* L. (Gigon *et al.*, 2004). Linolenic acid alteration in drought-tolerant plants was widely reported (Xu *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2011, Kang *et al.*, 2019). Indeed, an increase in the Linolenic acid content in *Kentucky blue-grass*, *bermudagrass* and *Triticum* under drought stress has been reported (Xu *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2011, Kang *et al.*, 2019). Conversely, in other plants it was found that drought stress reduces Linolenic acid (Dakhma *et al.*, 1995; Matos *et al.*, 2002; Olsson, 1995). Moreover, the unsaturated fatty acid, alpha-linolenic acid (18:3), accumulated significantly in both sensitive (*Populus deltoids*) and tolerant (*Populus simonii*) poplar in response to drought stress (Jia *et al.*, 2020). The changes in unsaturation of membrane lipids administered by a cascade of fatty acid desaturases (FADs) are also an important feature of plant adaptation under stress conditions (Tshabuse *et al.*, 2018; Upchurch, 2008). In addition, Torres-Franklin

*et al.* (2007) reported that several distinct FADs catalyze the conversion of linoleic acid (18:2) to linolenic acid (18:3) in plant species; thus, future research on the expression level of these FADs under drought stress might provide a better understanding of the tolerance mechanisms.

The accumulation of fatty acid metabolites is one of the important mechanisms to handle drought stress in plant species (Qu *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2019). It was observed that, only in “Alz” ecotype, Palmitic acid (16:0) concentration was elevated significantly under drought stress. Similar finding was reported in Oat, Wheat and Populus plants which showed a significant increase under drought (Sánchez-Martín *et al.*, 2018; Marček *et al.*, 2019; Jia *et al.*, 2020). There are contradictory reports for effects of drought on Palmitic acid content. Some studies demonstrated a significant negative effect of drought on the Palmitic acid concentration in other species such as *Arachis hypogaea L.* and *Carthamus tinctorius L.* (Ashrafi *et al.*, 2010; Gundaraniya *et al.*, 2020). It was previously reported that Palmitic acid was insignificantly affected by drought stress (Petcu *et al.*, 2001). Our result in “Lks”, “Rbi” and “Adn” is similar to those obtained by these authors.

In both “Alz” and “Lks”, Margaric acid (17:0) was increased in drought stress but no significant change was observed in both ecotypes “Adn” and “Rbi”. An increase in Margaric acid has also been observed in Wheat (Marček *et al.*, 2019) and Maize (Li *et al.*, 2001) under drought stress. Lauric acid (12:0) was affected similarly by drought in both “Alz” and “Adn”. Its concentration was increased significantly whereas it was not significantly increased for other ecotypes at same conditions. In Lkhssas, the content of Stearic acid and Arachidic acid were increased significantly under the drought conditions compared to “CK”. Gundaraniya and colleagues reported an increase of Stearic acid when the Peanut plant grown under drought stress (Gundaraniya *et al.*, 2020). This result is consistent with other studies that detected accumulation of Arachidic acid in response to drought (Li *et al.*, 2001).

The differential metabolites pathway map indicates that some essential metabolites were significantly implicated in the drought stress response. For example, in the biosynthesis of unsaturated fatty acids pathway (Fig. 7), metabolites such as, Palmitic acid (C00249), Stearic acid (C01530), Arachidic acid (C06425), Linoleic acid (C01595) and Alpha-linolenic acid (C06427) were significantly involved in the pathway. Those metabolites (saturated and unsaturated fatty acid), except Palmitic acid, were significantly increased only in Lkhssas ecotype. Previous study in wild soybean revealed that unsaturated fatty acids metabolite levels increased significantly under drought stress (Wang *et al.*, 2019). In addition to their role as a

protectant of cell membrane components, unsaturated fatty acid could also act as an osmotic substance that protect cells from injury.

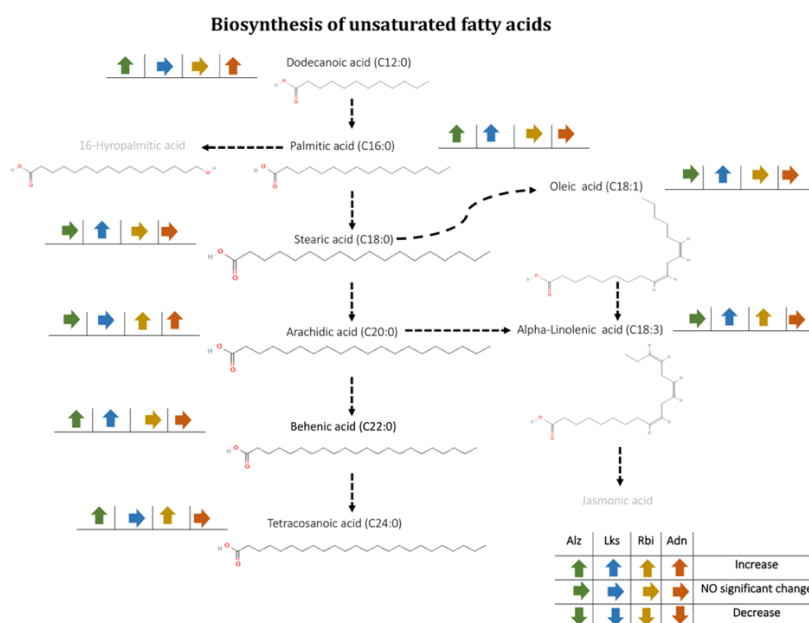


Fig. 7. Changes in metabolites involved in biosynthesis of unsaturated fatty acids under drought stress. The undetected metabolites are presented right arrow. The up and down arrows represent increased and decreased metabolite levels, respectively. Green, blue, mustard and red colors indicate the 'Alz', 'Lks', 'Rbi' and 'Adn', respectively.

Metabolites involved fatty acid biosynthesis were significantly altered, especially in Aoulouz ecotype. Drought stress has a significant influence on fatty acid content in plant response to such stress. The fatty acid metabolites involved in this pathway include Palmitic acid, Lauric acid and Margaric acid. In the alpha-linolenic acid metabolism pathway, Linolenic acid changed significantly in Lkhssas ecotype in response to water stress. In the thyme plants, Alpha-linolenic acid (18:3) metabolism was significantly involved in drought stress response (Moradi *et al.*, 2017). The polyunsaturation of fatty acid has proved that is imparted to the tolerance of plants under abiotic stress (Gundaraniya *et al.*, 2020), and their increase especially Alpha-linolenic acid might provide the potential for Jasmonic Acid increase to cope with drought (Jia *et al.*, 2020). Enzymes like fatty acid desaturases are affected by water stress and hence increase unsaturated fatty acids (Mohamed and Latif, 2017).

Some metabolites were enriched in numerous pathways. For example, a significant change in Palmitic acid affecting fatty acid elongation, fatty acid degradation and fatty acid biosynthesis pathways. In Aoulouz, both fatty acid elongation and fatty acid degradation pathways were significantly altered by drought stress.

### III.4.8. Conclusion

The current study provides lipidic profile changes at the global level caused by drought stress in the argan plants for the first time. According to our findings, the leaves of the four argan ecotypes exposed to water deficiency displayed considerable alterations in numerous metabolite classes. Lipidomic profiling, complemented with a PCA and PLS-DA, allowed a better separation of “CK” and “DS” from four contrasting ecotypes (‘Aol’, ‘Lks’, ‘Rbi’ and ‘Adn’). A total of 229 metabolites were identified as belonging to the 14 classes with fatty acid and prenol lipids that are the most abundant lipids classes. From the components present in all ecotypes well-watered and stressed (“Lks”, “Rbi”, “Alz” and “Adn”) and based on VIP score ( $\geq 1$ ), fold change ( $>1$ ), 21 metabolites including 20 fatty acids and 1 steroid, with significant change under drought stress and the majority of their content showed up-accumulation. All of these drought-responsive metabolites were involved in different pathways and can potentially help plants to overcome drought. Transcriptomics and proteomics could also be helpful to understand the mechanisms underlying the drought tolerance of argan tree.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS** Conceived and designed the experiments: RABEH Karim and RACHIDI Farid. Performed the experiments: RABEH Karim, RACHIDI Farid and LAGHMARI Ghizlan. Analyzed the data: RABEH Karim. Contributed reagents/materials/analysis tools: FERRADOUSS Abderrahim, AASFAR, Abderrahim, EL ARROUSSI Hicham, OUAJDI Mohamed and EL ANTRY Salwa. Writing—original draft: RabeH Karim. Writing—review & editing: SBABOU Laia. Supervision: BELKADI Bouchra and FILALI-MALTOUF Abdelkarim.

### FUNDING

None

### DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors report no declarations of interest.

Table1. Concentration (Means  $\pm$  SEM) of 21 common metabolites in leaves of normal and drought-stressed *Argania spinosa* L. plants.

			Aoulouz-CK	Aoulouz-DS	Rbai-CK	Rbai-DS	Lkhssas-CK	Lkhssas-DS	Admin-CK	Admin-DS
			Fatty Acyls ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )							
M2	Lauric acid	C12:0	0.63* $\pm$ 0.061	1.16* $\pm$ 0.052	0.57 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.032	0.54 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.098	0.38 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.064	0.86 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.315	0.44** $\pm$ 0.035	1,07** $\pm$ 0.000
M4	Myristic acid	C14:0	5.94** $\pm$ 0.118	10.65** $\pm$ 0.462	8.60* $\pm$ 0.225	5.50* $\pm$ 0.924	9.85* $\pm$ 0.687	18.77* $\pm$ 1.328	2.80 <sup>s</sup> $\pm$ 0.283	3.6 <sup>ns</sup> $\pm$ 1.1490
M5	Pentadecanoic acid m.e	C15	55.40 <sup>ns</sup> $\pm$ 1.210	48.18 <sup>ns</sup> $\pm$ 2.436	39.54** $\pm$ 1.097	49.92** $\pm$ 0.367	59.8* $\pm$ 1.680	74.64* $\pm$ 4.492	47.31** $\pm$ 3.155	1.06** $\pm$ 0.303
M6	Palmitic acid	C16:0	2.35** $\pm$ 0.090	4.38** $\pm$ 0.078	2.20 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.667	3.97 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.015	4.81* $\pm$ 0.179	6.11* $\pm$ 0.104	2.97 $\pm$ 0.777	50 $\pm$ 17.283
M7	Margaric acid	C17:0	1.59** $\pm$ 0.032	2.89** $\pm$ 0.046	1.63 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.064	1.97 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.130	1.57* $\pm$ 0.020	3.41* $\pm$ 0.326	2.85 $\pm$ 0.182	3,06 $\pm$ 0.000
M8	Stearic acid	C18:0	11.76 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.364	12.54 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.095	14.29 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.009	14.96 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.739	13.56* $\pm$ 1741	25.05* $\pm$ 0.069	8.66 $\pm$ 0.566	13.38 $\pm$ 5.182
M10	Arachidic acid	C20:0	4.17 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.453	2.95 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.104	3.15** $\pm$ 0.136	4.49** $\pm$ 0.032	4.6* $\pm$ 0.765	9.10* $\pm$ 0.973	1.76 $\pm$ 0.058	2.17 $\pm$ 0.71
M11	Behenic acid	C22:0	2.32** $\pm$ 0.202	2.53** $\pm$ 0.193	3.20 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.078	3.84 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.497	2.83** $\pm$ 0.191	6.94** $\pm$ 0.040	1.54 $\pm$ 0.110	1.85 $\pm$ 0.485
M12	Tricosylic acid	C23:0	0.44 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.024	0.52 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.084	0.47 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.040	0.37 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.052	0.54 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.104	2.26 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.883	0.23* $\pm$ 0.115	0,59* $\pm$ 0.00
M13	Lignoceric acid	C24:0	4.78* $\pm$ 0.150	3.94* $\pm$ 0.173	6.39** $\pm$ 0.499	3.03** $\pm$ 0.667	5.59 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.029	5.74 <sup>ns</sup> $\pm$ 1.605	2.95 $\pm$ 0.081	3.27 $\pm$ 0.895
M14	Hyenic Acid	C25:0	1.62 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.087	1.54 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.349	1.29* $\pm$ 0.133	2.33* $\pm$ 0.139	2.41 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.104	2.41 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.618	0.67 $\pm$ 0.015	0,92 $\pm$ 0,300
M15	Cerotic Acid	C26:0	3.27 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.072	3.10 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.153	3.42 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.156	2.24 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.439	3.52** $\pm$ 0.727	11.37** $\pm$ 0.918	2.25 $\pm$ 0.141	2,58 $\pm$ 0,808
M16	Carboceric Acid	C27:0	1.43 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.843	0.79 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.254	2.84 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.245	1.93 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.974	1.80** $\pm$ 0.000	5.64** $\pm$ 0.000	0.00 $\pm$ 0.000	0.00 $\pm$ 0.000
M17	Montanic Acid	C28:0	7.58 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.162	7.45 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.505	5.45 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.603	4.65 <sup>ns</sup> $\pm$ 1.259	11.43 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.381	12.68 <sup>ns</sup> $\pm$ 2.309	2.69 $\pm$ 0.090	3.62 $\pm$ 12.12
M18	Melissic Acid	C30:0	6.38** $\pm$ 0.015	11.13** $\pm$ 0.052	7.90 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.035	7.34 <sup>ns</sup> $\pm$ 1576	10.15* $\pm$ 0.017	15.81* $\pm$ 1.504	2.58** $\pm$ 0.049	4.13** $\pm$ 1.172
M21	Linoleic acid	C18:2	2.07 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.000	1.75 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.147	1.88 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.231	1.59 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.000	1.86* $\pm$ 0.349	3.37* $\pm$ 0.678	1.10 $\pm$ 0.107	1.82 $\pm$ 0.638
M22	Linolenic acid	C18:3	109.51 <sup>ns</sup> $\pm$ 36.07	114.73 <sup>ns</sup> $\pm$ 7.705	94.52** $\pm$ 1.377	112.89** $\pm$ 2.546	58.97** $\pm$ 24.716	162.50** $\pm$ 0.000	102.34 $\pm$ 4.145	140,92 $\pm$ 53.546
M27	Methyl 2-hydroxy-tetracosanoate		1.91 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.012	1.92 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.090	2.25** $\pm$ 0.173	2.85** $\pm$ 0.144	3.60* $\pm$ 0.231	2.7* $\pm$ 0.280	0.74 $\pm$ 0.003	1.22 $\pm$ 0.462
M25	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-, m.e		3.20 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.124	3.04 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.165	1.83 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.064	1.80 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.176	2.12* $\pm$ 0.191	3.37* $\pm$ 0.084	1.88* $\pm$ 0.338	3.26* $\pm$ 0.000
M33	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1ol		2.01 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.482	1.80 <sup>ns</sup> $\pm$ 0.196	0.54** $\pm$ 0.000	1.43** $\pm$ 0.000	0.37** $\pm$ 0.000	0.29** $\pm$ 0.000	1.92 $\pm$ 0.485	2.92 $\pm$ 0.000
M57	Vitamin E		5.34 $\pm$ 0.719**	12.66 $\pm$ 0.209**	9.19 $\pm$ 0.381 <sup>ns</sup>	9.06 $\pm$ 3333 <sup>ns</sup>	13.79 $\pm$ 0.754 <sup>ns</sup>	16.51 $\pm$ 3902 <sup>ns</sup>	8.67 $\pm$ 3.499	7.54 $\pm$ 0.000

The relative metabolite contents are the means of data from three biological replicates. Using the formula  $\log(\text{drought}/\text{control})$  calculate Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. CK, control treatment. DS, drought stress \*, \*\*Indicate significant ( $P < 0.05$ ) and highly significant ( $P < 0.01$ ) differences, respectively between each ecotype control and their correspondent stressed.

Table 2. Pathway names, total metabolites involved in that pathway, metabolites significantly accumulated in present study (hits), false discord rate (FDR) and p values.

Pathway names	Total Compounds	Hits	The significantly changed biological pathways							
			Aoulouz		Rbai		Lkhssas		Admin	
			FDR	P values	FDR	P values	FDR	P values	FDR	P values
Fatty acid biosynthesis	47	3 <sup>a</sup>	0.00012	<b>&lt;0.001</b>	0.0163	>0.05	0.1913	>0.05	0.00421	<b>&lt;0.01</b>
Fatty acid elongation	39	1 <sup>b</sup>	0.00024	<b>&lt;0.001</b>	0.1871	>0.05	0.2147	>0.05	0.00772	<b>&lt;0.01</b>
Fatty acid degradation	39	1 <sup>c</sup>	0.00024	<b>&lt;0.001</b>	0.1871	>0.05	0.4146	>0.05	0.00772	<b>&lt;0.01</b>
Linoleic acid metabolism	5	1 <sup>d</sup>	0.16737	>0.05	0.1871	>0.05	0.4146	>0.05	0.00772	>0.05
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	36	5 <sup>e</sup>	0.18715	>0.05	0.1871	>0.05	0.61486	<b>&lt;0.05</b>	0.0270	<b>&lt;0.001</b>
alpha-Linolenic acid metabolism	13	1 <sup>f</sup>	0.46863	<b>&lt;0.01</b>	0.4686	<b>&lt;0.01</b>	0.61486	<b>&lt;0.05</b>	0.7478	<b>&lt;0.05</b>

<sup>a</sup>: Palmitic acid, Myristic acid and dodecanoic acid. <sup>b,c</sup>: Palmitic acid d' Linoleic acid. <sup>e</sup>: Palmitic acid, Alpha-linolenic acid, Arachidic acid, Stearic acid, and linoleic acid. <sup>f</sup>: Alpha-linolenic acid

Table 3. Some fatty acid composition expressed as percentage within total fatty acids

Ecotypes	C16:0	C18:2	C18:3	C18:0	C20:0	C22:0	C17:0	C12:0
-----%								
Alz-CK	1.0	0.9	47.2	5.1	1.8	1.0	0.7	0.3
Alz-DS	<b>1.9</b>	<b>0.8</b>	49.5	5.2	1.3	1.1	1.2	0.5
Rbi-CK	0.9	0.8	40.7	6.2	1.4	1.4	0,7	0.2
Rbi-DS	1.7	0.7	48.7	6.4	1.9	1.7	0.8	0.2
Lks-CK	2.1	0.8	25.4	5.8	2.0	1.2	0.7	0.2
Lks-DS	<b>2.6</b>	<b>1.5</b>	<b>70.1</b>	<b>10.8</b>	<b>3.9</b>	<b>3.0</b>	<b>1.5</b>	0.4
Adn-CK	1.3	0.5	44.1	3.7	0.8	0.7	1.2	0.2
Adn-DS	21.6	0.8	60.8	5.8	0.9	0.8	1.3	0.5

Table 4. The total amount of lipid classes in Argan ecotypes under stressed and non-stressed conditions

Groups	Aoulouz		Rbai		Lkhssas		Admin	
	CK	DS	CK	DS	CK	DS	CK	DS
Fatty Acyls ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	231.96	239.95	206.07	240.23	287.35	433.50	189.27	242.50
Prenol lipids ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	27.05	49.61	25.89	76.72	41.26	133.71	155.94	41.48
Alkanes ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	4.90	15.78	2.92	6.14	8.37	18.13	11.81	3.95
Alkenes & Alkynes ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	4.40	5.47	4.00	5.42	11.76	23.14	3.02	5.09
Carboxylic acids and derivatives ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	1.81	0.10	0.00	0.29	0.10	5.44	7.69	0.27
Organooxygen compounds ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	6.00	9.86	2.74	2.89	0.00	6.49	1.08	5.82
Steroids and steroid derivatives ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0.79	0.74	2.10	0.00	2.33	29.32	37.00	0.49
Others ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	12.70	13.23	8.80	14.21	19.14	37.88	47.11	4.80

## References

- Ashrafi, E., & Razmjoo, K. (2010). Effect of irrigation regimes on oil content and composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(5), 499-506. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1527-8>.
- Badjakov, I., Kondakova, V., & Atanassov, V. (2012). Current view on fruit quality in relation to human health. *Sustainable agriculture and new biotechnologies*, 303.
- Bahl, J., Francke, B., & Monéger, R. (1976). Lipid composition of envelopes, prolamellar bodies and other plastid membranes in etiolated, green and greening wheat leaves. *Planta*, 129(3), 193-201.
- Bettaieb, I., Zakhama, N., Wannes, W. A., Kchouk, M. E., & Marzouk, B. (2009). Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Scientia horticulturae*, 120(2), 271-275. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.10.016>.
- Calvo-Polanco, M., Ruiz-Lozano, J. M., Azcón, R., Molina, S., Beuzon, C. R., García, J. L., ... & Aroca, R. (2019). Phenotypic and molecular traits determine the tolerance of olive trees to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 521-527. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.017>.
- Chakhchar, A., Lamaoui, M., Aissam, S., Ferradous, A., Wahbi, S., El Mousadik, A., ... & El Modafar, C. (2016). Differential physiological and antioxidative responses to drought stress and recovery among four contrasting *Argania spinosa* ecotypes. *Journal of Plant Interactions*, 11(1), 30-40. <https://doi.org/10.1080/17429145.2016.1148204>.
- Chakhchar, A., Wahbi, S., Lamaoui, M., Ferradous, A., El Mousadik, A., Ibensouda-Koraichi, S., ... & El Modafar, C. (2015). Physiological and biochemical traits of drought tolerance in *Argania spinosa*. *Journal of plant interactions*, 10(1), 252-261. <https://doi.org/10.1080/17429145.2015.1068386>.
- Chen, J., Burke, J. J., Xin, Z., Xu, C., & Velten, J. (2006). Characterization of the *Arabidopsis* thermosensitive mutant *atts02* reveals an important role for galactolipids in thermotolerance. *Plant, cell & environment*, 29(7), 1437-1448. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01527.x>
- Dakhma, W. S., Zarrouk, M., & Cherif, A. (1995). Effects of drought-stress on lipids in rape leaves. *Phytochemistry*, 40(5), 1383-1386. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00459-K](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00459-K).
- Das, A., Rushton, P. J., & Rohila, J. S. (2017). Metabolomic profiling of soybeans (*Glycine max* L.) reveals the importance of sugar and nitrogen metabolism under drought and heat stress. *Plants*, 6(2), 21. <https://doi.org/10.3390/plants6020021>
- Díaz-Barradas, M. C., Zunzunegui, M., Ain-Lhout, F., Jáuregui, J., Boutaleb, S., Álvarez-Cansino, L., & Esquivias, M. P. (2010). Seasonal physiological responses of *Argania spinosa* tree from Mediterranean to semi-arid climate. *Plant and soil*, 337(1), 217-231. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0518-8>.
- Eastman, S. J., Tousignant, J. D., Lukason, M. J., Chu, Q., Cheng, S. H., & Scheule, R. K. (1998). Aerosolization of cationic lipid: pDNA complexes—in vitro optimization of nebulizer parameters for human clinical studies. *Human gene therapy*, 9(1), 43-52.
- Gasulla F., Dorp K., Dombrink I., Zähringer U., Gisch N., Dörmann P. & Bartels D. (2013) The role of lipid metabolism in the acquisition of desiccation tolerance in *Craterostigma plantagineum*: a comparative approach. *The Plant Journal*, 75, 726-741. <https://doi.org/10.1111/tpj.12241>
- Gigon, A., Matos, A. R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y., & Pham-Thi, A. T. (2004). Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of botany*, 94(3), 345-351. <https://doi.org/10.1093/aob/mch150>.
- Gundaraniya, S. A., Ambalam, P. S., & Tomar, R. S. (2020). Metabolomic Profiling of Drought-Tolerant and Susceptible Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Genotypes in Response to Drought Stress. *ACS omega*, 5(48), 31209-31219. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.0c04601>.

- Hubac, C., Guerrier, D., Ferran, J., & Tremolieres, A. (1989). Change of leaf lipid composition during water stress in two genotypes of *Lupinus albus* resistant or susceptible to drought. *Plant physiology and biochemistry (Paris)*, 27(5), 737-744
- Jia, H., Wang, L., Li, J., Sun, P., Lu, M., & Hu, J. (2020). Comparative metabolomics analysis reveals different metabolic responses to drought in tolerant and susceptible poplar species. *Physiologia plantarum*, 168(3), 531-546.
- Kamthan, A., Kamthan, M., Chakraborty, N., Chakraborty, S., & Datta, A. (2012). A simple protocol for extraction, derivatization, and analysis of tomato leaf and fruit lipophilic metabolites using GC-MS. *Protocol Exchange, No-pp*.
- Kang, Z., Babar, M. A., Khan, N., Guo, J., Khan, J., Islam, S., ... & Shahi, D. (2019). Comparative metabolomic profiling in the roots and leaves in contrasting genotypes reveals complex mechanisms involved in post-anthesis drought tolerance in wheat. *PLoS One*, 14(3), e0213502.
- Kim, J. K., Bamba, T., Harada, K., Fukusaki, E., & Kobayashi, A. (2007). Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 415-424. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl216>.
- Li, P. C., Yang, X. Y., Wang, H. M., Ting, P. A. N., Yang, J. Y., Wang, Y. Y., ... & Xu, C. W. (2021). Metabolic responses to combined water deficit and salt stress in maize primary roots. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(1), 109-119. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63242-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63242-7).
- Lin, X., Wang, Q., Yin, P., Tang, L., Tan, Y., Li, H., ... & Xu, G. (2011). A method for handling metabonomics data from liquid chromatography/mass spectrometry: combinational use of support vector machine recursive feature elimination, genetic algorithm and random forest for feature selection. *Metabolomics*, 7(4), 549-558. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0274-7>.
- Liu, H., Yang, L., Xin, M., Ma, F., & Liu, J. (2019). Gene-wide analysis of aquaporin gene family in *Malus domestica* and heterologous expression of the gene MpPIP2; 1 confers drought and salinity tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3710.
- Liu, B., Wang, X., Li, K., & Cai, Z. (2021). Spatially resolved metabolomics and lipidomics reveal salinity and drought-tolerant mechanisms of cottonseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(28), 8028-8037. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01598>
- Majourhat, K., Jabbar, Y., Araneda, L., Zeinalabedini, M., Hafidi, A., & Martínez-Gómez, P. (2007). Karyotype characterization of *Argania spinosa* (L.) Skeel (Sapotaceae). *South African Journal of Botany*, 73(4), 661-663. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.06.007>.
- Mansour, M. M. F.; Salama, K. H. A.; Allam, H. Y. H. (2015). Role of the plasma membrane in saline conditions: lipids and proteins. *The Botanical Review* 81, 416–451. <https://doi.org/10.1007/s12229-015-9156->
- Marček, T., Hamow, K. Á., Végh, B., Janda, T., & Darko, E. (2019). Metabolic response to drought in six winter wheat genotypes. *PloS one*, 14(2), e0212411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212411>.
- Matos, M. C., Campos, P. S., Ramalho, J. C., Medeira, M. C., Maia, M. I., Semedo, J. M., ... & Matos, A. (2002). Photosynthetic activity and cellular integrity of the Andean legume *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi under heat and water stress. *Photosynthetica*, 40(4), 493-501. <https://doi.org/10.1023/A:1024331414564>.
- Michaletti, A., Naghavi, M. R., Toorchi, M., Zolla, L., & Rinalducci, S. (2018). Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Scientific reports*, 8(1), 1-18. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24012-y>.
- Mikami, K., & Murata, N. (2003). Membrane fluidity and the perception of environmental signals in cyanobacteria and plants. *Progress in lipid research*, 42(6), 527-543. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00036-5).

- Mohamed, H. I., & Latif, H. H. (2017). Improvement of drought tolerance of soybean plants by using methyl jasmonate. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3), 545-556. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0451-x>.
- Moradi, P., Mahdavi, A., Khoshkam, M., & Iriti, M. (2017). Lipidomics unravels the role of leaf lipids in thyme plant response to drought stress. *International journal of molecular sciences*, 18(10), 2067. <https://doi.org/10.3390/ijms18102067>.
- Msanda, F., El Aboudi, A., & Peltier, J. P. (2005). Biodiversité et biogéographie de l'arganeraie marocaine. *Cahiers Agricultures*, 14(4), 357-364.
- Narayanan, S., Tamura, P. J., Roth, M. R., Prasad, P. V., & Welti, R. (2016). Wheat leaf lipids during heat stress: I. High day and night temperatures result in major lipid alterations. *Plant, cell & environment*, 39(4), 787-803. <https://doi.org/10.1111/pce.12649>
- Nogués, S., & Baker, N. R. (2000). Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of experimental botany*, 51(348), 1309-1317. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.348.1309>.
- Olsson, M. (1995). Alterations in lipid composition, lipid peroxidation and anti-oxidative protection during senescence in drought stressed plants and non-drought stressed plants of *Pisum sativum*. *Plant physiology and biochemistry (Paris)*, 33(5), 547-553.
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., ... & Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic acids research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>.
- Petcu, E., Arsintescu, A., & Stanciu, D. (2001). The effect of drought stress on fatty acid composition in some Romanian sunflower hybrids. *Romanian Agricultural Research*, 15, 39-43.
- Quartacci, M. F., Pinzino, C., Sgherri, C. L., & Navari-Izzo, F. (1995). Lipid composition and protein dynamics in thylakoids of two wheat cultivars differently sensitive to drought. *Plant Physiology*, 108(1), 191-197. <https://doi.org/10.1104/pp.108.1.191>
- Qu, X., Wang, H., Chen, M., Liao, J., Yuan, J., & Niu, G. (2019). Drought stress-induced physiological and metabolic changes in leaves of two oil tea cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 144(6), 439-447. <https://doi.org/10.21273/JASHS04775-19>.
- Rachidi, F., Benhima, R., Kasmi, Y., Sbabou, L., & El Arroussi, H. (2021). Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches. *Scientific reports*, 11(1), 1-16.
- Radi N, 2003. L'arganier: Arbre du sud-ouest Marocain, en péril, à protéger. Thèse d'état, Université de Nantes, France
- Repo, T., Mononen, K., Alvilva, L., Pakkanen, T. T., & Hänninen, H. (2008). Cold acclimation of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) at its northernmost distribution range. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3), 59-70.
- Sánchez-Martín, J., Canales, F. J., Tweed, J. K., Lee, M. R., Rubiales, D., Gómez-Cadenas, A., ... & Prats, E. (2018). Fatty acid profile changes during gradual soil water depletion in oats suggests a role for jasmonates in coping with drought. *Frontiers in plant science*, 9, 1077. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01077>.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(2), 221-227. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>.
- Singh, P. K., Srivastava, D., Tiwari, P., Tiwari, M., Verma, G., & Chakrabarty, D. (2019). Drought tolerance in plants: molecular mechanism and regulation of signaling molecules. In *Plant Signaling Molecules* (pp. 105-123). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00006-X>.
- Sung, D. Y., Kaplan, F., Lee, K. J., & Guy, C. L. (2003). Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in plant science*, 8(4), 179-187. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00047-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00047-5)

- Sussulini, A. (Ed.). (2017). *Metabolomics: from fundamentals to clinical applications* (Vol. 965). Springer
- Svenningsson, H., & Liljenberg, C. (1986). Membrane lipid changes in root cells of rape (*Brassica napus*) as a function of water-deficit stress. *Physiologia Plantarum*, 68(1), 53-58.
- Tardieu, F., Simonneau, T., & Muller, B. (2018). The physiological basis of drought tolerance in crop plants: a scenario-dependent probabilistic approach. *Annual review of plant biology*, 69, 733-759. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040218>.
- Torres-Franklin, M. L., Gigon, A., De Melo, D. F., Zuily-Fodil, Y., & Pham-Thi, A. T. (2007). Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiologia plantarum*, 131(2), 201-210. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00943.x>
- Toumi, I., Gargouri, M., Nouairi, I., Moschou, P. N., Salem-Fnayou, A. B., Mliki, A., ... & Ghorbel, A. (2008). Water stress induced changes in the leaf lipid composition of four grapevine genotypes with different drought tolerance. *Biologia Plantarum*, 52(1), 161-164. <https://doi.org/10.1007/s10535-008-0035-2>.
- Tshabuse, F., Farrant, J. M., Humbert, L., Moura, D., Rainteau, D., Espinasse, C., ... & Ruelland, E. (2018). Glycerolipid analysis during desiccation and recovery of the resurrection plant *Xerophyta humilis* (Bak) Dur and Schinz. *Plant, cell & environment*, 41(3), 533-547. <https://doi.org/10.1111/pce.13063>
- Upchurch, R. G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology letters*, 30(6), 967-977. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9639-z>.
- Wang, X., Li, W., Li, M., & Welti, R. (2006). Profiling lipid changes in plant response to low temperatures. *Physiologia Plantarum*, 126(1), 90-96. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00622.x>
- Wang, X., Guo, R., Li, M., Liu, Y., Zhao, M., Fu, H., ... & Shi, L. (2019). Metabolomics reveals the drought-tolerance mechanism in wild soybean (*Glycine soja*). *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(9), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2939-1>.
- Williams, A. P., Allen, C. D., Macalady, A. K., Griffin, D., Woodhouse, C. A., Meko, D. M., ... & McDowell, N. G. (2013). Temperature as a potent driver of regional forest drought stress and tree mortality. *Nature climate change*, 3(3), 292-297. <https://doi.org/10.1038/nclimate1693>.
- Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H. E., ... & Wang, X. (2002). Profiling membrane lipids in plant stress responses: role of phospholipase D $\alpha$  in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31994-32002. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205375200>
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2010). MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. *Bioinformatics*, 26(18), 2342-2344. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq418>
- Xu, L., Han, L., & Huang, B. (2011). Membrane fatty acid composition and saturation levels associated with leaf dehydration tolerance and post-drought rehydration in Kentucky bluegrass. *Crop Science*, 51(1), 273-281. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.06.0368>.
- Zhang, M., Barg, R., Yin, M., Gueta-Dahan, Y., Leikin-Frenkel, A., Salts, Y., ... & Ben-Hayyim, G. (2005). Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct  $\omega$ -3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants. *The Plant Journal*, 44(3), 361-371. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02536.x>.
- Zhang, C., & Tian, S. (2010). Peach fruit acquired tolerance to low temperature stress by accumulation of linolenic acid and N-acylphosphatidylethanolamine in plasma membrane. *Food Chemistry*, 120(3), 864-872.
- Zhong, D., Du, H., Wang, Z., & Huang, B. (2011). Genotypic variation in fatty acid composition and unsaturation levels in bermudagrass associated with leaf dehydration tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136(1), 35-40. <https://doi.org/10.21273/JASHS.136.1.35>.

### III.4.9. Synthèse

Afin d'analyser le métabolome de feuilles de l'*Argania spinosa* L. lors de stress hydrique et de mettre en évidence les profils lipidomiques des quatre écotypes choisis, nous avons procédé à une analyse par GC-MS. Plus de 300 pics (écotype d'Admin), 400 pics (écotype de Rbai), 600 (écotype d'Aoulouz) et 700 pics (écotype de Lkhssas) ont été attribués manuellement pour chaque écotype. Au total, 229 métabolites ont été identifiés et quantifiés avec 126 retrouvés dans Lkhssas, 108 dans Rbai, 101 dans Aoulouz et 84 dans Admin. L'ensemble de ces métabolites sont regroupés en différentes classes de lipides avec une prédominance des acides gras et des lipides prénoï.

Une analyse en composante principale a été effectuée pour la totalité des métabolites afin d'obtenir une vue d'ensemble du jeu de données ainsi que de sa structuration générale. Le modèle ACP obtenu explique 50,6% de la variabilité totale du jeu de données (Figure 3a dans l'article). La première composante a indiqué 23,8% de la variance et le deuxième composante a indiqué 16,8%. Une claire séparation en fonction du stress et d'écotypes ont été mis en évidence, en particulier chez « Lks », « Rbi » et « Adn ». Ce résultat indique que le stress hydrique et les écotypes d'arganier ont un effet sur la variation des métabolites.

Sur l'ensemble des métabolites identifiés, seuls un sous ensemble de ceux identifiés à la fois dans les plantules témoins et stressés de chaque écotype à travers une analyse de Diagramme de Venn (Annexe 5) ont fait l'objet pour un deuxième Diagramme de Venn. Dans l'écotype Lkhssas, 36 identifiés comme étant communs entre les échantillons témoins et stressés et 90 étant uniques (26 pour le contrôle et 64 pour le cas stressé) (Annexe 5-A), tandis que l'écotype Rbai montre 41 composants communs chez les plantules contrastées et 67 uniques (20 pour le contrôle et 47 pour le cas stressé) (Annexe 5-B). Dans l'écotype Aoulouz, 57 métabolites ont été spécifiquement accumulés (23 pour le contrôle et 34 pour le cas stressé) et 44 sont communs entre le contrôle et le stressé (Annexe 5-C), alors que 30 métabolites ont été partagés entre les échantillons stressés et non stressés et 54 ont été exclusivement identifiés dans l'écotype Admin (42 pour le contrôle et 12 pour le stressé) (Annexe 5-D).

À la lumière des résultats précédents, 21 métabolites communs entre les quatre écotypes ont été choisis pour examiner leur accumulation en réponse au stress hydrique. En comparant les quatre écotypes sous stress hydrique et sur la base du score VIP ( $\geq 1$ ), du fold change ( $>1$ ) et de la p value ( $<0,05$ ), 6 métabolites ont été identifiés comme les plus significatifs dans les écotypes Aoulouz et Lakhssas. Cependant, seuls 3 métabolites sont accumulés de manière significative dans les deux écotypes Rbai et Admin (Annexe 6). En général, 5 métabolites ont

été positivement accumulés chez Aoulouz, tandis que chez Lkhssas, 4 métabolites ont montré une augmentation significative par rapport aux plantes témoins.

En conditions normales, l'acide linoléique (18: 3) était l'acide gras le plus abondant dans les quatre écotypes, allant de 25,4 à 47,2%, suivi de l'acide stéarique (18: 0) qui représentait 3,7 à 6,2% des acides gras totaux. Par ailleurs, il a été montré que l'acide linoléique, un acide gras insaturé, est un composant essentiel pour l'intégrité de la membrane et la fonctionnalité des protéines membranaires (Sánchez-Martín *et al.*, 2018).

Par rapport au contrôle, le stress hydrique provoque une altération dans la composition en acides gras. Tous les écotypes ont démontré une augmentation de l'acide linoléique insaturé avec 2.7, 8, 44.7 et 16.7 % dans Aoulouz, Rbai, Lkhssas et Admin, respectivement (Voir tableau 3 de l'article). Cette augmentation de la teneur en acides gras insaturé observée chez des feuilles d'arganier semble être un moyen efficace pour faire face au stress hydrique. Nos résultats sont en accord avec d'autres études, dans lesquelles la teneur relative en acide linoléique a augmenté en fonction de stress hydrique chez *Populus* (Jia *et al.*, 2020), *Thymus* (Moradi *et al.*, 2017) et *Arabidopsis* (Gigon *et al.*, 2004). Par contre, chez d'autres plantes, il a été constaté que le stress hydrique réduit considérablement la teneur en acide linoléique (Dakhma *et al.*, 1995 ; Matos *et al.*, 2002 ; Olsson, 1995).

L'accumulation des d'acides gras est l'un des mécanismes importants pour gérer le stress hydrique chez les espèces végétales (Qu *et al.*, 2019 ; Singh *et al.*, 2019). L'écotype Aoulouz avait la tendance à présenter une concentration d'acide palmitique (16: 0) significativement élevée sous l'action de stress hydrique. Cette élévation d'acide palmitique a été rapportée par certains auteurs (Sánchez-Martín *et al.*, 2018 ; Marček *et al.*, 2019 ; Jia *et al.*, 2020) chez diverses espèces. Par contre, d'autres études ont démontré une chute de la concentration en acide palmitique chez diverses espèces comme *Arachis hypogaea* L. et *Carthamus tinctorius* L. (Ashrafi *et al.*, 2010 ; Gundaraniya *et al.*, 2020).

Chez les plantules stressées, la concentration de l'acide margarique (17:0) a été augmentée significativement uniquement chez les deux écotypes Aoulouz et Lkhssas. Des résultats similaires ont été également observés chez le blé (Marček *et al.*, 2019). De même pour l'acide laurique (12:0), sa concentration varie significativement par le stress dans les écotypes Aoulouz et Admin. Quant à Lkhssas, la teneur en acide stéarique et en acide arachidique a été augmentée de manière significative comparativement aux plantules témoins. Gundaraniya et ses collègues ont signalé une augmentation de l'acide stéarique lorsque la plante d'arachide est soumise à un stress hydrique (Gundaraniya *et al.*, 2020).

L'analyse d'enrichissement des voies métaboliques chez les différents écotypes est présentée dans le tableau 2 (voir l'article). Différentes voies ont été significativement enrichies. Un total de 5, 4 et 2 voies ont été enrichies chez Admin, Aoulouz, Lkhssas, tandis que Rbai enrichis par une seule voie (Fig. 6a-d ; tableau 2 voir l'article).

Les métabolites tels que l'acide palmitique (C00249), l'acide stéarique (C01530), l'acide arachidique (C06425), l'acide linoléique (C01595) et l'acide alpha-linolénique (C06427) étaient significativement impliqués dans la voie de biosynthèse des acides gras insaturés (Fig. 7), principalement chez Lkhssas. De même, une étude antérieure sur le soja sauvage a révélé que les niveaux de métabolites d'acides gras insaturés augmentaient considérablement en cas de stress hydrique (Wang *et al.*, 2019). En plus de leur rôle de protecteur des composants de la membrane cellulaire, les acides gras insaturés pourraient également agir comme une substance osmotique qui protège les cellules vis-à-vis du stress.

Les métabolites impliqués dans la biosynthèse des acides gras ont été significativement accumulés, en particulier dans l'écotype Aoulouz. Le stress hydrique a une influence significative sur la teneur en acides gras dans la réponse des plantes à un tel stress.

Trois métabolites sont trouvés associés à cette voie : l'acide palmitique, l'acide laurique et l'acide margarique. Ces derniers sont en accord avec la littérature qui indique leur rôle important dans la tolérance au stress hydrique. Tandis que dans la voie métabolique de l'acide alpha-linolénique, l'acide linoléique a changé de manière significative dans l'écotype Lkhssas en réponse au stress hydrique.

Les analyses métabolomiques que nous avons conduites, nous ont permis de mettre en évidence les voies métabolomiques et les métabolites potentiellement accumulés lors de la réponse au déficit hydrique pour chacun des écotypes. Ainsi, il serait très intéressant par la suite d'intégrer ces analyses -omique (métabolomique) aux analyses génomiques.

*Conclusion Générale*  
*et*  
*Perspectives*

#### IV. Conclusion Générale et Perspectives

L'arganier, arbre endémique du Maroc, est une espèce agrosylvopastorale qui existe à l'état sauvage au Sud-Ouest du royaume. Il contribue à la préservation de l'écosystème et joue un rôle socio-économique considérable. L'arganier pousse de façon naturelle et en abondance dans les zones arides et semi-arides. Les contraintes environnementales principalement la sécheresse ont réduit d'une façon significative sa propagation naturelle provoquant ainsi la disparition des arbres les plus exposés ou les plus fragiles. Toutefois, l'arganier est reconnu par ses particularités physiologiques et biochimiques lui permettant de s'adapter à certains régimes climatiques caractérisés par une aridité plus ou moins accentuée dans son aire de répartition. Le but de ce travail est d'évaluer les réponses physiologiques et génomiques d'*Argania spinosa* L. face aux stress abiotiques en adoptant des approches originales (approche bio-informatique, génomique et métabolomique) afin de sélectionner des plants d'arganier tolérants aux stress hydrique et salin.

Dans un premier temps, avant que le draft du génome d'arganier soit disponible dans les banques de données, nous avons adopté une approche bio-informatique. En effet, nous avons développé des marqueurs SSR, dérivés particulièrement des gènes codants des protéines fonctionnelles, notamment ceux qui codent pour des aquaporines connues par leur implication dans la tolérance au stress hydrique chez plusieurs espèces de plantes. Un total de 1295 nouveaux marqueurs associés aux protéines d'aquaporines (SSR-AQPs) a été identifié avec une abondance des motifs tétra-nucléotidiques (36%). Sur l'ensemble des amorces développées (288 paires d'amorces) flanquants les motifs tetra-nucléotidiques, 15 couples d'amorces choisies dont 6 amorces ont été amplifiées positivement chez quatre espèces différentes y compris l'*Argania spinosa* L. Ces marqueurs géniques sont potentiellement considérés comme étant des marqueurs de réponse au stress hydrique et constituent une ressource pertinente pour l'étude de l'expression des gènes, ainsi que pour la caractérisation de la diversité, de l'évolution et de la cartographie des génomes.

Dans un second temps, suite au séquençage du draft du génome de l'arganier, nous avons suivi une approche originale, approche gènes candidats, afin d'approfondir nos connaissances sur les gènes pertinents et susceptibles d'être impliqués dans l'adaptation aux stress hydrique et salin chez *Argania spinosa* L. Le choix des familles de gènes s'est focalisé sur deux gènes candidats, les aquaporines et les antiporteurs NHXs impliqués respectivement dans la tolérance au stress hydrique et salin. L'annotation de ces gènes a pu être exploitée et a permis de mener des études de génomique structurale approfondies.

Un total de 23 séquences protéiques d'aquaporines (23 AsAQPs) prédites à l'échelle du génome d'arganier a été identifié. Phylogénétiquement, les AsAQPs sont regroupées en cinq sous-familles dont les AsPIPs avec 9 membres, les AsTIPs avec 7 membres, les AsNIPs incluent 5 membres et un seul membre retrouvé dans chacune des classes AsSIP et AsXIP. Structuralement, les protéines d'aquaporines sont composées de 212 aa (AsTIP1.3) à 311 aa (AsPIP2.7) et possèdent chacune deux domaines hautement conservés 'NPA'. Tous les membres AsPIP (à l'exception du AsPIP1.1) et les membres AsNIPs (sauf AsPIP1.1) possèdent 4 et 5 exons, respectivement. Tandis que les autres membres TIP, SIP et XIP possèdent une structure qui varie entre 2 et 4 exons. Aussi, l'analyse des résidus structuraux à savoir le filtre de sélectivité Ar/R et la position Forger's nous a permis de déduire les fonctions putatives et les spécificités des aquaporines chez *Argania spinosa* L. En comparaison avec des protéines homologues chez d'autres espèces, la caractérisation structurale a montré que les membres AQP chez l'arganier ne se limitent pas au transport de l'eau, mais sont également impliqués dans le transport de substrats non aquatiques, tel que le glycérol, le CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acide borique, acide salicylique, arsénite, NH<sub>3</sub> et l'urée. Pour mieux comprendre le mode de fonctionnement des protéines prédites (AsAQPs), des structures 3 dimensions prédites de ces protéines ont été construites. Toutes les structures ayant une forme conservée qui se rassemblent ont une forme de sablier ; Ceci explique leur rôle primordiale et leur participation dans le passage de l'eau et d'autre solutés et par conséquent leur implication dans la tolérance au stress hydrique.

Par ailleurs, nous avons prédit 4 séquences protéiques NHXs (AsNHX1, AsNHX2, AsNHX3 et AsNHX4). Elles appartiennent toutes à la même classe des protéines localisées au niveau vacuolaire, avec une longueur qui varie de 243 (AsNHX4) à 721 aa (AsNHX3). De plus, l'analyse des hélices transmembranaires a montré une variation dans leurs nombres allant de 5 à 11 hélices transmembranaires. En effet, ces hélices se caractérisent par la présence d'un site putatif de liaison à l'amiloride "FFIYLLPPI" hautement conservé jouant un rôle dans l'échange des cation/proton. Ceci suggère fortement une conservation fonctionnelle et donc la participation de ces gènes dans la réponse au stress salin.

Afin d'avoir une approche globale, il est très judicieux de valider la fonctionnalité de ces gènes dans un cadre de stress abiotique. En effet, l'analyse prédictive des séquences *in silico* à l'échelle génomique a permis également de concevoir 16 paires d'amorces spécifiques pour l'arganier: 9 amorces pour les AQPs, 4 pour les NHXs et trois gènes de ménages (AsACT, AsUBQ et AsTUB), qui vont servir comme marqueurs adéquats pour étudier leur expression.

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes de tolérance physiologiques et biochimiques chez des plantes de quatre écotypes contrastés d'arganier soumises à trois niveaux de stress hydrique (50%, 25% et 0% de la capacité au champ (CC)) pendant 45 jours. Nous avons étudié un certain nombre de paramètres liés au système oxydatif chez l'arganier. Les résultats obtenus ont montré qu'en condition de stress hydrique, les teneurs en proline et en sucres solubles ont significativement augmenté chez les plantules stressées (en particulier le niveau du stress hydrique sévère (0% CC)) comparativement aux témoins (100% CC). Cette élévation a été observée chez les trois écotypes Rbai, Aoulouz et Lkhssas. Le stress hydrique a induit également une augmentation significative de la composition phénolique chez les écotypes Rbai et Aoulouz. Par contre, une baisse de la teneur en chlorophylles et en caroténoïdes chez les quatre écotypes étudiés a été observée. Cette réduction du pigments chlorophylliens est considérée comme étant un symptôme typique de stress oxydatif, résultant d'une photo-oxydation des pigments, d'une dégradation et ou d'une synthèse déficiente de chlorophylle. D'une manière générale, les variations de l'ensemble des traits dépendent ainsi de l'intensité du stress hydrique appliqué et de la nature de l'écotype.

Enfin, dans un quatrième temps nous nous sommes intéressés à caractériser par approche métabolomique les variations du composés synthétisés chez quatre écotypes d'arganier dans le contexte du stress hydrique. Nous avons utilisé pour cette expérience le même matériel végétal précédemment décrit, mais cette fois-ci en se focalisant uniquement sur les deux niveaux extrêmes (100% et 0% CC). Le but était de comparer les variations du métabolome chez les écotypes étudiés entre une condition non stressée et une condition stressée. Des profils lipidiques ont ainsi été établis, ils montrent chacun une spécificité liée au stress appliqué. Nous avons pu identifier des métabolites différentiellement accumulés en réponse au stress hydrique, pour chacun de nos écotypes : un total de 126 métabolites pour Lkhssas, 101 pour Aoulouz, 107 pour Admin et 84 pour Rbai. L'ensemble des métabolites sont réparties en huit classes, dont les acides gras et les pré-nols lipides constituent les classes les plus majoritaires avec 19 et 26%, respectivement. Néanmoins, il nous semble intéressant de savoir quelles sont les molécules lipidiques synthétisées au stress hydrique et qui sont en commun entre chaque écotype et comment ces molécules sont-elles accumulées.

Les résultats de l'analyse multivariée montre que 21 métabolites sont en commun entre les écotypes étudiés et chaque écotype a accumulé des molécules lipidiques spécifiques. En effet, ces métabolites tels que les acides gras saturés (acide myristique (C14), pentadécanoïque (C15), acide palmitique (C16), acide margarique (C17) et acide laurique (C12), acide

myristique (C14)), acides gras insaturés (acide linoléique (C18 :2) et acide linoléique (C18 :3)) et l'acide gras à longue chaîne (acide stéarique (C18), acide arachidique (C20), acide béhénique (C22), acide tricosylique (C23), acide lignocérique (C24), acide cétorique (C26), acide carborique (C27), acide montanique (C28), acide mélissique (C30)) se sont différenciellement accumulés chez les quatre écotypes d'arganier. Les deux écotypes paralittoraux (Lkhssas et Aoulouz) accumulent plus de métabolites par rapport aux deux écotypes littoraux contrastés (Admin et Rbai) en condition de stress hydrique. Ceci suggère que les deux écotypes Lkhssas et Aoulouz sont dotés d'un système métabolique de défense très efficace face au stress abiotique. De plus, l'ensemble des molécules synthétisées sont considérées comme des signatures de stress potentiellement impliquées dans la tolérance de l'arganier aux stress abiotiques. Également, ils sont impliqués dans différentes voies de biosynthèse, principalement la voie d'élongation et la voie des acides gras désaturases, avec une particularité marquée chez l'écotype Lkhssas.

D'après ces résultats, il s'est révélé que l'écotype paralittoral (Lks) dispose d'un pouvoir adaptatif lui permettant de contrer le stress abiotique et par conséquent, il peut être considéré comme un écotype adéquat pour promouvoir l'arganiculture et la sauvegarde du potentiel d'adaptation naturelle d'arganier aux effets du réchauffement climatique.

En termes de perspectives, plusieurs pistes de recherche s'ouvrent. Il serait pertinent

- d'effectuer une analyse *in silico* des marqueurs SSRs à l'échelle du génome entier de l'arganier, afin de caractériser leurs spécificités et leurs potentielles implications dans des traits qualitatifs.
- de compléter l'étude de l'expression génomique des deux familles de gènes AQP et NHX moyennant une qRT-PCR chez les écotypes d'arganier, afin de comparer les profils d'expression et identifier les gènes différenciellement exprimés en condition stressante.
- d'étudier les mécanismes de régulation de ces gènes prédits en déchiffrant leurs régions promotrices afin d'élucider les voies de signalisation liées au stress hydrique et salin.
- d'étudier les familles de facteurs de transcription comme bZIP, NAC, MYB/MYC, WRKY.. car, en tant que régulateurs de l'expression de divers gènes de réponse, ils appartiennent à une signalisation cellulaire globale médiatrice de divers messages de stress et de développement.
- Réaliser une étude du métabolome de l'arganier non ciblée visant à identifier une large gamme de classes chimiques telles que les acides aminés, les acides organiques et les

composés phénoliques. Ceci permet ensuite d'ouvrir la voie vers la recherche d'autres marqueurs (candidats) intéressants impliqués dans la réponse au stress abiotique.

- Réaliser une étude du transcriptome (RNAseq) et du protéome (iTRAQ) de différents organes de l'arganier notamment les feuilles, les racines, les boutons floraux...permettra une vision globale sur l'expression différentielle de tous les gènes et leurs produits.
- Intégrer les approches -omiques serait un volet intéressant pour les études d'amélioration génétique de la tolérance des plantes aux stress abiotiques.

*Liste  
des références*

## Références

- Abascal, F., Irisarri, I., & Zardoya, R. (2014). Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(5), 1468-1481.
- Abdallah, M. B., Methenni, K., Nouairi, I., Zarrouk, M., & Youssef, N. B. (2017). Drought priming improves subsequent more severe drought in a drought-sensitive cultivar of olive cv. Chétoui. *Scientia horticultrae*, 221, 43-52.
- Abid, M., Ali, S., Qi, L.K., Zahoor, R., Tian, Z., Jiang, D., Snider, J.L., Dai, T., (2018). Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sci. Rep.* 8, 1–15.
- Ashrafi, E., & Razmjoo, K. (2010). Effect of irrigation regimes on oil content and composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(5), 499-506. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1527-8>.
- Adams, K.L.; Wendel, J.F. (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 8(2), 135-141.
- Adem, G. D., Roy, S. J., Zhou, M., Bowman, J. P., & Shabala, S. (2014). Evaluating contribution of ionic, osmotic and oxidative stress components towards salinity tolerance in barley. *BMC plant biology*, 14(1), 1-13.
- Ahanger, M. A., Agarwal, R. (2017). Salinity stress induced alterations in antioxidant metabolism and nitrogen assimilation in wheat (*Triticum aestivum* L) as influenced by potassium supplementation. *Plant Physiol. Biochem.* 115, 449–460.
- Ahanger, M. A., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., Alamri, S. A., Alam, P., Ashraf, M., et al. (2018). Potential of exogenously sourced kinetin in protecting *Solanum lycopersicum* from NaCl-induced oxidative stress through up-regulation of the antioxidant system, ascorbate-glutathione cycle and glyoxalase system. *PloS One* 13, e0202175.
- Ahmad, R., Hussain, S., Anjum, M.A., Khalid, M.F., Saqib, M., Zakir, I., Hassan, A., Fahad, S., Ahmad, S. (2019b). "Oxidative Stress and Antioxidant Defense Mechanisms in Plants Under Salt Stress," in *Plant Abiotic Stress Tolerance*. Springer), 191–205.
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.
- Ait Aabd N, El Ayadi F, Msanda F, El Mousadik A. (2010). Genetic variability of argan tree and preselection of the candidate plus trees *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 38:293-301
- Ait Aabd N, El Ayadi F, Msanda F, El mousadik A. (2011). Evaluation of agromorphological variability of argan tree under different environmental conditions in Morocco: implication for selection *International Journal of Biodiversity and Conservation* 3:73- 82
- Ait Aabd N, Msanda F, El Mousadik A (2012). Univariate and multivariate analysis of agronomical traits of preselected argan trees *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40:308-316
- Aithammou R, Harrouni C, Aboudlou L, Hallouti A, Mlouk M, Elsbahani A, Daoud S. (2019). Effect of clones, year of harvest and geographical origin of fruits on quality and chemical composition of Argan oil. *Food Chem* 297:124749.
- Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjövall-Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., ... & Kjellbom, P. (2005). Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant molecular biology*, 59(3), 469-484.
- Alexandersson, E., Danielson, J. Å., Råde, J., Moparthi, V. K., Fontes, M., Kjellbom, P., & Johanson, U. (2010). Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *The Plant Journal*, 61(4), 650-660.

- Ali MH, Imperiali B. (2005). Protein oligomerization: how and why. *Bioorg Med Chem* 13(17):5013–5020.
- Almeida-Rodriguez, A. M., Cooke, J. E., Yeh, F., & Zwiazek, J. J. (2010). Functional characterization of drought-responsive aquaporins in *Populus balsamifera* and *Populus simonii* × *balsamifera* clones with different drought resistance strategies. *Physiologia Plantarum*, 140(4), 321-333.
- Alter S, Bader KC, Spannagl M, Wang Y, Bauer E, Schön CC, Mayer KF (2015). DroughtDB: an expert-curated compilation of plant drought stress genes and their homologs in nine species. Database 2015:bav046
- An, R., Chen, Q.J., Chai, M.F., Lu, P.L., Su, Z., Qin, Z.X., Chen, J., Wang, X.C., (2007). AtNHX8, a member of the monovalent cation: proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li/H antiporter. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 49, 718-728.
- Anderberg, A. A., & Swenson, U. (2003). Evolutionary lineages in Sapotaceae (Ericales): a cladistic analysis based on ndh F sequence data. *International Journal of Plant Sciences*, 164(5), 763-773.
- Araújo, M., Ferreira de Oliveira, J. M. P., Santos, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., and Dias, M. C. (2019). Responses of olive plants exposed to different irrigation treatments in combination with heat shock: physiological and molecular mechanisms during exposure and recovery. *Planta* 249, 1583–1598.
- Ashrafi, E., & Razmjoo, K. (2010). Effect of irrigation regimes on oil content and composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(5), 499-506.
- Ayadi, M., Martins, V., Ben Ayed, R., Jbir, R., Feki, M., Mzid, R., ... & Hanana, M. (2020). Genome wide identification, molecular characterization, and gene expression analyses of grapevine NHX antiporters suggest their involvement in growth, ripening, seed dormancy, and stress response. *Biochemical Genetics*, 58(1), 102-128.
- Babaei, K., Moghaddam, M., Farhadi, N., & Pirbalouti, A. G. (2021). Morphological, physiological and phytochemical responses of Mexican marigold (*Tagetes minuta* L.) to drought stress. *Scientia Horticulturae*, 284, 110116.
- Bagati, S., Mahajan, R., Nazir, M., Dar, A. A., & Zargar, S. M. (2018). “Omics”: A gateway towards abiotic stress tolerance. In *Abiotic stress-mediated sensing and signaling in plants: An omics perspective* (pp. 1-45). *Springer, Singapore*.
- Baiges, I., Schäffner, A. R., Affenzeller, M. J., & Mas, A. (2002). Plant aquaporins. *Physiologia Plantarum*, 115(2), 175-182.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., ... & Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*, 37(suppl\_2), W202-W208
- Bani-Aameur, F. (2000). Phenological phases of *Argania spinosa* (L. Skeels) flower. *Forest Genetics*, 7(4), 329-334.
- Bani-Aameur F. (2004). Morphological diversity of argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) populations in Morocco. *Forest Genetics* 11:311-316
- Bani-Aameur F, Ferradous A. (2001). Fruits and stone variability in three argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) populations. *Forest Genetics* 8:39-43
- Bani-Aameur F, Ferradous A, Dupuis P (1999) Typology of fruits and stones of *Argania spinosa* (Sapotaceae). *Forest Genetics* 6:213-219
- Bansal A, Sankararamkrishnan R. (2007). Homology modeling of major intrinsic proteins in rice, maize and *Arabidopsis*: comparative of the selectivity filters. *BMC Struct Biol* 7:27–44

- Bassil, E., Coku, A., & Blumwald, E. (2012). Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in plant growth and development. *Journal of experimental botany*, 63(16), 5727-5740.
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of experimental botany*, 65(5), 1229-1240.
- Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., & Bhattarai, T. (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of biosciences*, 32(3), 501-510.
- Ben Ahmed C, Ben Rouina B, Sensoy S, Boukhris M, Ben Abdallah F (2009). Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environmental and Experimental Botany* 67:345-
- Benabid, A. (2000). Flore et écosystèmes du Maroc. Évaluation et préservation de la biodiversité. *Ibis Presse*, Paris.
- Benga, G. (2009). Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future. *IUBMB life*, 61(2), 112-133.
- Bhargava, S., & Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant breeding*, 132(1), 21-32.
- Bienert, G. P., Heinen, R. B., Berny, M. C., & Chaumont, F. (2014). Maize plasma membrane aquaporin ZmPIP2; 5, but not ZmPIP1; 2, facilitates transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(1), 216-222.
- Bogeat-Triboulot MB, Brosche M, Renaut J et al (2007). Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, eco physiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiol* 143:876–892
- Borkotoky, S., Saravanan, V., Jaiswal, A., Das, B., Selvaraj, S., Murali, A., & Lakshmi, P. T. V. (2013). The Arabidopsis stress responsive gene database. *International journal of plant genomics*, 2013.
- Borrelli, G. M., Fragasso, M., Nigro, F., Platani, C., Papa, R., Beleggia, R., & Trono, D. (2018). Analysis of metabolic and mineral changes in response to salt stress in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum) genotypes, which differ in salinity tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 133, 57-70.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D.T., Sorieul, M., van den Dries, N., Maurel, C., (2005). Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol.* 139, 790805.
- Bouzoubaâ, Z., & El Mousadik, A. (2003). Temperature, drought and salt effect on *Argania spinosa* (L.) Skeels seed germination. *Acta Botanica Gallica* (France).
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bray EA. (2001). Plant response to water-deficit stress. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*.
- Bray, E. (2007). Plant response to water deficit stress. In *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA; Volume 1, pp. 1–7.
- Brett, C. L., Donowitz, M., & Rao, R. (2005). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288(2), C223-C239.
- Callahan, G., Zhu, X., & Thomas, R. H. (2022). Callahan, G., Zhu, X., & Thomas, R. H. (2022). Current Perspective Concerning the Potential Value of Chloroplast Lipidome in Assessing Moss Response to Abiotic Stress During Boreal Forest Regeneration. *Frontiers in Forests and Global Change*, 5.

- Caverzan, A., Casassola, A., & Brammer, S. P. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. *Abiotic and biotic stress in plants—recent advances and future perspectives*, 17, 463-480.
- Chaeikar, S. S., Marzvan, S., Khiavi, S. J., & Rahimi, M. (2020). Changes in growth, biochemical, and chemical characteristics and alteration of the antioxidant defense system in the leaves of tea clones (*Camellia sinensis* L.) under drought stress. *Scientia Horticulturae*, 265, 109257.
- Chakhchar A (2015). Mécanismes physiologiques et biochimiques de la tolérance de l'arganier au stress hydrique [Physiological and biochemical mechanisms of the tolerance of the argan tree to water stress]. PhD thesis, Faculty of Science and Technology Marrakesh, Cadi Ayyad University, Morocco.
- Chakhchar A, Wahbi S, Lamaoui M, Ferradous A, El Mousadik A, Ibsouda-Koraichi S, Filali-Maltouf A, El Modafar C (2015). Physiological and biochemical traits of drought tolerance in *Argania spinosa*. *Journal of Plant Interactions* 10:252-261
- Chakhchar, A., Lamaoui, M., Aissam, S., Ferradous, A., Wahbi, S., El Mousadik, A., ... & El Modafar, C. (2018). Using chlorophyll fluorescence, photosynthetic enzymes and pigment composition to discriminate drought-tolerant ecotypes of *Argania spinosa*. *Plant Biosystems—An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 152(3), 356-367.
- Chanroj, S., Wang, G., Venema, K., Zhang, M. W., Delwiche, C. F., & Sze, H. (2012). Conserved and diversified gene families of monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporters from algae to flowering plants. *Frontiers in plant science*, 3, 25.
- Choudhury, S., Sharma, P., Moulick, D., & Mazumder, M. K. (2021). Unrevealing metabolomics for abiotic stress adaptation and tolerance in plants. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 24(5), 479-493.
- Chaumont, F., Moshelion, M., & Daniels, M. J. (2005). Regulation of plant aquaporin activity. *Biology of the Cell*, 97(10), 749-764
- Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R., & Chrispeels, M. J. (2000). Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiology*, 122(4), 1025-1034.
- Chaumont, F., Tyerman, S.D., (2014). Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiol.* 164, 1600–1618.
- Chaves, M. M., Flexas, J., and Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103, 551–560.
- Chawla K, Barah P, Kuiper M, Bones AM. (2011). Systems biology: a promising tool to study abiotic stress responses. *Omics Plant Abiotic Stress Tolerance* 163–172
- Chen S, Jiang J, Li H, Liu G. (2012). The salt-responsive transcriptome of *Populus simonii* × *Populus nigra* via DGE. *Gene* 504:203–212
- Chen, T., & Zhang, B. (2016). Measurements of proline and malondialdehyde content and antioxidant enzyme activities in leaves of drought stressed cotton. *Bio-protocol*, 6(17), e1913-e1913.
- Chen, H., & Jiang, J. G. (2010). Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews*, 18(NA), 309-319.
- Cheong, J. J., and Choi, Y. D. (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet.* 19, 409–413.
- Christensen, C. A., & Feldmann, K. A. (2007). Biotechnology Approaches To Engineering Drought Tolerant Crop. In *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops* (pp. 333-357). *Springer Netherlands*.
- Ciarmiello, L. F., Woodrow, P., Fuggi, A., Pontecorvo, G., & Carillo, P. (2011). Plant genes for abiotic stress. *Abiotic Stress in Plants—Mechanisms and Adaptations*, 283-308.

- Comas, L. H., Becker, S. R., Cruz, V. M. V., Byrne, P. F., and Dierig, D. A. (2013). Root traits contributing to plant productivity under drought. *Front. Plant Sci.* 4:442.
- Côme, D., & Corbineau, F. (1998). Semences et germination. Proc. Physiologie végétale II: Croissance et développement, ed. *Hermann and P. Mazliak*, 185-313.
- Cramer, G.R. Sodium–calcium interactions under salinity stress. In *Salinity: Environment–Plants–Molecules*; Läuchli, A., Lüttge, U., Eds.; Kluwer: Dordrecht, The Netherlands, 2002; pp. 205–227.
- Dai A. (2012). Drought under global warming: a review. *Wires Clim Chg*; 2:45–65.
- Dakhma, W. S., Zarrouk, M., & Cherif, A. (1995). Effects of drought-stress on lipids in rape leaves. *Phytochemistry*, 40(5), 1383-1386.
- Danielson, J. Å., & Johanson, U. (2008). Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC plant biology*, 8(1), 1-15.
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., & Schroeder, J. I. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in plant science*, 19(6), 371-379.
- Deshmukh, R., Sonah, H., Patil, G., Chen, W., Prince, S., Mutava, R., ... & Nguyen, H. T. (2014). Integrating omic approaches for abiotic stress tolerance in soybean. *Frontiers in Plant science*, 5, 244.
- Deshmukh, R. K., Nguyen, H. T., & Belanger, R. R. (2017). Aquaporins: dynamic role and regulation. *Frontiers in plant science*, 8, 1420.
- Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Agati, G., and Tattini, M. (2014). Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environ. Exp. Bot.* 103, 107–116.
- Dong, J., Liu, C., Wang, Y., Zhao, Y., Ge, D., & Yuan, Z. (2021). Genome-wide identification of the NHX gene family in *Punica granatum* L. and their expressional patterns under salt stress. *Agronomy*, 11(2), 264.
- Du, Q., Gong, C., Pan, W., Zhang, D., (2013). Development and application of microsatellites in candidate genes related to wood properties in the Chinese white poplar (*Populus tomentosa* Carr.). *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 20, 31-44.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Duque, A. S., de Almeida, A. M., da Silva, A. B., da Silva, J. M., Farinha, A. P., Santos, D., ... & de Sousa Araújo, S. (2013). Abiotic stress responses in plants: unraveling the complexity of genes and networks to survive. *Abiotic stress-plant responses and applications in agriculture*, 49-101.
- El Aboudi, A., G. Carlier, and J. P. Peltier. "Régime hydrique de l'arganier (*Argania spinosa* (L) Skeels) dans le Souss (Maroc)." *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides* (1991): 389-403.
- El Mousadik, A., & Petit, R. J. (1996). Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. *Molecular Ecology*, 5(4), 547-555.
- El Yamani, M., Sakar, E.H., Boussakouran, A., Rharrabti, Y., (2019). Physiological and biochemical responses of young olive trees (*Olea europaea* L.) to water stress during flowering. *Archives of Biological Sciences* 71 (1), 123–132.
- El-Metwally S, Ouda OM, Helmy M. (2014a). First- and next-generations sequencing methods. *Next Gener Seq Technol Challenges Seq Assem*.
- El-Metwally S, Ouda OM, Helmy M (2014b) Novel next-generation sequencing applications. *Next Gener Seq Technol Challenges Seq Assem*.

- Eyidogan, F., Oz, M. T., Yucel, M., & Oktem, H. A. (2012). Signal transduction of phytohormones under abiotic stresses. In *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants* (pp. 1-48). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Fàbregas, N., and Fernie, A. R. (2019). The metabolic response to drought. *J. Exp. Bot.* 70, 1077–1085.
- Fahad, S., and Bano, A. (2012). Effect of salicylic acid on physiological and biochemical characterization of maize grown in saline area. *Pak. J. Bot.* 44, 1433–1438
- Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F. A., Khaliq, A., Saud, S., ... & Huang, J. (2015). Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant growth regulation*, 75(2), 391-404.
- Faize, M., Fumanal, B., Luque, F., Ramírez-Tejero, J. A., Zou, Z., Qiao, X., ... & Venisse, J. S. (2020). Genome Wild Analysis and Molecular Understanding of the Aquaporin Diversity in Olive Trees (*Olea Europaea* L.). *International journal of molecular sciences*, 21(11), 4183.
- Fang, Y.; Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 673–689.
- Fang, Y., Du, Y., Wang, J., Wu, A., Qiao, S., Xu, B., ... & Chen, Y. (2017). Moderate drought stress affected root growth and grain yield in old, modern and newly released cultivars of winter wheat. *Frontiers in Plant Science*, 8, 672.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. S. M. A., Fujita, D. B. S. M. A., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In *Sustainable agriculture* (pp. 153-188). Springer, Dordrecht.
- Fathi, A., & Tari, D. B. (2016). Effect of drought stress and its mechanism in plants. *International Journal of Life Sciences*, 10(1), 1-6.
- Ferradous A, Bani-Aameur F, Dupuis P. (1996). Climat stationnel, phénologie et fructification de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* 17:51-60
- Ferradous A, Bani-Aameur F, Dupuis P. (1997). Diversité génétique du fruit et de la graine de l'arganier. In: Birouk A, Rejdali M (eds) Ressources phytogénétiques et le développement durable, Rabat, Maroc, *Actes Éditions*, pp 319-324
- Fleurat-Lessard, P., Michonneau, P., Maeshima, M., Drevon, J. J., & Serraj, R. (2005). The distribution of aquaporin subtypes (PIP1, PIP2 and  $\gamma$ -TIP) is tissue dependent in soybean (*Glycine max*) root nodules. *Annals of Botany*, 96(3), 457-460.
- Foyer, C. H. (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environ. Exp. Bot.* 154, 134–142.
- Fraire-Velázquez, S., and Balderas-Hernández, V. E. (2013). “Abiotic stress in plants and metabolic responses” in *Abiotic stress-plant responses and applications in agriculture*. eds. K. Vahdati and C. Leslie (New York: InTech Open Science), 25–48.
- Galmes J, Pou A, Alsina MM, Tomas M, Medrano H, Flexas J. (2007). Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status. *Planta*.226:671–81.
- Gambino G, Gribaudo I. (2012). Genetic transformation of fruit trees: current status and remaining challenges. *Transgenic Res* 21:1163–1181
- Gao, L.; Lu, Z.; Ding, L.; Guo, J.; Wang, M.; Ling, N.; Guo, S.; Shen, Q. (2018). Role of aquaporins in determining carbon and nitrogen status in higher plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 35.
- Gargallo-Garriga, A., Sardans, J., Pérez-Trujillo, M., Oravec, M., Urban, O., Jentsch, A., ... & Peñuelas, J. (2015). Warming differentially influences the effects of drought on stoichiometry and metabolomics in shoots and roots. *New Phytologist*, 207(3), 591-603

- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J. F., & Dommes, J. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant growth regulation*, 37(3), 263-285.
- Gigon, A., Matos, A. R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y., & Pham-Thi, A. T. (2004). Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of botany*, 94(3), 345-351.
- Gill, S. S., and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., and Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Front. Plant Sci.* 5:151.
- Gong, Y.M., Xu, S.C., Mao, W.H., Hu, Q.Z., Zhang, G.W., Ding, J., Li, Y.D., (2010). Developing new SSR markers from ESTs of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Zhejiang University. Science. B* 11, 702-707.
- Gong, Y.-m., Xu, S.-c., Mao, W.-h., Li, Z.-y., Hu, Q.-z., Zhang, G.-w., Ding, J., (2011). Genetic Diversity Analysis of Faba Bean (*Vicia faba* L.) Based on EST-SSR Markers. *Agricultural Sciences in China* 10, 838-844.
- Gorin, M. B., Yancey, S. B., Cline, J., Revel, J. P., & Horwitz, J. (1984). The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell*, 39(1), 49-59.
- Govaerts, R., Frodin, D. G., & Pennington, T. D. (2001). World checklist and bibliography of Sapotaceae. *Royal Botanic Gardens*.
- Govind, G., Vokkaliga Thamme Gowda, H., Jayaker Kalaiarasi, P., Iyer, D. R., Muthappa, S. K., Nese, S., & Makarla, U. K. (2009). Identification and functional validation of a unique set of drought induced genes preferentially expressed in response to gradual water stress in peanut. *Molecular Genetics and Genomics*, 281(6), 591-605.
- Gregory, P. J., Ismail, S., Razaq, I. B., Wahbi, A. (2018). Soil salinity: current status and in depth analyses for sustainable use. Chapter 2 (No. IAEA-TECDOC--1841).
- Grieu, P., Maury, P., Debaeke, P. P., & Sarrafi, A. (2008). Améliorer la tolérance à la sécheresse du tournesol: apports de l'écophysiologie et de la génétique. *Innovations Agronomiques*, (2), 37-51.
- Grieve, S. (1917). Note on *Argania sideroxydon*, Roem. et Schult., the argan tree of Morocco. In *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh* (Vol. 26, No. 1-4, pp. 88-91). Taylor & Francis Group.
- Groszmann, M., Osborn, H.L., Evans, J.R., (2017). Carbon dioxide and water transport through plant aquaporins. *Plant Cell Environ.* 40, 938–961.
- Guerrero-Sánchez, V. M., Castillejo, M. Á., López-Hidalgo, C., Alconada, A. M. M., Jorrín-Novo, J. V., & Rey, M. D. (2021). Changes in the transcript and protein profiles of *Quercus ilex* seedlings in response to drought stress. *Journal of Proteomics*, 243, 104263.
- Gundaraniya, S. A., Ambalam, P. S., & Tomar, R. S. (2020). Metabolomic profiling of drought-tolerant and susceptible peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes in response to drought stress. *ACS omega*, 5(48), 31209-31219.
- Guo, X., Xin, Z., Yang, T., Ma, X., Zhang, Y., Wang, Z., ... & Lin, T. (2020). Metabolomics response for drought stress tolerance in chinese wheat genotypes (*Triticum aestivum*). *Plants*, 9(4), 520.
- Gupta, A. B., & Sankararamkrishnan, R. (2009). Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC plant biology*, 9(1), 1-28.
- Hachez, C., & Chaumont, F. (2010). Aquaporins: a family of highly regulated multifunctional channels. MIPs and their Role in the Exchange of Metalloids, 1-17.

- Hakeem, K. R., Chandna, R., Ahmad, P., Iqbal, M., & Ozturk, M. (2012). Relevance of proteomic investigations in plant abiotic stress physiology. *Omics: a journal of integrative biology*, 16(11), 621-635.
- Hanana, M., Hamrouni, L., Cagnac, O., Blumwald, E., (2011). Mécanismes et stratégies cellulaires de tolérance à la salinité (NaCl) chez les plantes. *Environmental Reviews* 19, 121-140.
- Hanba, Y. T., Shibasaka, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Kasamo, K., Terashima, I., & Katsuhara, M. (2004). Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2; 1 increases internal CO<sub>2</sub> conductance and CO<sub>2</sub> assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant and Cell Physiology*, 45(5), 521-529
- Harfouche, A., Meilan, R., & Altman, A. (2014). Molecular and physiological responses to abiotic stress in forest trees and their relevance to tree improvement. *Tree physiology*, 34(11), 1181-1198.
- Harkewicz, R.; Dennis, E.A. (2011). Applications of mass spectrometry to lipids and membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 301–325
- HCEFLCD (2017). Le Maroc, une biodiversité riche d'une quarantaine d'écosystèmes. Retrieved from : Map Ecology website: <http://mapecology.ma/actualites/maroc-biodiversite-riche-dune-quarantaine-decosystemes-hceflcd/>
- Heckwolf, M., Pater, D., Hanson, D. T., & Kaldenhoff, R. (2011). The Arabidopsis thaliana aquaporin AtPIP1; 2 is a physiologically relevant CO<sub>2</sub> transport facilitator. *The Plant Journal*, 67(5), 795-804.
- Helmy M, Sugiyama N, Tomita M, Ishihama Y. (2012). Mass spectrum sequential subtraction speeds up searching large peptide MS/MS spectra datasets against large nucleotide databases for proteogenomics. *Cell Mech* 17:633–644.
- Hessini K, Martínez JP, Gandour M, Albouchi A, Soltani A, Abdely C. (2009). Effect of water stress on growth, osmotic adjustment, cell wall elasticity and water-use efficiency in *Spartina alterniflora*. *Environmental and Experimental Botany* 67:312-319
- Hima Kumari, P., Anil Kumar, S., Ramesh, K., Sudhakar Reddy, P., Nagaraju, M., Bhanu Prakash, A., ... & Kavi Kishor, P. B. (2018). Genome-wide identification and analysis of Arabidopsis sodium proton antiporter (NHX) and human sodium proton exchanger (NHE) homologs in sorghum bicolor. *Genes*, 9(5), 236.
- Hirt, H., & Shinozaki, K. (2003). *Plant responses to abiotic stress*(Vol. 4). Springer Science & Business Media.
- Hoai, P. T., Tyerman, S. D., Schnell, N., Tucker, M., McGaughey, S. A., Qiu, J., ... & Byrt, C. S. (2020). Deciphering aquaporin regulation and roles in seed biology. *Journal of experimental botany*, 71(6), 1763-1773.
- Hove, R.M., Bhave, M., (2011). Plant aquaporins with non-aqua functions: deciphering the signature sequences. *Plant Mol. Biol.* 75, 413–430.
- Hu, J.-b., Zhou, X.-y., Li, J.-w., 2010. Development of novel EST-SSR markers for cucumber (*Cucumis sativus*) and their transferability to related species. *Scientia Horticulturae* 125, 534-538.
- Ibrahimova, U., Kumari, P., Yadav, S., Rastogi, A., Antala, M., Suleymanova, Z., ... & Brestic, M. (2021). Progress in understanding salt stress response in plants using biotechnological tools. *Journal of Biotechnology*, 329, 180-191
- Intergovernmental Panel on Climate Change. (2018). Summary for policymakers. In: Masson-Delmotte V, Zhai P, Pörtner H-O, et al., eds. Global warming of 1.5 °C. An IPCC special report on the impacts of global warming of 1.5 °C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty. Geneva, Switzerland: World Meteorological Organization, 32.

- IFN. (2005). Inventaire Forestier National. Haut Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification.
- IPCC. (2007). Climate change 2007. The physical science basis. contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, NY
- Iqbal, N., Umar, S., Khan, N. A., and Khan, M. I. R. (2014). A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. *Environ. Exp. Bot.* 100, 34–42.
- Isayenkov, S. V., Dabravolski, S. A., Pan, T., & Shabala, S. (2020). Phylogenetic diversity and physiological roles of plant monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporters. *Frontiers in Plant Science*, 11, 573564.
- Ishikawa, F., Suga, S., Uemura, T., Sato, M. H., & Maeshima, M. (2005). Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 579(25), 5814–5820.
- Jafarnia S, Akbarinia M, Hosseinpour B, Modarres Sanavi SA, Salami SA. (2018). Effect of drought stress on some growth, morphological, physiological, and biochemical parameters of two different populations of *Quercus brantii*. *IForest* 11:212-220
- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Somasundaram R, Panneerselvam R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol*, 11(1), 100-105.
- Jang, J. Y., Kim, D. G., Kim, Y. O., Kim, J. S., & Kang, H. (2004). An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 54(5), 713-725.
- Javot, H., & Maurel, C. (2002). The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany*, 90(3), 301-313.
- Jia, H., Wang, L., Li, J., Sun, P., Lu, M., & Hu, J. (2020). Comparative metabolomics analysis reveals different metabolic responses to drought in tolerant and susceptible poplar species. *Physiologia plantarum*, 168(3), 531-546.
- Jogaiah S, Govind SR, Tran L-SP (2013). Systems biology-based approaches toward understanding drought tolerance in food crops. *Crit Rev Biotechnol* 33:23–39.
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C., & Kjellbom, P. (2000). The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1-2), 324-342
- Johnson, K. D., Höfte, H., & Chrispeels, M. J. (1990). An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GIpF). *The Plant Cell*, 2(6), 525-532.
- Jorge, T. F., and António, C. (2018). “Plant metabolomics in a changing world: metabolite responses to abiotic stress combinations” in *Plant, abiotic stress and responses to climate change*. ed. V. Andjelkovic (New York: InTech Open Science), 111–132
- Jumali, S. S., Said, I. M., Ismail, I., and Zainal, Z. (2011). Genes induced by high concentration of salicylic acid in *Mitragyna speciosa*. *Aust. J. Crop Sci.* 5, 296–303.
- Kaldenhoff, R., & Fischer, M. J. A. P. (2006a). Aquaporins in plants. *Acta Physiologica*, 187(1-2), 169-176.
- Kaldenhoff, R.; Fischer, M. (2006b). Functional aquaporin diversity in plants. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1758, 1134- 1141.
- Kao, C. H. (2015). Mechanisms of salt tolerance in rice plants: compatible solutes and aquaporins. *Crop Environ. Bioinform.* 12, 73–82.
- Kapilan, R., Vaziri, M., & Zwiasek, J. J. (2018). Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological research*, 51(1), 1-11.

- Karan, R., & Subudhi, P. K. (2012). Approaches to increasing salt tolerance in crop plants. In *Abiotic stress responses in plants* (pp. 63-88). Springer, New York, NY.
- Kaya, M. D., Okçu, G., Atak, M., Cıkılı, Y., & Kolsarıcı, Ö. (2006). Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European journal of agronomy*, 24(4), 291-295.
- Kechairi, R., & Abdoun, F. (2016). État des lieux cartographiques de l'arganier *Argania spinosa* (L.) Skeels (Sapotaceae) en Afrique Nord-Occidentale (Algérie et Sahara Occidental). *International Journal of Environmental Studies*, 73(2), 286-293.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845-858.
- Keyvan S. (2010). The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbo- hydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. *J Anim Plant Sci*:1051–60
- Khallouki, F., Voggel, J., Breuer, A., Klika, K. D., Ulrich, C. M., & Owen, R. W. (2017). Comparison of the major polyphenols in mature Argan fruits from two regions of Morocco. *Food chemistry*, 221, 1034-1040.
- Khare, T., Kumar, V., & Kishor, P. B. (2015). Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions show additive effects under NaCl stress on induction of oxidative stress and the responsive antioxidative defense in rice. *Protoplasma*, 252(4), 1149-1165.
- Khayy, S., Azza, N. E., Gaboun, F., Pirro, S., Badad, O., Claros, M. G., ... & Ghazal, H. (2018). First draft genome assembly of the Argane tree (*Argania spinosa*). *F1000Research*, 7
- Kheradmand, M. A., Fahraji, S. S., Fatahi, E., & Raoofi, M. M. (2014). Effect of water stress on oil yield and some characteristics of *Brassica napus*. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 8(9), 1447-1453.
- Kim JK, Bamba T, Harada K, Fukusaki E, Kobayashi A. (2007). Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. *J Exp Bot* 58: 415–424
- Komatsu S, Kamal AHM, Hossain Z. (2014). Wheat proteomics: proteome modulation and abiotic stress acclimation. *Front Plant Sci* 5:684.
- Kranner I, Minibayeva F V, Beckett RP, Seal CE. (2010). What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol* 188:655–673.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, 305(3), 567-580.
- Kruse, E., Uehlein, N., & Kaldenhoff, R. (2006). The aquaporins. *Genome biology*, 7(2), 1-6.
- Hima Kumari, P., Anil Kumar, S., Ramesh, K., Sudhakar Reddy, P., Nagaraju, M., Bhanu Prakash, A., ... & Kavi Kishor, P. B. (2018). Genome-wide identification and analysis of *Arabidopsis* sodium proton antiporter (NHX) and human sodium proton exchanger (NHE) homologs in sorghum bicolor. *Genes*, 9(5), 236.
- Laaribya, S., Alaoui, A., & Gmira, N. (2017). The Moroccan forest and sustainable development case of the argan tree *Argania spinosa* L. Skeels in Morocco. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 10(2), 1-7.
- Laloux, T., Junqueira, B., Maistriaux, L. C., Ahmed, J., Jurkiewicz, A., & Chaumont, F. (2018). Plant and mammal aquaporins: same but different. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 521
- Lambers, H., & Oliveira, R. S. (2019). Plant water relations. In *Plant physiological ecology* (pp. 187-263). Springer, Cham
- Leisner, C. P., Yendrek, C. R., & Ainsworth, E. A. (2017). Physiological and transcriptomic responses in the seed coat of field-grown soybean (*Glycine max* L. Merr.) to abiotic stress. *BMC plant biology*, 17(1), 1-11

- Li, G., Santoni, V., Maurel, C., (2014). Plantes Aquaporines: Rôles de la physiologie des plantes. *Biochim. Biophys. ACTA* 1840, 1574-1582.
- Li, J., Ban, L., Wen, H., Wang, Z., Dzyubenko, N., Chapurin, V., ... & Wang, X. (2015). An aquaporin protein is associated with drought stress tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 459(2), 208-213.
- Li, N., Wang, X., Ma, B., Du, C., Zheng, L., & Wang, Y. (2017a). Expression of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter RtNHX1 from a recretohalophyte *Reaumuria trigyna* improved salt tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology*, 218, 109-120.
- Li, P., Cao, W., Fang, H., Xu, S., Yin, S., Zhang, Y., ... & Yang, Z. (2017b). Transcriptomic profiling of the maize (*Zea mays* L.) leaf response to abiotic stresses at the seedling stage. *Frontiers in plant science*, 8, 290
- Li, W., Zhang, D., Zhu, G., Mi, X., & Guo, W. (2019). Combining genome-wide and transcriptome-wide analyses reveal the evolutionary conservation and functional diversity of aquaporins in cotton. *BMC genomics*, 20(1), 1-17.
- Li, P. C., Yang, X. Y., Wang, H. M., Ting, P. A. N., Yang, J. Y., Wang, Y. Y., ... & Xu, C. W. (2021). Metabolic responses to combined water deficit and salt stress in maize primary roots. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(1), 109-119.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, 148, 350-382
- Lichtenthaler HK. (1996). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J Plant Physiol* 148:4–14.
- Lisar, S. Y., Motafakkerazad, R., Hossain, M. M., & Rahman, I. M. (2012). Causes, effects and responses. *Water stress*, 25(1), 33.
- Liu, G., Zenda, T., Liu, S., Wang, X., Jin, H., Dong, A., ... & Duan, H. (2020). Comparative transcriptomic and physiological analyses of contrasting hybrid cultivars ND476 and ZX978 identify important differentially expressed genes and pathways regulating drought stress tolerance in maize. *Genes & Genomics*, 42(8), 937-955.
- Liu, H. U. A., Wang, Q., Yu, M., Zhang, Y., Wu, Y., & Zhang, H. (2008). Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene, AtNHX3, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots. *Plant, Cell & Environment*, 31(9), 1325-1334.
- Liu, W., Zheng, L., & Qi, D. (2020). Variation in leaf traits at different altitudes reflects the adaptive strategy of plants to environmental changes. *Ecology and Evolution*, 10(15), 8166-8175.
- Lopez, D., Bronner, G., Brunel, N., Auguin, D., Bourgerie, S., Brignolas, F., ... & Venisse, J. S. (2012). Insights into *Populus* XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. *Journal of Experimental Botany*, 63(5), 2217-2230.
- Luan H, Shen H, Pan Y, Guo B, Lv C, Xu R. (2018). Elucidating the hypoxic stress response in barley (*Hordeum vulgare* L.) during waterlogging: a proteomics approach. *Sci Rep* 8(1):9655
- Luo, L. J. (2010). Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. *Journal of experimental botany*, 61(13), 3509-3517.
- M'hirit O L'arganier : une espèce fruitière-forestière a usages multiples. In: Les espèces ligneuses à usages multiples des zones arides et méditerranéennes, Zaragoza, Spain, 25-26 september 1987 1989. Commission des Communautés européennes, Luxembourg, pp 141-168
- Macedo, A., (2012). Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism to Productivity. In: Ahmad, P., Prasad, M.N.V. (Eds.), *Abiotic Stress Responses in Plants*. Springer New York, pp. 41-61.

- Majourhat, K., Jabbar, Y., Araneda, L., Zeinalabedini, M., Hafidi, A., & Martínez-Gómez, P. (2007). Karyotype characterization of *Argania spinosa* (L.) Skeel (Sapotaceae). *South African Journal of Botany*, 73(4), 661-663.
- Malik, B., Pirzadah, T. B., Tahir, I., Rehman, R. U., Hakeem, K. R., and Abdin, M. Z. (2013). “Plant signalling response to reactive oxygen species” in *Plant signaling: Understanding the molecular crosstalk*. eds. K. R. Hakeem, R. U. Rehman and I. Tahir (New Delhi: Springer Science & Business Media), 1–38.
- Marček, T., Hamow, K. Á., Végh, B., Janda, T., & Darko, E. (2019). Metabolic response to drought in six winter wheat genotypes. *PLoS one*, 14(2), e0212411.
- Marques, I., Gouveia, D., Gaillard, J. C., Martins, S., Semedo, M. C., Lidon, F. C., ... & Ramalho, J. C. (2022). Next-Generation Proteomics Reveals a Greater Antioxidative Response to Drought in *Coffea arabica* Than in *Coffea canephora*. *Agronomy*, 12(1), 148.
- Martin, R. (2012). Regional economic resilience, hysteresis and recessionary shocks. *Journal of economic geography*, 12(1), 1-32.
- Matos, M. C., Campos, P. S., Ramalho, J. C., Medeira, M. C., Maia, M. I., Semedo, J. M., ... & Matos, A. (2002). Photosynthetic activity and cellular integrity of the Andean legume *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi under heat and water stress. *Photosynthetica*, 40(4), 493-501.
- Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J. I., & Chrispeels, M. J. (1993). The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal*, 12(6), 2241-2247.
- Maurel, C. (1997). Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annual review of plant biology*, 48(1), 399-429.
- Maurel, C., Chrispeels, M.J., (2001). Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.* 125, 135138.
- Maurel, C. (2007). Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS letters*, 581(12), 2227-2236.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D. T., & Santoni, V. (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 595-624.
- Maurel C, Boursiac Y, Luu DT, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L. (2015). Aquaporins in plants. *Physiol Rev* 95:1321–1358.
- Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Crosatti, C., Guerra, D., Stanca, A. M., & Cattivelli, L. (2008). Abiotic stress response in plants: when post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Science*, 174(4), 420-43
- McGettigan P. A. (2012). Transcriptomics in the RNA-seq era. *Current opinion in chemical biology*, 17(1), 4-11.
- McGregor, H. V., Dupont, L., Stuut, J. B. W., & Kuhlmann, H. (2009). Vegetation change, goats, and religion: a 2000-year history of land use in southern Morocco. *Quaternary Science Reviews*, 28(15-16), 1434-1448.
- Médail, F., & Quézel, P. (1999). The phytogeographical significance of SW Morocco compared to the Canary Islands. *Plant Ecology*, 140(2), 221-244.
- Meslem, H., Djabeur, A., Kharoubi, O., & Kaid-Harche, M. (2015). Effect of water deficit on Argan tree seedlings (*Argania spinosa* L. Skeels): Morphological and physiological aspect. *African Journal of Biotechnology*, 14(12), 1020-1028.
- Michaletti A, Naghavi MR, Toorchi M, Zolla L, Rinalducci S. (2018). Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Sci Rep* 8: 5710
- Miura, K., and Tada, Y. (2014). Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.* 5:4.

- Miura, K., Okamoto, H., Okuma, E., Shiba, H., Kamada, H., Hasegawa, P. M., et al. (2013). SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in Arabidopsis. *Plant J.* 73, 91–104.
- Mojemmi, S., Rchok, F., 2010. Développement d'outils bioinformatiques pour l'automatisation de l'analyse du génome de la vigne et de l'identification des microsatellites. Mohamed V, RABAT-MAROC, p. 72.
- Moradi, P., Mahdavi, A., Khoshkam, M., & Iriti, M. (2017). Lipidomics unravels the role of leaf lipids in thyme plant response to drought stress. *International journal of molecular sciences*, 18(10), 2067.
- Morita S, Sugiyama S, Tateishi A, Satoh S. (2017). Identification and characterization of plasma membrane intrinsic protein (PIP) aquaporin genes in petals of opening carnation flowers. *Horticulture Journal* 86:78–86
- Mosa, K. A., Ismail, A., & Helmy, M. (2017). Introduction to plant stresses. In *Plant stress tolerance* (pp. 1-19). Springer, Cham.
- Mougenot, I. (2012). FMIN366 Information Biologique: *Chapitre d'introduction*.
- Moukrim, S., Lahssini, S., Rhazi, M., Alaoui, H. M., Benabou, A., Wahby, I., ... & Rhazi, L. (2019). Climate change impacts on potential distribution of multipurpose agro-forestry species: Argania spinosa (L.) Skeels as case study. *Agroforestry Systems*, 93(4), 1209-1219.
- Mousavi SA, Pouya FM, Ghaffari MR, Mirzaei M, Ghaffari A, Alikhani M, Ghareyazie M, Komatsu S, Haynes PA, Salekdeh GH. (2016). PlantPReS: a database for plant proteome response to stress. *J Proteome* 143:69–72
- Msanda, F., El Aboudi, A., & Peltier, J. P. (2005). Biodiversité et biogéographie de l'arganeraie marocaine. *Cahiers Agricultures*, 14(4), 357-364.
- Msanda, F., Mayad, E. H., & Furze, J. N. (2021). Floristic biodiversity, biogeographical significance, and importance of Morocco's Arganeraie Biosphere Reserve. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.
- Mudgal, V., Madaan, N., & Mudgal, A. (2010). Biochemical mechanisms of salt tolerance in plants: a review. *International Journal of Botany*, 6(2), 136-143.
- Mudumbi, J. B. N., Ntwampe, S. K. O., Mekuto, L., Itoba-Tombo, E. F., & Matsha, T. E. (2017). Are aquaporins (AQPs) the gateway that conduits nutrients, persistent organic pollutants and perfluoroalkyl substances (PFASs) into plants?. *Springer Science Reviews*, 5(1), 31-48.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, 25(2), 239-250.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, 167(3), 645-663.
- Munns, R., & Termaat, A. (1986). Whole-plant responses to salinity. *Functional Plant Biology*, 13(1), 143-160.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., ... & Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407(6804), 599-605.
- Nadal, M., Roig-Oliver, M., Bota, J., & Flexas, J. (2020). Leaf age-dependent elastic adjustment and photosynthetic performance under drought stress in Arbutus unedo seedlings. *Flora*, 271, 151662.
- Nagarajan, S., & Nagarajan, S. (2009). Abiotic tolerance and crop improvement. In *Abiotic stress adaptation in plants* (pp. 1-11). Springer, Dordrecht.

- Natera SH, Hill CB, Rupasinghe TW, Roessner U. (2016). Salt-stress induced alterations in the root lipidome of two barley genotypes with contrasting responses to salinity. *Funct Plant Biol* 43(2):207–219
- Netondo, G. W., Onyango, J. C., Beck, E. (2004). Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop Sci.* 44, 806.
- Nouaim R, Chaussod R, El Aboudi A, Schnabel C, Peltier J. (1991). L'arganier: essai de synthèse des connaissances sur cet arbre. In: Groupe d'étude de l'arbre, editor. Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi arides. *John Libbey Eurotext*, Paris, pp 373-388
- Nouaim, R. (2005). L'arganier au Maroc: Entre mythes et réalités - Une civilisation née d'un arbre. *Editions L'Harmattan*.
- Nozaki, K., Ishii, D., & Ishibashi, K. (2008). Intracellular aquaporins: clues for intracellular water transport?. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 456(4), 701-707.
- Numan, M., Bashir, S., Khan, Y., Mumtaz, R., Shinwari, Z. K., Khan, A. L., ... & Ahmed, A. H. (2018). Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: a review. *Microbiological research*, 209, 21-32.
- O'Neill, P.M., Shanahan, J.F. & Schepers, J.S. (2006). Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. *Crop Sci.* 46:681- 687.
- Olsson, M. (1995). Alterations in lipid composition, lipid peroxidation and anti-oxidative protection during senescence in drought stressed plants and non-drought stressed plants of *Pisum sativum*. *Plant physiology and biochemistry* (Paris), 33(5), 547-553.
- Outamamat, E., El Mrabet, S., Dounas, H., Bargaz, A., Duponnois, R., & Ouahmane, L. (2022). Symbiotic interactions between a newly identified native mycorrhizal fungi complex and the endemic tree *Argania spinosa* mediate growth, photosynthesis, and enzymatic responses under drought stress conditions. *Canadian Journal of Forest Research*, 52(3), 335-345.
- Parent, C., Capelli, N. & Dat, J. (2008). Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *C. R. Biologies* 331: 255–261.
- Parida AK, Panda A, Rangani J. (2018). Metabolomics-guided elucidation of abiotic stress tolerance mechanisms in plants. In: *Plant metabolites and regulation under environmental stress*. Academic, San Diego, CA, pp 89–131
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental science and pollution research*, 22(6), 4056-4075.
- Park, W.J. ; Campbell, B.T. (2015). Aquaporins as targets for stress tolerance in plants: Genomic complexity and perspectives. *Turk. J. Bot.*, 39(6), 879-886.
- Patharkar, O. R., & Walker, J. C. (2019). Connections between abscission, dehiscence, pathogen defense, drought tolerance, and senescence. *Plant Science*, 284, 25-29.
- Pedersen, O., Sauter, M., Colmer, T. D., & Nakazono, M. (2021). Regulation of root adaptive anatomical and morphological traits during low soil oxygen. *New Phytologist*, 229(1), 42-49.
- Pehlivan, N., Sun, L., Jarrett, P., Yang, X., Mishra, N., Chen, L., ... & Zhang, H. (2016). Co-overexpressing a plasma membrane and a vacuolar membrane sodium/proton antiporter significantly improves salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant and Cell Physiology*, 57(5), 1069-1084.
- Pellegrini-Calace, M., Maiwald, T., & Thornton, J. M. (2009). PoreWalker: a novel tool for the identification and characterization of channels in transmembrane proteins from their three-dimensional structure. *PLoS computational biology*, 5(7), e1000440.

- Plesa, I. M., Al Hassan, M., González-Orenga, S., Sestras, A. F., Vicente, O., Prohens, J., ... & Sestras, R. E. (2019). Responses to drought in seedlings of European larch (*Larix decidua* Mill.) from several Carpathian provenances. *Forests*, 10(6), 511
- Peltier, J. P. (1982). La végétation du bassin versant de l'Ouest Souss (Maroc) (Doctoral dissertation, Thèse es-sciences. *Univ. Scient. et médie. de Grenoble*).
- Peltier, J. P., El Aboudi, A., Carlier, G. & Doche, B. (1992). Potentiel hydrique et conductance stomatique des feuilles d'Arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels) en début et au cours de la saison sèche dans le Souss (Maroc occidental). *Bull Ecol.* 23: 5-16.
- Pennington TD. (1991). The Genera of the Sapotaceae. *Royal Botanic Gardens, Kew*
- Perlikowski, D., & Kosmala, A. (2020). Mechanisms of drought resistance in introgression forms of *Lolium multiflorum*/Festuca arundinacea. *Festulolium: From the Nature to Modern Breeding*, 146.
- Pinto, L. R., Oliveira, K. M., Ulian, E. C., Garcia, A. A. F., & De Souza, A. P. (2004). Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. *Genome*, 47(5), 795-804.
- Qu, X., Wang, H., Chen, M., Liao, J., Yuan, J., & Niu, G. (2019). Drought stress-induced physiological and metabolic changes in leaves of two oil tea cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 144(6), 439-447.
- Rahdari, P., Hoseini, S. M., and Tavakoli, S. (2012). The studying effect of drought stress on germination, proline, sugar, lipid, protein and chlorophyll content in Purslane (*Portulaca oleraceae* L.) leaves. *J. Med. Plant Res.* 6, 1539–1547.
- Ramegowda V, Mysore KS, Senthil-Kumar M. (2014). Virus-induced gene silencing is a versatile tool for unraveling the functional relevance of multiple abiotic-stress-responsive genes in crop plants. *Front Plant Sci* 5:323.
- Rammal, H., Bouayed, J., Younos, C., and Soulimani, R. (2009). Notes ethnobotanique et phytopharmacologique d'Argania spinosa L. *Phytothérapie* 7, 157–160.
- Ranathunge, K., Shao, S., Qutob, D., Gijzen, M., Peterson, C. A., & Bernards, M. A. (2010). Properties of the soybean seed coat cuticle change during development. *Planta*, 231(5), 1171-1188.
- Ranganathan, K., Cooke, J. E., El Kayal, W., Equiza, M. A., Vaziriyeganeh, M., & Zwiazek, J. J. (2017). Over-expression of PIP2; 5 aquaporin alleviates gas exchange and growth inhibition in poplars exposed to mild osmotic stress with polyethylene glycol. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(8), 1-9.
- Ranganathan, K., El Kayal, W., Cooke, J. E., & Zwiazek, J. J. (2016). Responses of hybrid aspen over-expressing a PIP2; 5 aquaporin to low root temperature. *Journal of plant physiology*, 192, 98-104.
- Razzaq, A., Sadia, B., Raza, A., Khalid Hameed, M., & Saleem, F. (2019). Metabolomics: A way forward for crop improvement. *Metabolites*, 9(12), 303
- Reguera, M., Bassil, E., & Blumwald, E. (2014). Intracellular NHX-type cation/H<sup>+</sup> antiporters in plants. *Molecular plant*, 7(2), 261-263.
- Rehman, S., Abbas, G., Shahid, M., Saqib, M., Farooq, A. B. U., Hussain, M., et al. (2019). Effect of salinity on cadmium tolerance, ionic homeostasis and oxidative stress responses in conocarpus exposed to cadmium stress: Implications for phytoremediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 171, 146–153.
- Riadh, K., Wided, M., Hans-Werner, K., & Chedly, A. (2010). Responses of halophytes to environmental stresses with special emphasis to salinity. In *Advances in botanical research* (Vol. 53, pp. 117-145). *Academic Press*.
- Rodríguez-Rosales, M. P., Gálvez, F. J., Huertas, R., Aranda, M. N., Baghour, M., Cagnac, O., & Venema, K. (2009). Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant signaling & behavior*, 4(4), 265-276.

- Rueda, M.; Godoy, O.; Hawkins, B.A. (2017). Spatial and evolutionary parallelism between shade and drought tolerance explains the distributions of conifers in the conterminous United States. *Global Ecol. Biogeogr.* 26, 31–42.
- Sánchez-Martín, J., Canales, F. J., Tweed, J. K., Lee, M. R., Rubiales, D., Gómez-Cadenas, A., ... & Prats, E. (2018). Fatty acid profile changes during gradual soil water depletion in oats suggests a role for jasmonates in coping with drought. *Frontiers in plant science*, 9, 1077.
- Saradadevi, R., Palta, J. A., and Siddique, K. H. M. (2017). ABA-mediated stomatal response in regulating water use during the development of terminal drought in wheat. *Front. Plant Sci.* 8:1251.
- Sato, Y., & Sakaguchi, M. (2005). Topogenic properties of transmembrane segments of *Arabidopsis thaliana* NHX1 reveal a common topology model of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger family. *Journal of biochemistry*, 138(4), 425-431.
- Sazzad K. (2007). Exploring plant tolerance to biotic and abiotic stresses. *Swedish University of Agricultural Sciences*, Uppsala
- Shahid, S. A., Zaman, M., Heng, L., (2018). “Soil salinity: historical perspectives and a world overview of the problem,” in *Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques (Springer, Cham)*, 43–53.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C. A., & Zhao, C. X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes rendus biologies*, 331(3), 215-225.
- Shao, S., Guo, T., & Aebersold, R. (2015). Mass spectrometry-based proteomic quest for diabetes biomarkers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1854(6), 519-527.
- Sharma A, Shahzad B, Kumar V, Kohli SK, Sidhu GPS, Bali AS, Handa N, Kapoor D, Bhardwaj R, Zheng B. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules* 9(7):285
- Shelden, M. C., Howitt, S. M., Kaiser, B. N., & Tyerman, S. D. (2009). Identification and functional characterisation of aquaporins in the grapevine, *Vitis vinifera*. *Functional Plant Biology*, 36(12), 1065-1078.
- Shen W, Li H, Teng R, Wang Y, Wang W, Zhuang J. (2018). Genomic and transcriptomic analyses of HD-Zip family transcription factors and their responses to abiotic stress in tea plant (*Camellia sinensis*). *Genomics*.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current opinion in plant biology*, 6(5), 410-417.
- Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015). Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J. Biol. Sci.* 22, 123–131.
- Shulaev V, Cortes D, Miller G, Mittler R. (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiol Plant* 132:199–208
- Siemens, J. A., & Zwiazek, J. J. (2003). Effects of water deficit stress and recovery on the root water relations of trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings. *Plant science*, 165(1), 113-120.
- Singh M, Kumar J, Singh S, Singh VP, Prasad SM. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 14(3):407–426
- Singh, P. K., Srivastava, D., Tiwari, P., Tiwari, M., Verma, G., & Chakrabarty, D. (2019). Drought tolerance in plants: molecular mechanism and regulation of signaling molecules. In *Plant Signaling Molecules* (pp. 105-123). Woodhead Publishing.

- Singh, R. K., Deshmukh, R., Muthamilarasan, M., Rani, R., & Prasad, M. (2020). Versatile roles of aquaporin in physiological processes and stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 149, 178-189.
- Slama, A., Ben Salem, M., Ben Naceur, M., & Zid, E. (2005). Les céréales en Tunisie: production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. *Sécheresse*, 16(3), 225-229.
- Soliman, S. S. M., Abouleish, M., Abou-Hashem, M. M. M., Hamoda, A. M., and El-Keblawy, A. A. (2019). Lipophilic metabolites and anatomical acclimatization of *Cleome amblyocarpa* in the drought and extra-water areas of the arid desert of UAE. *Plants* 8:132.
- Sottosanto, J. B., Saranga, Y., & Blumwald, E. (2007). Impact of AtNHX1, a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, upon gene expression during short-and long-term salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 7(1), 1-15.
- Spicher L, Glauser G, Kessler F. (2016). Lipid antioxidant and galactolipid remodeling under temperature stress in tomato plants. *Front Plant Sci* 7:167
- Steudle, E. (2000). Water uptake by roots: effects of water deficit. *Journal of experimental botany*, 51(350), 1531-1542.
- Stevens, T. J., & Arkin, I. T. (2000). Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes?. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 39(4), 417-420.
- Stride, G., Nylander, S., & Swenson, U. (2014). Revisiting the biogeography of *Sideroxylon* (Sapotaceae) and an evaluation of the taxonomic status of *Argania* and *Spiniluma*. *Australian Systematic Botany*, 27(2), 104-118.
- Strock, C. F., Burrige, J. D., Niemiec, M. D., Brown, K. M., & Lynch, J. P. (2021). Root metaxylem and architecture phenotypes integrate to regulate water use under drought stress. *Plant, Cell & Environment*, 44(1), 49-67
- Subudhi PK. (2011). Omics approaches for abiotic stress tolerance in plants. In: Tuteja N, Gill SS, Tuteja R (eds) Omics and plant abiotic stress tolerance. Bentham Science Publishers Ltd.,pp 10–38
- Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK. (2001). Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* 414:872–878
- Sun, M. H., Ma, Q. J., Liu, X., Zhu, X. P., Hu, D. G., & Hao, Y. J. (2017). Molecular cloning and functional characterization of MdNHX1 reveals its involvement in salt tolerance in apple calli and *Arabidopsis*. *Scientia Horticulturae*, 215, 126-133.
- Sutka, M., Amodeo, G., & Ozu, M. (2017). Plant and animal aquaporins crosstalk: what can be revealed from distinct perspectives. *Biophysical Reviews*, 9(5), 545-562.
- Suwa, R., Nguyen, N. T., Saneoka, H., Moghaieb, R., and Fujita, K. (2006). Effect of salinity stress on photosynthesis and vegetative sink in tobacco plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 52, 243–250.
- Taïbi, K., Taïbi, F., Abderrahim, L. A., Ennajah, A., Belkhodja, M., and Mulet, J. M. (2016). Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *S. Afr. J. Bot.* 105, 306–312.
- Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., Von Wirén, N., & Fujiwara, T. (2006). The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5; 1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *The Plant Cell*, 18(6), 1498-1509.
- Takeda S, Matsuoka M. (2008). Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nat Rev Genet* 9:444–457
- Tang, S., Liang, H., Yan, D., Zhao, Y., Han, X., Carlson, J. E., ... & Yin, W. (2013). *Populus euphratica*: the transcriptomic response to drought stress. *Plant molecular biology*, 83(6), 539-557.
- Tarrier, M. R., & Benzyane, M. (2003). L'arganeraie marocaine se meurt: problématique et bio-indication. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 14(1), 60-62.

- Tattini, M.; Gucci, R.; Coradeschi, M.A.; Ponzio, C.; Everard, J.D. (1995). Growth, gas exchange and ion content in *Olea europaea* plants during salinity stress and subsequent relief. *Physiol. Plant.* 95, 203–210.
- Tazi, M. R., Berrichi, A., & Haloui, B. (2003). Effet du polyéthylène glycol sur la germination et la croissance in vitro de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) des Beni-Snassen (Maroc oriental). *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 14(1), 23-27.
- Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of botany*, 91(5), 503-527.
- Thiry AA, Chavez Dulanto PN, Reynolds MP, Davies WJ. (2016). How can we improve crop geno- types to increase stress resilience and productivity in a future climate? A new crop screening method based on productivity and resistance to abiotic stress. *J Exp Bot* 67(19):5593–5603
- Tian, F., Chang, E., Li, Y., Sun, P., Hu, J., & Zhang, J. (2017). Expression and integrated network analyses revealed functional divergence of NHX-type Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger genes in poplar. *Scientific reports*, 7(1), 1-17.
- Tschaplinski, T. J., Abraham, P. E., Jawdy, S. S., Gunter, L. E., Martin, M. Z., Engle, N. L., ... & Tuskan, G. A. (2019). The nature of the progression of drought stress drives differential metabolomic responses in *Populus deltoides*. *Annals of Botany*, 124(4), 617-626.
- Tyers, M., & Mann, M. (2003). From genomics to proteomics. *Nature*, 422(6928), 193-197.
- Ullah, A., Manghwar, H., Shaban, M., Khan, A. H., Akbar, A., Ali, U., et al. (2018). Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 33103–33118.
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M., & Shinozaki, K. (2010). 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current opinion in plant biology*, 13(2), 132-138.
- Venema, K., Belver, A., Marín-Manzano, M. C., Rodríguez-Rosales, M. P., & Donaire, J. P. (2003). A novel intracellular K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter related to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters is important for K<sup>+</sup> ion homeostasis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 22453-22459.
- Venisse, J. S., Öunapuu-Pikas, E., Dupont, M., Gousset-Dupont, A., Saadaoui, M., Faize, M., ... & Label, P. (2021). Genome-Wide Identification, Structure Characterization, and Expression Pattern Profiling of the Aquaporin Gene Family in *Betula pendula*. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7269.
- Venkatesh, J., Yu, J. W., & Park, S. W. (2013). Genome-wide analysis and expression profiling of the *Solanum tuberosum* aquaporins. *Plant physiology and biochemistry*, 73, 392-404.
- Virlouvet, L. (2011). Identification et caractérisation de gènes impliqués dans la variation de caractères quantitatifs affectés par la sécheresse chez le maïs (Doctoral dissertation, *Université Paris Sud-Paris XI*). 1-14.
- Walker, D. J., Leigh, R. A., & Miller, A. J. (1996). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(19), 10510-10514.
- Wallace, I. S., Choi, W. G., & Roberts, D. M. (2006). The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(8), 1165-1175.
- Wang Z., Gerstein M., Snyder M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 5
- Wang, Y., Wu, W.H., (2013). Potassium transport and signaling in higher plants. *Ann.Rev. Plant Biol.* 64, 451–476.
- Wang H, Wang H, Shao H, Tang X. (2016). Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. *Front Plant Sci* 7:67
- Wang P, Su L, Gao H, Jiang X, Wu X, Li Y, Zhang Q, Wang Y, Ren F. (2018). Genome-wide characterization of bHLH genes in grape and analysis of their potential relevance to abiotic stress tolerance and secondary metabolite biosynthesis. *Front Plant Sci* 9:64

- Wang, Z., Li, G., Sun, H., Ma, L., Guo, Y., Zhao, Z., ... & Mei, L. (2018). Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biology open*, 7(11), bio035279.
- Wang, X., Guo, R., Li, M., Liu, Y., Zhao, M., Fu, H., ... & Shi, L. (2019). Metabolomics reveals the drought-tolerance mechanism in wild soybean (*Glycine soja*). *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(9), 1-11.
- Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*, 4(3), 162-176.
- Wayne, R., & Tazawa, M. (1990). Nature of the water channels in the internodal cells of *Nitellopsis*. *The Journal of membrane biology*, 116(1), 31-39.
- Wei, Q., Ma, Q., Ma, Z., Zhou, G., Feng, F., Le, S., ... & Gu, Q. (2019). Genome-wide identification and characterization of sweet orange (*Citrus sinensis*) aquaporin genes and their expression in two citrus cultivars differing in drought tolerance. *Tree Genetics & Genomes*, 15(2), 17.
- Weig, A., Deswarte, C., & Chrispeels, M. J. (1997). The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiology*, 114(4), 1347-1357.
- Wiebe, C.A., Dibattista, E.R., Fliegel, L., (2001). Functional role of polar amino acid residues in Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *The Biochemical journal* 357, 1-10.
- Wolters, H., and Jürgens, G. (2009). Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat. Rev. Genet.* 10, 305–317.
- Wu G-Q, Wang J-L, Li S-J. (2019). Genome-Wide identification of Na / H<sup>+</sup> antiporter (NHX) genes in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and their regulated expression under salt stress. *Genes* 10:401.
- Wu, G. Q., Wang, Q., Bao, A. K., & Wang, S. M. (2011). Amiloride reduces sodium transport and accumulation in the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* under salt conditions. *Biological trace element research*, 139(3), 356-367.
- Wu, H. (2018). Plant salt tolerance and Na<sup>+</sup> sensing and transport. *The Crop Journal*, 6(3), 215-225.
- Xia, T., Apse, M. P., Aharon, G. S., & Blumwald, E. (2002). Identification and characterization of a NaCl-inducible vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Beta vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 116(2), 206-212.
- Xie, C., Li, B., Xu, Y., Ji, D., & Chen, C. (2013). Characterization of the global transcriptome for *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and development of cSSR markers. *BMC genomics*, 14(1), 1-13.
- Xu, J., Aileni, M., Abbagani, S., & Zhang, P. (2010). A reliable and efficient method for total RNA isolation from various members of spurge family (Euphorbiaceae). *Phytochemical Analysis*, 21(5), 395-398.
- Xu, Y., Zhou, Y., Hong, S., Xia, Z., Cui, D., Guo, J., ... & Jiang, X. (2013). Functional characterization of a wheat NHX antiporter gene TaNHX2 that encodes a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *PLoS One*, 8(11), e78098
- Yadav, D. (2015). Relevance of bioinformatics in the era of omics driven research. *Journal of Next Generation Sequencing & Applications*, 2(1), e102.
- Yamaguchi, T., Apse, M. P., Shi, H., & Blumwald, E. (2003). Topological analysis of a plant vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), 12510-12515.
- Yamaguchi, T., & Blumwald, E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in plant science*, 10(12), 615-620.

- Yaguinuma, D. H., dos Santos, T. B., de Souza, S. G. H., Vieira, L. G. E., & Ribas, A. F. (2021). Genome-Wide Identification, Evolution, and Expression Profile of Aquaporin Genes in *Coffea canephora* in Response to Water Deficit. *Plant Molecular Biology Reporter*, 39(1), 146-162.
- Yang, K., and Han, X. (2016). Lipidomics: techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences. *Trends Biochem. Sci.* 41, 954–969.
- Yang, K., Cheng, H., Gross, R. W., & Han, X. (2009). Automated lipid identification and quantification by multidimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics. *Analytical chemistry*, 81(11), 4356-4368.
- Ye, C. Y., Yang, X., Xia, X., & Yin, W. (2013). Comparative analysis of cation/proton antiporter superfamily in plants. *Gene*, 521(2), 245-251.
- Yokoi, S., Quintero, F. J., Cubero, B., Ruiz, M. T., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., & Pardo, J. M. (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal*, 30(5), 529-539.
- Yuan, Y., Liu, L., Gao, Y., Yang, Q., Dong, K., Liu, T., & Feng, B. (2022). Comparative analysis of drought-responsive physiological and transcriptome in broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) genotypes with contrasting drought tolerance. *Industrial Crops and Products*, 177, 114498.
- Zahidi A, Bani-Aameur F, El Mousadik A. (2013a). Variability in leaf size and shape in three natural populations of *Argania spinosa* (L.) Skeels *International Journal of Current Research and Academic Review* 1:13-25
- Zahidi, A., Bani-Aameur, F., & El Mousadik, A. (2013b). Growth variability in *Argania spinosa* seedlings subjected to different levels of drought stress. *Journal of Horticulture and Forestry*, 5(11), 204-217.
- Zhang L, Li X, Ma B, Gao Q, Du H, HanY, LiY, CaoY, Qi M, ZhuY, Lu H. (2017). The tartary buckwheat genome provides insights into rutin biosynthesis and abiotic stress tolerance. *Mol Plant* 10(9):1224–1237
- Zhang, X., Xu, Y., & Huang, B. (2019). Lipidomic reprogramming associated with drought stress priming-enhanced heat tolerance in tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Plant, cell & environment*, 42(3), 947-958.
- Zhang X, Yao C, Fu S, Xuan H, Wen S, Liu C, Li F, Liu A, Bi S, Zhang S, Li S. (2018). Stress2TF: a manually curated database of TF regulation in plant response to stress. *Gene* 638:36–40
- Zhang, D. Y., Ali, Z., Wang, C. B., Xu, L., Yi, J. X., Xu, Z. L., ... & Ma, H. X. (2013). Genome-wide sequence characterization and expression analysis of major intrinsic proteins in soybean (*Glycine max* L.). *PLoS one*, 8(2), e56312.
- Zhang, G., Yu, Z., da Silva, J. A. T., & Wen, D. (2021). Identification of aquaporin members in *Acacia auriculiformis* and functional characterization of AaPIP1-2 involved in drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 185, 104425.
- Zhar N, Naamani K, Dihazi A, Jaiti F, El Keroumi A. (2016). Comparative analysis of some biochemical parameters of argan pulp morphotypes (*Argania spinosa* (L) Skeels) during maturity and according to the continentality in Essaouira region (Morocco) *Physiology and Molecular Biology of Plants* 22:361-370
- Zhou, S., Hu, W., Deng, X., Ma, Z., Chen, L., Huang, C., ... & He, G. (2012). Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *PloS one*, 7(12), e52439.
- Zhu, Y. X., Yang, L., Liu, N., Yang, J., Zhou, X. K., Xia, Y. C., ... & Yin, J. L. (2019). Genome-wide identification, structure characterization, and expression pattern profiling of aquaporin gene family in cucumber. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1-23.

- Zou, Z., Gong, J., An, F., Xie, G., Wang, J., Mo, Y., & Yang, L. (2015a). Genome-wide identification of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) aquaporin genes and their response to ethephon stimulation in the laticifer, a rubber-producing tissue. *BMC genomics*, 16(1), 1-18.
- Zou, Z., Gong, J., Huang, Q., Mo, Y., Yang, L., & Xie, G. (2015b). Gene structures, evolution, classification and expression profiles of the aquaporin gene family in castor bean (*Ricinus communis* L.). *PloS one*, 10(10), e0141022.
- Zrira S. (2017). Some important aromatic and medicinal plants of Morocco. M. Neffati et al. (eds.), Medicinal and aromatic plants of the world – Africa Volume 3, *Medicinal and Aromatic Plants of the World*
- Zunzunegui M, Ain-Lhout F, Jáuregui J, Díaz Barradas MC, Boutaleb S, Álvarez-Cansino L, Esquivias MP (2010) Fruit production under different environmental and management conditions of argan, *Argania spinosa* (L.) *Journal of Arid Environments* 74:1138-1145

# *Annexes*

Annexe 1: Numéros d'accessions des séquences des gènes candidats d'aquaporine chez différentes espèces

<b>Genes</b>	<b>Accession number of nucleotide</b>	<b>Species</b>	<b>Types</b>
PIP1,1	JQ846270.1	<i>Quercus petraea</i>	woody
PIP1,1	FJ971053.1	<i>Juglans regia</i>	woody
PIP1,1	XM_002312111.2	<i>Populus trichocarpa</i>	woody
PIP1,1	AB058679.1	<i>Pyrus communis</i>	woody
PIP1,1	AB286964.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous
PIP1,1	JF834202.1	<i>Malus prunifolia</i>	woody
PIP1,1	JN632528.1	<i>Malus hupehensis</i>	woody
PIP1,1	EF364432.1	<i>Vitis vinifera</i>	woody
PIP1,1	NM_001084854.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
PIP1,1	JX317646.1	<i>Prunus persica</i>	woody
PIP1,1	JF491349.1	<i>Helianthemum almeriense</i>	Herbaceous
PIP1,1	KF641169.1	<i>Cucumis sativus</i>	Herbaceous
PIP1,1	GQ903902.1	<i>Hevea brasiliensis</i>	woody
PIP1,1	AY243800.1	<i>Zea mays</i>	Herbaceous
PIP1,1	AB206098.1	<i>Mimosa pudica</i>	Herbaceous
PIP1,1	NM_001294021.1	<i>Malus domestica</i>	woody
PIP1,1	AY663794.1	<i>Fraxinus excelsior</i>	woody
PIP1,1	GQ411362.1	<i>Fragaria chiloensis</i>	Herbaceous
PIP1,1	AJ849323.1	<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>	woody
PIP1,2	JQ846271.1	<i>Quercus petraea</i>	woody
PIP1,2	GAJT01000001.1	<i>Coffea arabica</i>	woody
PIP1,2	XM_002303560.2	<i>Populus trichocarpa</i>	woody
PIP1,2	AF131201.1	<i>Zea mays</i>	Herbaceous
PIP1,2	AB275278.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous
PIP1,2	KF770828.1	<i>Pisum sativum</i>	Herbaceous
PIP1,2	NM_001084598.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
PIP1,2	AY372191.1	<i>Spinacia oleracea</i>	Herbaceous
PIP1,2	KF641170.1	<i>Cucumis sativus</i>	Herbaceous
PIP1,2	HQ328777.1	<i>Hevea brasiliensis</i>	woody
PIP1,2	DQ834695.1	<i>Vitis vinifera</i>	woody
PIP1,2	KP164979.1	<i>Vitis heyneana</i>	woody
PIP1,2	EF470293.1	<i>Gossypium hirsutum</i>	woody
PIP1,2	AJ849322.1	<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>	woody
PIP1,3	JQ846272.1	<i>Quercus petraea</i>	woody
PIP1,3	XM_002315135.2	<i>Populus trichocarpa</i>	woody
PIP1,3	AB009308.2	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous
PIP1,3	EF364434.1	<i>Vitis vinifera</i>	woody
PIP1,3	NM_001305756.1	<i>Cucumis sativus</i>	Herbaceous
PIP1,3	NM_100044.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
PIP1,3	DQ855475.1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Herbaceous
PIP1,3	NM_001111552.1	<i>Zea mays</i>	Herbaceous
PIP1,3	XM_002526821.1	<i>Ricinus communis</i>	Herbaceous

PIP1,3	KP164980.1	<i>Vitis heyneana</i>	woody
PIP1,3	XM_002446884.1	<i>Sorghum bicolor</i>	Herbaceous
PIP1,4	XM_002309090.1	<i>Populus trichocarpa</i>	woody
PIP1,4	AB275279.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous
PIP1,4	EF364435.1	<i>Vitis vinifera</i>	woody
PIP1,4	HM641265.1	<i>Camelina sativa</i>	Herbaceous
PIP1,4	FJ646594.1	<i>Gossypium hirsutum</i>	woody
PIP1,4	NM_202760.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
PIP1,4	NM_001305690.1	<i>Cucumis sativus</i>	Herbaceous
PIP1,4	NM_001293985.1	<i>Malus domestica</i>	woody
PIP2,1	JQ768372.1	<i>Quercus petraea</i>	woody
PIP2,1	AY189973.1	<i>Juglans regia</i>	woody
PIP2,1	GAJT01000002.1	<i>Coffea arabica</i>	woody
PIP2,1	AJ849324.1	<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>	woody
PIP2,1	XM_002312916.2	<i>Populus trichocarpa</i>	woody
PIP2,1	AB058678.1	<i>Pyrus communis</i>	woody
PIP2,1	AB219366.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous
PIP2,1	JF834203.1	<i>Malus prunifolia</i>	woody
PIP2,1	JN632529.1	<i>Malus hupehensis</i>	woody
PIP2,1	AY823263.1	<i>Vitis vinifera</i>	woody
PIP2,1	AF062393.1	<i>Oryza sativa</i>	Herbaceous
PIP2,1	JF491351.1	<i>Helianthemum almeriense</i>	Herbaceous
PIP2,1	FJ607305.1	<i>Medicago sativa</i>	Herbaceous
PIP2,1	NM_001035774.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
PIP2,1	KF641172.1	<i>Cucumis sativus</i>	Herbaceous
PIP2,1	AY243801.1	<i>Zea mays</i>	Herbaceous
PIP2,1	FJ851079.1	<i>Hevea brasiliensis</i>	woody
PIP2,1	AY995195.1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Herbaceous
PIP2,1	EU572717.1	<i>Rosa hybrid</i>	Herbaceous
PIP2,1	AB206099.1	<i>Mimosa pudica</i>	Herbaceous
PIP2,1	DQ341104.1	<i>Rhododendron catawbiense</i>	Herbaceous
PIP2,1	KP164981.1	<i>Vitis heyneana</i>	woody
PIP2,1	JQ364746.1	<i>Eustoma exaltatum</i>	Herbaceous
PIP2,1	JN206682.1	<i>Karelinia caspia</i>	Herbaceous
PIP2,1	GQ411363.1	<i>Fragaria chiloensis</i>	Herbaceous
PIP2,2	JQ846268.1	<i>Quercus petraea</i>	woody
PIP2,2	AY189974.1	<i>Juglans regia</i>	woody
PIP2,2	GAJT01000003.1	<i>Coffea arabica</i>	woody
PIP2,2	GAJU01000002.1	<i>Coffea racemosa</i>	woody
PIP2,2	XM_002306151.2	<i>Populus trichocarpa</i>	woody
PIP2,2	AB377269.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous
PIP2,2	EF364436.1	<i>Vitis vinifera</i>	woody
PIP2,2	KF770829.1	<i>Pisum sativum</i>	Herbaceous
PIP2,2	NM_129273.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
PIP2,2	AF141900.1	<i>Vitis berlandieri x Vitis rupestris</i>	woody
PIP2,2	EF624001.1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Herbaceous

PIP2,2	KF641173.1	<i>Cucumis sativus</i>	Herbaceous
PIP2,2	JN632527.1	<i>Malus hupehensis</i>	woody
PIP2,2	HQ328778.1	<i>Hevea brasiliensis</i>	woody
PIP2,2	EF079902.1	<i>Gossypium hirsutum</i>	woody
PIP2,2	AB206100.1	<i>Mimosa pudica</i>	Herbaceous
PIP2,2	GQ253563.1	<i>Populus trichocarpa x Populus deltoides</i>	woody
PIP2,2	KP164982.1	<i>Vitis heyneana</i>	woody
PIP2,2	JX119006.1	<i>Eustoma exaltatum</i>	Herbaceous
PIP2,2	JQ364745.1	<i>Hedychium coronarium</i>	Herbaceous
PIP2,3	JQ846269.1	<i>Quercus petraea</i>	woody
PIP2,3	AJ849326.1	<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>	woody
PIP2,3	XM_002322841.1	<i>Populus trichocarpa</i>	woody
PIP2,3	AB275280.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous
PIP2,3	EF364437.1	<i>Vitis vinifera</i>	woody
PIP2,3	KF770830.1	<i>Pisum sativum</i>	Herbaceous
PIP2,3	NM_129274.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
PIP2,3	KF641174.1	<i>Cucumis sativus</i>	Herbaceous
PIP2,3	EU402412.1	<i>Gossypium hirsutum</i>	woody
PIP2,3	EF624002.1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Herbaceous
PIP2,3	KR866285.1	<i>Salix purpurea</i>	Herbaceous
PIP2,3	AB206101.1	<i>Mimosa pudica</i>	Herbaceous
PIP2,3	KF921089.1	<i>Hevea brasiliensis</i>	woody
PIP2,4	XM_002316331.1	<i>Populus trichocarpa</i>	woody
PIP2,4	AB219525.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous
PIP2,4	NM_125459.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
PIP2,4	EF364438.1	<i>Vitis vinifera</i>	woody
PIP2,4	KF641175.1	<i>Cucumis sativus</i>	Herbaceous
PIP2,4	EU402413.1	<i>Gossypium hirsutum</i>	woody
PIP2,4	AB206102.1	<i>Mimosa pudica</i>	Herbaceous
PIP2,4	NM_125459.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
TIP1,1	AB540221.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous
TIP1,1	JF834207.1	<i>Malus prunifolia</i>	woody
TIP1,1	NM_129238.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
TIP1,1	AY839872.2	<i>Vitis vinifera</i>	woody
TIP1,1	FJ861240.1	<i>Daucus carota</i>	Herbaceous
TIP1,1	FJ384629.1	<i>Gossypium hirsutum</i>	woody
TIP1,1	AY243803.1	<i>Zea mays</i>	Herbaceous
TIP1,1	HQ234609.1	<i>Helianthemum almeriense</i>	Herbaceous
TIP1,1	KF851321.1	<i>Camellia japonica</i>	woody
TIP1,1	FJ851080.1	<i>Hevea brasiliensis</i>	woody
TIP1,1	AB206104.1	<i>Mimosa pudica</i>	Herbaceous
TIP1,1	KP234262.1	<i>Pinus massoniana</i>	woody
TIP1,1	KF134811.1	<i>Cucumis melo</i>	Herbaceous
TIP1,2	GAJT01000004.1	<i>Coffea arabica</i>	woody
TIP1,2	AF326500.1	<i>Zea mays</i>	Herbaceous
TIP1,2	AB540226.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous

<b>TIP1,2</b>	NM_113559.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
<b>TIP1,2</b>	DQ834702.1	<i>Vitis vinifera</i>	woody
<b>TIP1,2</b>	AB206105.1	<i>Mimosa pudica</i>	Herbaceous
<b>TIP1,3</b>	NM_116377.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
<b>TIP1,3</b>	KR866288.1	<i>Salix purpurea</i>	Herbaceous
<b>TIP1,3</b>	GU584119.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous
<b>TIP1,3</b>	BK007053.1	<i>Gossypium hirsutum</i>	woody
<b>TIP2,1</b>	JQ846274.1	<i>Quercus petraea</i>	woody
<b>TIP2,1</b>	JF834204.1	<i>Malus prunifolia</i>	woody
<b>TIP2,1</b>	AB540222.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous
<b>TIP2,1</b>	EF364439.1	<i>Vitis vinifera</i>	woody
<b>TIP2,1</b>	NM_112495.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
<b>TIP2,1</b>	KR866291.1	<i>Salix purpurea</i>	Herbaceous
<b>TIP2,1</b>	FJ966882.1	<i>Lolium perenne</i>	Herbaceous
<b>TIP2,1</b>	FJ861241.1	<i>Daucus carota</i>	Herbaceous
<b>TIP2,1</b>	AB206106.1	<i>Mimosa pudica</i>	Herbaceous
<b>TIP2,1</b>	NM_001111560.1	<i>Zea mays</i>	Herbaceous
<b>TIP2,1</b>	AY525639.1	<i>Triticum aestivum</i>	Herbaceous
<b>TIP2,2</b>	JQ846275.1	<i>Quercus petraea</i>	woody
<b>TIP2,2</b>	AB540223.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous
<b>TIP2,2</b>	AY525640.1	<i>Triticum aestivum</i>	Herbaceous
<b>TIP2,2</b>	KR866292.1	<i>Salix purpurea</i>	Herbaceous
<b>TIP2,2</b>	NM_117838.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
<b>TIP2,3</b>	AB540224.1	<i>Hordeum vulgare</i>	Herbaceous
<b>TIP2,3</b>	XM_002448244.1	<i>Sorghum bicolor</i>	Herbaceous
<b>TIP2,3</b>	NM_124117.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbaceous
<b>TIP2,3</b>	XM_002303321.2	<i>Populus trichocarpa</i>	woody
<b>TIP2,3</b>	GU998837.1	<i>Gossypium hirsutum</i>	woody
<b>TIP2,3</b>	AY525641.1	<i>Triticum aestivum</i>	Herbaceous

## Annexe 2: Caractéristiques des amorces SSR du gène aquaporine

Primers	ID	Repeat	Forward Primer (5'–3')	T m °C	GC%	Reverse primer (3'–5')	Tm °C	GC%	Produ ct size pb
DAS1	JQ846270.1	(CCA)3	CTATAGGGACAGCGGCTCAG	60	60	CAAGAGCAAAGATCATGCCA	59	45	257
DAS2	JQ846270.1	(TGGG)2	ATCTACAACAGGGACCACGC	60	55	TTTGAAAGGAAGGGCTCTGA	59	45	117
DAS3	JQ846270.1	(CCTT)2(TCAAA)2	ATCTACAACAGGGACCACGC	60	55	AATTGAAACCAACTCCGCTTG	60	45	211
DAS4	FJ971053.1	(TTTG)2	TGCTGAGGAAAAGAGCCATT	60	45	CATCCTCTTCCTTTCCCTCC	60	55	102
DAS4	FJ971053.1	(CAGA)2	GGAGGGAAAGGAAGAGGATG	60	55	CTGGAGGTGGCTCCTTG TAG	59	60	107
DAS5	FJ971053.1	(CAT)3	TCTCCCTCACAAGAGCCCTA	59	55	TAAACCAGGACAAAGGTGCC	60	50	193
DAS6	FJ971053.1	(TGGG)2	GCGGTGTTCTTGTTCACTT	60	50	TTGAGATCCAAAGTGAGGGG	60	50	241
DAS7	FJ971053.1	(GATT)2	ACCAATGGATCTTCTGGGTG	59	50	ACGGGTTGAGATCCAAAGTG	60	50	137
DAS8	FJ971053.1	(CATGTG)2	CACTTTGGATCTCAACCCGT	60	50	AAAATGGCATAATTTACACGCA	59	32	138
DAS9	XM_002312111.2	(AAG)3	ACTGCGTTTGATTGTTGA	60	40	AACCACCCACTCACAGTCA	59	50	275
DAS10	XM_002312111.2	(TGGTG)2	ATGGGTGTGGTTAAGGACCA	60	50	CACCACCATTATGCAACTCG	60	50	280
DAS11	XM_002312111.2	(AAAC)2	GCTGGTGTGGTGAAAGGATT	60	50	TGGCATCAGTTGCAGAGAAG	60	50	160
DAS12	XM_002312111.2	(CTCCT)2	CAAGCCCAGTTTGTTCATT	60	45	CAGCCAAACCCCTCAA ACTA	60	50	194
DAS13	XM_002312111.2	(GGGC)2	CAAGCCCAGTTTGTTCATT	60	45	CATGAAAATGACATGCCACA	58	40	279
DAS14	AB058679.1	(T)11	AAACAGAGATACTTCATTTCTCA AACA	58	30	GAGAACTTGTTGCTCCAG	60	55	235
DAS15	AB058679.1	(CACACC)2	ACCGCAAATACATCGGAAAG	60	45	GAGAACTTGTTGCTCCAG	60	55	185
DAS16	AB058679.1	(AAGTCG)2	CACAATCTTGACGGTGATGG	60	50	CCGGCTATAGCTCCTAGGGT	59	60	237
DAS17	AB058679.1	(CCAG)2	GAGATCATCGGCACCTTTGT	60	50	GGCATGCTGCTTGTGTAGA	60	50	213
DAS18	AB058679.1	(AATT)2(TGTGA)2*(A GCA)2*	CCATCCCTTCAAGTCCAAG	59	50	AAAAAGATGGAATGGAGGGC	60	45	244
DAS19	AB058679.1	(TCCAT)2	CCATCCCTTCAAGTCCAAG	59	50	GTGGGGCCTCTCCCTAAA	60	61	260
DAS20	AB286964.1	(CTTCCT)2	GCTCAAGTCGTGGTCTTCT	59	55	GATGATGTAGAACACCGCCC	60	55	280
DAS21	AB286964.1	(CAT)3	ATGATCTTCGCCCTCGTCTA	59	50	GTACAGGCCCTGCTGGAAC	60	63	186
DAS22	AB286964.1	(CGG)3	GGCGGTGTTCTACATCATCA	59	50	GTAGACGAGGACGAAGGTGC	59	60	178
DAS23	AB286964.1	(CACCGG)2	GTCTACACCGTCTTCTCCGC	59	60	GATCGCTCTGATGACCACCT	60	55	276
DAS24	AB286964.1	(GCT)3	TCCCATTCAAGACCAAGTCC	59	50	ATTTGCACAACAACGAGCAG	59	45	271
DAS25	AB286964.1	(AGAA)2	TCAATTAGATTTAGCCCCG	60	45	CTTTGCCCCATCACTCTAGC	59	55	221
DAS26	AB286964.1	(GCTA)2	TCAATTAGATTTAGCCCCG	60	45	CTCCGCTCATCATTGTCCTT	60	50	238
DAS27	AB286964.1	(TCTGG)2	GCTAGAGTGATGGGGCAAAG	59	55	AGGTCCTGACACACAGGATG	58	55	155
DAS28	JF834202.1	(CAAGTC)2	CACAATCTTGACGGTGATGG	60	50	ATGTAGAACAACGCCCTGGT	59	50	207
DAS29	JF834202.1	(CCAG)2	GAGATCATCGGCACCTTTGT	60	50	GAACGGTCCAACCCAGAATA	59	50	249
DAS30	JF834202.1	(AGCA)2(AAGCA)2*	GCAGCACTTGACAGTTTGTGTA	60	50	GCCCCTGATCCTGAGACATA	60	55	260
DAS31	EF364432.1	(GGT)3	CTACATGGTGATGCAGTGCC	60	55	ACGAAAGGTGCCAACAATCTC	60	50	159
DAS32	EF364432.1	(TGGG)2	TCTACAACAAGGACCACGCA	60	50	GCAAACGGATAAAAAGTGGGA	59	45	203
DAS33	EF364432.1	(CATT)2	ACCACTGGATCTTCTGGGTG	60	55	GCAAACGGATAAAAAGTGGGA	59	45	176
DAS34	EF364432.1	(TAATG)2	ACCACTGGATCTTCTGGGTG	60	55	CACATTTACAGCGTCACTT	59	50	252
DAS35	NM_001084854.1	(CCAAT)2	CTGTCCAAAGTCCAAACGGT	60	50	TTCCGATTGGTTGTCTCTCC	60	50	186

DAS36	NM_001084854.1	(ACC)3	CTGTCCAAAGTCCAAACGGT	60	50	AGCTCACCAGGTTTCGAAAAA	59	45	253
DAS37	NM_001084854.1	(TTTCTC)2	TCGAACCTGGTGAGCTTTCT	60	50	AAGTAACCGCTGGGTTGATG	60	50	237
DAS38	NM_001084854.1	(AGG)3	AGGGTTCAGCCTAAGCAAT	60	50	GGACATGAGAGTCACGAGCA	60	55	170
DAS39	NM_001084854.1	(ATGT)2	CATCCCCTTCAAGTCCAGAA	60	50	TTGCATTAAGAGGGCACATAGA	59	41	147
DAS40	JX317646.1	(CCT)2	CATGGTCGTTTTACAGGGCT	60	50	TAGAAAAACCGCCCTTGTCAG	60	50	265
DAS41	JX317646.1	(AGCGC)2	GAGATCGTTGGCACCTTTGT	60	50	AAAATCCAATGGTCATCCCA	60	40	233
DAS42	JX317646.1	(GCAT)2	CCTATTGGGTTTCGCTGTGTT	60	50	ATGAATGGTCCAACCCAGAA	60	45	152
DAS43	JX317646.1	(CATT)2	CATTGGATTTTCTGGGTTGG	60	45	CACATGCTTTGCTGCTCATT	60	45	278
DAS44	KF641169.1	(TACTG)2	ATACCTGTAACACCGTCGGG	59	55	AAACAACCCAAAAGTGACCG	59	45	128
DAS45	KF641169.1	(TATTA)2	GCCATTCCTTCAAGTCCAA	60	45	CAAAAAGATGCCAAAACAAAAGA	59	32	163
DAS46	KF641169.1	(TTTTG)2	AGCAGCATTGGCAGCTTTAT	60	45	TTTTTCGAACACAAATCTATCAACA	59	28	260
DAS47	JN632528.1	(AAGTCG)2	CACAATCTTGACGGTGATGG	60	50	TCGAAGGTGGAGCTCTTCTC	59	55	279
DAS48	GQ903902.1	(CACC)2	TACATGAACCACAGCAGC	59	55	AAAATCAGCCAAACGTCAC	60	45	278
DAS49	GQ903902.1	(GGT)3	GTGACGTTTGGGCTGTTTT	60	45	CGTTTGGCATCAGTAGCAGA	60	50	254
DAS50	GQ903902.1	(CCTT)2	GATCAGAGCCATCCCTTTCA	60	50	ACCTTCCTTCCCTTCCACAA	60	50	224
DAS51	GQ903902.1	(GGAAG)2(GGAA)2*	GATCAGAGCCATCCCTTTCA	60	50	ATGGGCTCATCACACATGG	60	53	246
DAS52	GQ903902.1	(TGTA)2	TTGTGGAAGGGAAGGAAGGT	60	50	GGAAAAAGGACAACCTGGCA	60	45	201
DAS53	AY243800.1	(CTTCCT)2	CACGGACGACAAGGACTACA	59	55	TTGGAGGTGGACTTGGAGAC	60	55	168
DAS54	AY243800.1	(CAT)3	GAGGAAGTTGTCCCTCACCA	60	55	TAGACGAGGATGAAGGTGCC	60	55	198
DAS55	AY243800.1	(GCGCT)2(GCTG)2*	CCGCCGTAATTTACAACCAG	60	50	AAAACAGCCACGAATCCATC	59	45	197
DAS56	AY243800.1	(TGC)3	GCGATCCCCTCAAGAGTAG	59	55	AAAGCAGCTCCGAACTTGA	60	45	149
DAS57	AY243800.1	(GGAT)2	GCGATCCCCTCAAGAGTAG	59	55	AAAGCAGCTCCGAACTTGA	60	45	149
DAS58	AB206098.1	(GAAA)2	GCGTCGACATCATCATCACT	59	50	TCCTGGTAGTCCTTGCCATC	60	55	173
DAS59	AB206098.1	(GGAAG)2(GGAA)2*	CAGCACTACCGCAGTCTTGA	60	55	TCCTGGTAGTCCTTGCCATC	60	55	139
DAS60	AB206098.1	(GGT)3	ACATTCCGTCTGTTCTTGGG	60	50	ACAAGGATGAAGGTGCCAAC	60	50	218
DAS61	AB206098.1	(AACA)2	CCTATTGGGTTTCGCTGTGTT	60	50	TGATCCCATCATCATCTCA	59	45	236
DAS62	AB206098.1	(GAT)3	CCTATTGGGTTTCGCTGTGTT	60	50	GGTGGATCATATCCCACAAA	58	45	279
DAS63	NM_001294021.1	(AAACC)2	CCATTTCTCACTCGATCATCC	59	48	GCTCCAGCTTCACATCTTC	60	55	142
DAS64	NM_001294021.1	(AAG)3	CAAAAACCAAAACCTTGCAT	59	40	ATGAACTCAGCAATCCCAGC	60	50	263
DAS65	NM_001294021.1	(CTTCCT)2	GCTGGGATTGCTGAGTTCAT	60	50	AGAACACGGATCTGGTCAGG	60	55	247
DAS66	NM_001294021.1	(CAT)3	TCCAGCTGTGACATTTGGTC	59	50	ATGGTTACCCGCATTAGCTC	60	50	169
DAS67	NM_001294021.1	(CATG)2	TATTTTGGTGCAATTTGGCA	59	35	AATGGGATGGCTCTGATGAC	59	50	190
DAS68	AY663794.1	(TTCCTG)2	GGTCGTTCTACAGAGCTGGC	60	60	TTTCCTTGCCAAAAACAACC	60	40	236
DAS69	AY663794.1	(CATT)2	GGAGTCTTGGAGCAGCAATC	60	55	GCTTGAAGCAGTGGTCACAA	60	50	185
DAS70	AY663794.1	(TGTA)2	GTGATCAGAGCCATCCCATT	59	50	AGCCTGGCCATTACTTTTT	60	45	259
DAS71	GQ411362.1	(GGAA)2	AAGCAACCAGAACCACAAAC	60	50	CTGGTGGAGGCTCCTTGTAG	59	60	163
DAS72	GQ411362.1	(GCAT)2	GGGTTTGCAGTGTCTTGGT	60	50	ATGGTAGAGGGCAGCAAGTG	60	55	174
DAS73	GQ411362.1	(CCATT)2	CACTTGCTGCCCTCTACCAT	60	55	AGCTCCATTGTAGCAACCCA	60	50	197
DAS74	GQ411362.1	(TTAA)2	CACTTGCTGCCCTCTACCAT	60	55	TTTTGCCAAACAAGGACTGA	59	40	253
DAS75	AJ849323.1	(AAG)3	CGAGAAATAAAAGGCAGGGG	60	50	ACAAGAAGGTGGCCATGAAC	60	50	218
DAS76	AJ849323.1	(ACTGC)2	GTGGTCAAGGACCCGACTAA	60	55	CACCACCATTATGCAACTCG	60	50	274
DAS77	AJ849323.1	(AAAC)2	GCTGGTGTGGTGAAGGATT	60	50	TGGCATCAGTTGCAGAGAAG	60	50	160
DAS78	JQ846271.1	(GA)6	ATGGGGACTTCACTGCCTTT	60	50	GCCCTGTAGAAGGACCATGA	60	55	263

DAS79	JQ846271.1	(CAGA)2	ACTCAGAGAGGCCAACCCCTTG	59	55	GCCCTGTAGAAGGACCATGA	60	55	115
DAS80	JQ846271.1	(TTTG)2	GGCACATCAGCTCAGACAGA	60	55	ATGAACTCAGCAATCCCAGC	60	50	113
DAS81	JQ846271.1	(ACTGC)2	TCATGGTCCTTCTACAGGGC	60	55	GACAGCTTCTTGCCAAAAG	60	50	245
DAS82	JQ846271.1	(TGG)3	GAGCTATCTGTGGAGCTGGG	60	60	GTCTCTGGCGTTTCTCTTGG	60	55	188
DAS83	JQ846271.1	(CATG)2	CCAAGAGAAAACGCCAGAGAC	60	55	CACAGCAGCTAGAGCAGCAC	60	60	221
DAS84	JQ846271.1	(TTTTTA)2	TGCTGCTCTAGCTGCTGTGT	60	55	TGCACATTAGGGGAGAGAG	60	55	171
DAS85	GAJT01000001.1	(CCA)3	TCACAGAGAGGCCAACCACTG	60	55	GCCCTGTAGAAGGACCATGA	60	55	115
DAS86	GAJT01000001.1	(ACTGC)2	TCATGGTCCTTCTACAGGGC	60	55	AAGTCACCGCTGGGTTAATG	60	50	220
DAS87	GAJT01000001.1	(GGATG)2	CTTGGTGCAGCCATCATCTA	59	50	CCCTCTTAAGCCCTGCTCTT	60	55	149
DAS88	GAJT01000001.1	(TCA)3	AAGAGCAGGGCTTAAGAGGG	60	55	GAACACCGGGAACAAACAAC	60	50	139
DAS89	GAJT01000001.1	(TTGT)2	AAGAGCAGGGCTTAAGAGGG	60	55	CAAAGGTTGGAAACTGAAGCA	60	43	231
DAS90	XM_002303560.2	(TTTG)2	CCACCTTATCTCTGTTCCCTCTCA	59	48	GCGCCTCTTTGTAATCCTTG	59	50	222
DAS91	XM_002303560.2	(AAAC)2	TTGCTTTGTTTGCTGAGTG	60	45	GCCCTGTAAAAGGACCATGA	59	50	246
DAS92	XM_002303560.2	(ACTGC)2	TGGTACCAGCAAATGTTCCA	60	45	CAGCCCTTGTCAAAGAGAGC	60	55	167
DAS93	XM_002303560.2	(CAT)3	TGCACTGCTGGTATCTCAGG	60	55	CCATCACCCCTTGGTGTATCC	60	55	224
DAS94	XM_002303560.2	(AACTGG)2	CCCATTGGATTTGCAGTCTT	59	45	TGCTCTTGAAAGGAATGGCT	60	45	214
DAS95	XM_002303560.2	(CATG)2	ATTAACCCGGCAAGGAGTCT	60	50	CTGCTCTTGAAAGGAATGGC	60	50	155
DAS96	XM_002303560.2	(AGAGC)2	ATTAACCCGGCAAGGAGTCT	60	50	TGATTCTTGAAAGGGCGAAC	60	45	186
DAS97	XM_002303560.2	(TTCG)2	GCCATTCTTTCAAGAGCAG	60	50	TTTTTGCCAAGTGGAAAGGAC	60	45	250
DAS98	XM_002303560.2	(TGTC)2	ATTTGCTTCATTCCCTCCCT	59	45	ATTCACCGAAAGTGGCTTTG	60	45	134
DAS99	AF131201.1	(CTTCT)2	CGCTGACGACAAGGACTACA	60	55	TTGGAGGTGGACTTGAGAGC	60	55	168
DAS100	AF131201.1	(CAT)3	CACATCAACCCAGCTGTGAC	60	55	ATCACCCCTTGGTGTAGCCAG	60	55	195
DAS101	AF131201.1	(ACTGGC)2	CTGGCTACACCAAGGGTGAT	60	55	AGATCCAATGGTCTGTTCCAG	59	50	264
DAS102	AF131201.1	(GCCGTG)2	CTGGAACGACCATTGGATCT	59	50	AGACATCACAGGAAGACGCC	60	55	169
DAS103	AF131201.1	(T)10	GGCGTCTTCCGTGTGATGTCT	60	55	AAATGAGACGGCAAACCTTG	60	45	219
DAS104	AF131201.1	(TTAAG)2	CTGTACCGAGCTGTGCATGT	59	55	AAATCAAGAAAACCCTGAATCG	59	36	173
DAS105	AB275278.1	(AGG)3	TAAGCAGCTCAGCTCAAGCA	60	50	TACAGGAACAGGAAGGTGGC	60	55	235
DAS106	AB275278	(TTCCTG)2	GCGGACGAGAAGGACTACAA	60	55	GTGCAGTAGACGAGCACGAA	60	55	245
DAS107	AB275278	(CGG)3	CTACATGGTGATGCAGTGCC	60	55	GAAGACGGTGTACACGAGCA	59	55	178
DAS108	AB275278.1	(AGCGC)2	TGCTCGTGACACCGTCTTC	59	55	CACCCAGAAAGATCCAGTGGT	60	55	221
DAS109	AB275278.1	(TGGG)2	ACAAGAAGCAGTCGTGGGAC	60	55	TCGCTCGCTCAAGAACAGTA	59	50	277
DAS110	AB275278.1	(CGGCG)2	ACCACTGGATCTTCTGGGTG	60	55	TCGCTCGCTCAAGAACAGTA	59	50	256
DAS111	KF770828.1	(ACTGC)2	ATTGCTTGGTCTTTGGTGG	60	45	AGAGACAGTTTCTCGCCAA	60	50	119
DAS112	KF770828.1	(TTGG)2	GCCAGAGACTCTCACGTTCC	60	60	CCAACCCAGAAAATCCATTG	60	45	179
DAS113	KF770828.1	(CATT)2	CCTGCTAGGAGTCTTGGTGC	60	60	CCCACAAAGTTGGTTTGGTT	59	45	214
DAS114	KF770828.1	(AAACC)2	GCACCTGCAGCACTTTACCA	60	50	CAACGCACTCACCACTAAT	58	50	250
DAS115	KF770828.1	(TGTA)2	AACCAAACCAACTTTGTGGG	59	45	CTGGGCCAGATTCCAACCTTA	60	50	197
DAS116	KF770828.1	(GCCCA)2	AACCAAACCAACTTTGTGGG	59	45	AAAGTTCACAATTACAACCATA	60	30	232
DAS117	NM_001084598.1	(AG)6	TCCAACCTTGAGTTTCGGTC	60	50	CAATCCCAGCTCTCCAGAAG	59	55	279
DAS118	NM_001084598.1	(ACTGGA)2	AGGTGGAGCCAACACCATAG	60	55	CTCCAAGACTTCTTGCTGGG	60	55	239
DAS119	NM_001084598.1	(CATT)2	CCTATCGGATTCGCTGTGTT	60	50	ACTTGAATGGGATGGCTCTG	60	50	215
DAS120	NM_001084598.1	(CTTT)2	TTTGGGTTGGACCATTCAAT	60	40	CTGGGGCATGTCTTTGTTTT	60	45	231

DAS121	NM_001084598.1	(TCTT)2	CAGAGCCATCCCATTCAAGT	60	50	TGCCTGCTTGAGATAAAACCC	60	50	252
DAS122	AY372191.1	(AAGATG)2	CAAAAGAAACATTCCCACAACA	59	36	TGTTGCAATAAACTCCGCAA	60	40	214
DAS123	AY372191.1	(CCA)3	GAAACAAAAATGGAGGGCAA	59	40	TGTTGCAATAAACTCCGCAA	60	40	189
DAS124	AY372191.1	(TACTG)2	TATTCAGGGTATTGCCTGGG	59	50	CCGAATGTTACTGCTGGGTT	60	50	102
DAS125	AY372191.1	(AAC)2	ACACCGTCTTCTCTGCCACT	59	55	GATCCAGTTGGTCTGTTCCAGT	60	55	206
DAS126	AY372191.1	(TGGG)2	CTGGAACGACCCTGGATCT	60	55	TTGGATTTGAAAGGGATTGC	59	40	102
DAS127	AY372191.1	(TTCA)2	GGTGATTAGGGCAATCCCTT	60	50	GGCTGATGAGACGATCCAAT	60	50	105
DAS128	AY372191.1	(TGT)3	GCAATCCCTTTCAAATCCAA	59	40	CCAATACAAGCCACAACCCT	59	50	251
DAS129	AY372191.1	(TGTAAT)2	TCATTCATGGGTGGATGTTG	60	45	AGTACTTAATATAACCCGGAACGG	57	43	279
DAS130	KF641170.1	(TTCCTC)2	GAGGAGCTCACTTCGTGGTC	60	60	AATTCCGACGGTCTTACACG	60	50	147
DAS131	KF641170.1	(TACTG)2	GAGGAGCTCACTTCGTGGTC	60	60	AGAAAACAGCCCGAAAGTCAC	59	50	254
DAS132	KF641170.1	(TGGG)2	CACCTAGCCACCATTCGGAT	60	50	ACAAAAGGGGAAAACAGCCT	60	45	273
DAS133	KF641170.1	(AAAC)2	AGGCTGTTTTCCCTTTTGT	60	45	GCAGGTAAAAGGAGAGTGGG	60	52	201
DAS134	HQ328777.1	(TTCTTG)2	GCTAAGGACGTGGAAGTTGC	59	55	GCCTTAACCACACCCATCAC	60	55	194
DAS135	HQ328777.1	(TACTG)2	GTGATGGGTGTGGTTAAGGC	60	55	GGACAGTTTCTTGCCAAAA	60	45	171
DAS136	HQ328777.1	(TGGTG)2	GTGACGTTTGGGCTGTTTT	60	45	AAGGTGCCAACAAATTCAGC	60	45	212
DAS137	HQ328777.1	(GGT)3	GCTGGTGTGGTGAAGGATT	60	50	AGTGAACCCAATTGGCAAAG	60	45	219
DAS138	HQ328777.1	(ACAAGG)2	CTTTGCCAATTGGGTTCACT	60	45	TGGTGGTACAGAGCTGCAAG	60	55	187
DAS139	HQ328777.1	(CTTC)2	CTTGCAGCTCTGTACCACCA	60	55	CTTTCCTTCCCTTCCACAAA	59	45	253
DAS140	DQ834695.1	(ACAG)2	GGGGCCAACAAGTTTACAGA	60	50	GAAGCTCACCAGGCTCAAAC	60	55	106
DAS141		(TTCA)2	GGGGCCAACAAGTTTACAGA	60	50	AAAAGCCCAAGCAATACCCT	60	45	252
DAS142		(TCT)4	GCTGCCTTGTACCACCAGAT	60	55	ACCAGCCCCACCTCTATTCT	60	55	169
DAS143	KP164979.1	(ACAG)2	AAAATGGAGGGGAAGGAAGA	59	45	GAAGCTCACCAGGCTCAAAC	60	55	139
DAS144	KP164979.1	(TTCA)2	ACCGATAGGGACATCAGCAC	60	55	AAAAGCCCAAGCAATACCCT	60	45	226
DAS145	KP164979.1	(CTTCCT)2	GTTTGAGCCTGGTGAGCTTC	60	55	AAAAGCCCAAGCAATACCCT	60	45	166
DAS146	KP164979.1	(ACTGC)2	AGGGTATTGCTTGGGCTTTT	60	45	TAGTGATGTCCCTGGAACCC	59	55	211
DAS147	KP164979.1	(TCT)4	GCTGCCTTGTACCACCAGAT	60	55	AACCACCCCCACCTCTATTC	60	55	170
DAS148	EF470293.1	(GAAA)2	TTAGGTTGGGTTGCACCTGA	59	45	GCTGGTGGCTCCTTGTAGTC	59	60	174
DAS149	EF470293.1	(GAA)3	GGTTGCACTTGAGGGAAAAGA	60	50	GCTGGTGGCTCCTTGTAGTC	59	60	166
DAS150	EF470293.1	(TGGTG)2	CCTGCTGTGACCTTTGGATT	60	50	CATGGGAGTCTCTGGCATT	60	50	280
DAS151	AJ849322.1	(AAAC)2	CGAGGTGCTCTCCTACTTCC	59	60	GCGCTCTTTGTAGTCCTTG	60	55	176
DAS152	AJ849322.1	(TTTG)2	AATGGAGGGCAAAGAAGAGG	60	50	GCCCTGTAAAAGGACCATGA	59	50	159
DAS153	AJ849322.1	(ACTGC)2	TGGTACCAGCAAATGTTCCA	60	45	ACATTAGCTCCACCACCTG	60	55	273
DAS154	AJ849322.1	(AACTGG)2	ATGTCCTATTTTGGCTCCC	60	50	TGCTCTTGAAAGGAATGGCT	60	45	237
DAS155	AJ849322.1	(CATG)2	ATTAACCCGGCAAGGAGTCT	60	50	CTGCTCTTGAAAGGAATGGC	60	50	155
DAS156	AJ849322.1	(TTCG)2	ATTAACCCGGCAAGGAGTCT	60	50	TCACATGACAGATAGAGAAGCCA	59	43	252
DAS157	AJ849322.1	(TTTG)2	ATTAACCCGGCAAGGAGTCT	60	50	AACACCACAATACCAAATTCACA	59	35	270
DAS158	JQ846272.1	(ACAG)2	GGAGGGGAAAAGAAGAGGATG	60	55	CCATGACAGTGAGGATGGTG	60	55	218
DAS159	JQ846272.1	(ACTGC)2	TGAGCTCCACTCCTGGTCTT	60	55	TCACTGCTGGGTTTATGTGC	59	50	224
DAS160	JQ846272.1	(TGG)3	TGCACTGCTGGTATCTCAGG	60	55	TCCAATGATCTCAGCACCAA	60	45	243
DAS161	JQ846272.1	(TGGG)2	CTCCCAATTGGATTTGCAGT	59	45	ACTTGAATGGGATGGCTCTG	60	50	214
DAS162	JQ846272.1	(GTGTT)2	CAGAGCCATCCCATTCAAGT	60	50	TGCCACTGTTACACAAAGC	59	50	183
DAS163	XM_002315135.2	(TTTC)2	CCCTCAACAGAGACCAAACG	60	55	TGACCATGAAGTCAGTTCGC	59	50	259

DAS164	XM_002315135.2	(ACTGC)2	CACCGTTTTGACTGTGATGG	60	50	TGCCAAAAATAGCCCAAAG	60	40	172
DAS165	XM_002315135.2	(ACAAGG)2	TCCCTATTTGGCACCTTTG	59	45	AACGGCCAAATGTAAAGCAC	60	45	270
DAS166	XM_002315135.2	(ATTATG)2	AGCACTCGCAGCTCTTTACC	59	55	AAATGCACAAAAGGCCAAAC	60	40	165
DAS167	XM_002315135.2	(TAAG)2	GTGCTTTACATTTGGCCGTT	60	45	TGCAATTTGGGATAAAAAGCC	59	40	170
DAS168	AB009308.2	(GCG)3	ACACCCACACCCATCTTCTC	59	55	TGTAGTCTTCTCGTCGGCT	60	55	160
DAS169	AB009308.2	(CTTCCT)2	AGCCGACGAGAAGGACTACA	60	55	GTGCAGTAGACGAGCACGAA	60	55	246
DAS170	AB009308.2	(CGG)3	CTACATCGTGATGCAGTGCC	60	55	GGGGACGTGGGAGTCTCT	60	67	223
DAS171	AB009308.2	(AGCGC)2	GTGTACACCGTCTTCTCCGC	60	60	CACCCAGAAGATCCAGTGGT	60	55	216
DAS172	AB009308.2	(TGGG)2	TCTACAACAAGAAGCAGGCG	59	50	ACTGATTGGTCCACTAGCCG	60	55	141
DAS173	AB009308.2	(CGGCG)2	ACCACTGGATCTTCTGGGTG	60	55	GGAGAGACGGCAGATTTGAG	60	55	255
DAS174	AB009308.2	(TCAG)2	CAAATCTGCCGTCTCTCCTC	60	55	CGATCGTCGTCCCTTCTTTA	60	50	189
DAS175	AB009308.2	(ATT)3	CAAATCTGCCGTCTCTCCTC	60	55	AATTCGATCGTCGTCCCTT	59	47	193
DAS176	EF364434.1	(GGAA)2	TTGAGTGGTGCTGAGTTGC	60	50	CAAGGGTGCTGGTGGTAGAT	60	55	168
DAS177	EF364434.1	(CACC)2	ATCTACCACCAGCACCTTG	60	55	CTGGGTTGATGTGTCTCTCT	60	55	249
DAS178	EF364434.1	(CCAG)2	GGGTTTGCAGTGTTCTTGGT	60	50	AACAGAGAAAGGCGATGGAA	59	45	239
DAS179	EF364434.1	(TAT)4	TTGAGACTTCCATCGCCTTT	59	45	TTCAAAGGGGGTCCAACATA	60	45	144
DAS180	EF364434.1	(TGAA)2	TTGAGACTTCCATCGCCTTT	59	45	GGGCAGGGAAGGATAAAAAGA	60	50	172
DAS181	NM_001305756.1	(TGATGG)2	ATGGTCTGTTTTACAGAGCCG	60	50	GGTCACTGCCGGATTAATGT	59	50	214
DAS182	NM_001305756.1	(AATGC)2	CATTAATCCGGCAGTGACCT	60	50	GCTTCTGCACGTAGGAGGAC	60	60	149
DAS183	NM_001305756.1	(ATC)3	ACGTCCCTATTTTGGCTCCT	60	50	CTCTGGCCTTGAATGGAATG	60	50	240
DAS184	NM_001305756.1	(CCATT)2	ACGTCCCTATTTTGGCTCCT	60	50	TCTGACCTTCAAGCTCTGGC	60	55	253
DAS185	NM_001305756.1	(TTTC)2	GTTGGAGCTACTTTGGCTGC	60	55	CACACAAAACCCATCTCAGTCTC	59	50	266
DAS186	NM_100044.4	(TTCT)2	TTCTCTCTCTCTCGCCTCT	57	52,4	CGGCTCTGTAGAAGGACCAC	59	60	276
DAS187	NM_100044.4	(TAGA)2	TCAGCCACTCTCATTACCCA	59	50	CGATTCCGGCTCTGTAGAAG	60	55	239
DAS188	NM_100044.4	(CCA)3	GGATGTTTCGAGTGGGAGCTA	60	55	CGATTCCGGCTCTGTAGAAG	60	55	149
DAS189	NM_100044.4	(TACTG)2	CTTCTACAGAGCCGGAATCG	60	55	CAATGACAGCTTACGAGCCA	60	50	241
DAS190	NM_100044.4	(CATT)2	ACCGGAACAGGAATTAACCC	60	50	GTGGTAAAGAGCCGCAAGAG	60	55	132
DAS191	NM_100044.4	(CCATT)2	CTCTTGC GGCTTTTACCAC	60	55	AAACCAGATCATCCACAGCA	59	45	202
DAS192	NM_100044.4	(TGAT)2	TTTGCTGTGGATGATCTGGT	59	45	CCGAACCAAACAGAAAGAAA	60	45	145
DAS193	NM_100044.4	(TGGTT)2	TTTGCTGTGGATGATCTGGT	59	45	GAGAAAACCAAGCCGAAACAA	60	45	187
DAS194	DQ855475.1	(CTTTT)2	TCCAAGACGATGGAAAGGAC	60	50	ATTCCAGCGGTGCAGTAAAC	60	50	253
DAS195	DQ855475.1	(CACTGG)2	TTCTATTTTGGCACCTTG	59	45	AATCCAGTGATCATCCCAGC	59	50	152
DAS196	DQ855475.1	(GA)8	GCTTCAAGAAACCACCGAGA	60	50	GTAGTCCTTGTCGTCTGCC	59	60	199
DAS197	DQ855475.1	(GCCGGG)2(GAC)3	GCTTCAAGAAACCACCGAGA	60	50	GCGGTAGAAGGACCAGGACT	60	60	262
DAS198	DQ855475.1	(CTTCCT)2	GGGACGACGACAAGGACTAC	59	60	TTGGAGGTGGACTTGGAGAC	60	55	169
DAS199	DQ855475.1	(CATG)2	AGCGACCATTGGATCTTCTG	60	50	CAGACAAGACACTCCCCACA	59	55	180
DAS200	DQ855475.1	(TGTCT)2	AGCGACCATTGGATCTTCTG	60	50	TGAAGGGAAAGGAAGATGGA	59	45	226
DAS201	DQ855475.1	(TGTT)2	TCTTCCTGTGGGGAGTGTCT	59	55	ACGATCCCAACGCATAAAAG	60	45	212
DAS202	XM_002526821.1	(AAG)3	ACTAGCTTGCCTATGGAGG	59	55	GTGGAGCATTTAGTGGGTGC	60	55	270
DAS203	XM_002526821.1	(TTCTTG)2	GGCGAGTTGACTTCATGGTC	60	55	CAAGAGCAAAGATCATGCCA	59	45	178
DAS204	XM_002526821.1	(TACTG)2	TGGCATGATCTTTGCTCTTG	59	45	GCACCAAGACCATCACCTTT	60	50	258
DAS205	XM_002526821.1	(GAT)3	GGTGCAGCAATCATCTTCAA	59	45	CATCAAACGGTTCACACATGG	60	50	172
DAS206	KP164980.1	(CACC)2	ATCTACCACCAGCACCTTG	60	55	CTGGGTTGATGTGTCTCTCT	60	55	249

DAS207	KP164980.1	(CCAG)2	GGGTTTGCAGTGTTCTTGGT	60	50	TGGAAGTCTCAGGCTCTGGT	60	55	224
DAS208	KP164980.1	(TAT)4	ACCAGAGCCTGAGACTTCCA	60	55	GGGCAGGGAAGGATAAAAAGA	60	50	183
DAS209	XM_002446884.1	(TGC)3	TCTGCTTCCAGAACCACCTC	60	55	TGTAGTCCTTGTCTGTCGGTG	59	55	274
DAS210	XM_002446884.1	(GCACC)2	ACCATTGCTGCTGCTCACTA	59	50	TGTAGTCCTTGTCTGTCGGTG	59	55	248
DAS211	XM_002446884.1	(CTTCCT)2	CACCGACGACAAGGACTACA	59	55	GTAGACGAGGGCGAAGATCA	60	55	235
DAS212	XM_002446884.1	(CAT)3	ACATCTCCATCCTCACCGTC	59	55	GTACAGCCCCTGCTGGAAC	60	63	278
DAS213	XM_002446884.1	(CGG)3	GGGCGGTCTTCTACATCATC	59	55	GTAGACGAGGACGAAGGTGC	59	60	179
DAS214	XM_002446884.1	(TGAAA)2	CGTTCCTCTTTCAAGTTCGC	60	50	TCGACTATCTCATCATCACTTCAA	58	38	142
DAS215	XM_002309090.1	(GGAG)2(AGA)3*	CAAGAGGCAAGTGAGACCAA	59	50	ACCATGATAACCACTCCCCA	60	50	207
DAS216	XM_002309090.1	(GGCA)2	TGTGAAGGTGGGTGCAAATA	60	45	AAAAGCCCAAGCAATACCCT	60	45	268
DAS217	XM_002309090.1	(TCCTG)2	ACACCGTCTTCTCTGCCACT	59	55	TTCTGGCTGGGTAAATACCG	60	50	147
DAS218	XM_002309090.1	(CCAG)2	ACTCCCATGTTCTCTGTCCCTG	60	55	TTTGGATTTGAAAGGGATGG	59	40	245
DAS219	AB275279.1	(AGG)3	AAGCCAGGCCAAGCAAAG	61	56	AGAAGGACCAGGAGGAGAGC	60	60	202
DAS220	AB275279.1	(GGC)3	ATGGAGGGCAAGGAGGAG	60	61	AGAAGGACCAGGAGGAGAGC	60	60	163
DAS221	AB275279.1	(CTTCCT)2	AGCTCTCCTCCTGGTCTTTC	60	60	GTGCAGTAGACGAGCACGAA	60	55	190
DAS222	AB275279.1	(CGG)3	CTACATCGTGATGCAGTGCC	60	55	GTTGCGGAGAAGACGGTGTA	61	55	186
DAS223	AB275279.1	(AGCGC)2	GTGTACACCGTCTTCTCCGC	60	60	CACCCAGAAGATCCAGTGGT	60	55	216
DAS224	AB275279.1	(TGGG)2	TCTACAACAAGAAGCAGGCG	59	50	AAGACTCCATCCACAGTCGG	60	55	164
DAS225	AB275279.1	(CGGCG)2	ACCACTGGATCTTCTGGGTG	60	55	AAGACTCCATCCACAGTCGG	60	55	137
DAS226	AB275279.1	(AATC)2	ACCATTGGATCTTCTGGGTG	60	55	CAAAAACCGTGAACGGAAAG	60	45	232
DAS227	EF364435.1	(ACAG)2	GGGGCCAACAAGTTTACAGA	60	50	GAAGCTCACCAGGCTCAAAC	60	55	106
DAS228	EF364435.1	(TTCA)2	GGGGCCAACAAGTTTACAGA	60	50	AAAAGCCCAAGCAATACCCT	60	45	252
DAS229	EF364435.1	(CTTCCT)2	GTTTGAGCCTGGTGAGCTTC	60	55	AAAAGCCCAAGCAATACCCT	60	45	166
DAS230	EF364435.1	(ACTGC)2	AGGGTATTGCTTGGGCTTTT	60	45	TACTGATGTCCCTGGAACCC	59	55	211
DAS231	EF364435.1	(TCT)4	GCTGCCTTGTACCACCAGAT	60	55	ACCAGCCCCACCTCTATTCT	60	55	169
DAS232	HM641265.1	(GAGCT)2	TACAAAGAGCCACCTCCTGC	60	55	CAAGAGCAAAGATCATGCCA	59	45	214
DAS233	HM641265.1	(TACTG)2	TGGCATGATCTTTGCTCTTG	59	45	TAGAACACAGCACGGGTCAG	59	55	120
DAS234	HM641265.1	(AACCGG)2	GCTACAGCAAAGGTTCTGGC	60	55	AATATCCAATGGTCTGTCCTCA	60	45	262
DAS235	HM641265.1	(CATT)2	CCCTATCGGATTTGCAGTGT	60	50	AAGGAATTGCTCTGATGACCA	59	43	206
DAS236	FJ646594.1	(ACTGC)2	TGTTTGAGCCCAGTGAGTTG	59	50	GCCCTTGTCAACGACAATTT	60	45	280
DAS237	FJ646594.1	(GGAA)2	GGTGACATTTGGGCTGTTCT	60	50	GAGTTAGCTCCACCACCCAA	60	55	156
DAS238	FJ646594.1	(ACAAGG)2	GCTGAAATTGTTGGCACCTT	60	45	CTGCTAGTGCTGCTCCAATG	59	55	271
DAS239	FJ646594.1	(CATT)2	TTTCAACAAGGACAAGGGC	60	45	TGAAAGGAATGGCCCTGATA	60	45	114
DAS240	FJ646594.1	(GTT)3	CACTTAGCCACCATCCCAAT	59	50	GACTTGAAAGGAATGGCCC	59	53	185
DAS241	NM_202760.2	(AGAA)2	TCGACCACACACTTGGTAGC	59	55	GACTGAGCCGATGTACCGAT	60	55	175
DAS242	NM_202760.2	(AGCTC)2	ATCGGTACATCGGCTCAGTC	60	55	CAAGAGCAAAGATCATGCCA	59	45	247
DAS243	NM_202760.2	(TACTG)2	AAGGTATCGCTTGGGCTTTT	60	45	ACTTCCGAGCCAAGAACAGA	60	50	117
DAS244	NM_202760.2	(GGT)3	GGAGTCGTCAAAGGTTTCCA	60	50	AATAAAAACCGGGGAAATTCG	60	40	267
DAS245	NM_202760.2	(CATT)2	TGGGATGACCATTGGATTTT	60	40	TCTGGACCGTGGAATCTTTC	60	50	137
DAS246	NM_202760.2	(TATC)2	GAAAGATTCCACGGTCCAGA	60	50	ACTTCAGAGACCCCTTGCCA	59	50	202
DAS247	NM_001305690.1	(TACTG)2	ATACCTGTAACACCGTCCGG	59	55	AAACAACCCAAAAGTGACCG	59	45	128
DAS248	NM_001305690.1	(TATTA)2	GCCATTCTTTCAAGTCCAA	60	45	CAAAAGATGCCAAAACAAAAGA	59	32	163
DAS249	NM_001305690.1	(TTTTG)2	AGCAGCATTGGCAGCTTTAT	60	45	TTTTTCGAACACAAATCTATCAACA	59	28	260

DAS250	NM_001293985.1	(CAAGTC)2	CACAATCTTGACGGTGATGG	60	50	ATGTAGAACAACGCCCTGGT	59	50	207
DAS251	NM_001293985.1	(CCAG)2	GAGATCATCGGCACCTTTGT	60	50	GAACGGTCCAACCCAGAATA	59	50	249
DAS252	NM_001293985.1	(AGCA)2	GCAGCACTTGACGCTTTGTA	60	50	GCCCCTTGATTCTTGAGACA	60	50	266
DAS253	JQ768372.1	(TCCTCT)2	GCACCCTCATCGACTATGC	59	55	AGGATGAAGATCATGCCACC	59	50	194
DAS254	JQ768372.1	(ACTGGT)2	GGTGGTGGTGCTAACCTTGT	59	55	GCAGCACAAAACCTCCTAGC	60	55	245
DAS255	JQ768372.1	(AGC)4	GCTAGGAGTTTTGGTGCTGC	60	55	TCTCTAGTTGGTGGGGTTGC	60	55	180
DAS256	JQ768372.1	(AAAAC)2	GGTCCATTTGTTGGAGCACT	60	50	TCATCATCATCCACATCCTCTC	59	45	233
DAS257	JQ768372.1	(GAT)3	GCAACCCCACTACTAGAGA	60	55	CAGTTCCAAAGCTACCAACAAA	59	41	212
DAS258	AY189973.1	(CATT)2	CAATGGATTTTCTGGGTTGG	60	45	TGGGACATTAGGGCACATT	60	45	279
DAS259	AY189973.1	(GGCTAA)2	AAATGTGCCCTAATGTCCCA	60	45	TGCACGAATGGACAGAGGTA	60	50	156
DAS260	GAJT01000002.1	(ACTGC)2	AATGGTCATTCCACAGAGCC	59	50	GAGCAGTGAACCTTCTCTCG	60	55	269
DAS261	GAJT01000002.1	(GTGTAC)2	TGGGATGACCATTGGATTTT	60	40	AAGTGGCCCTCTCCAATTTT	59	45	226
DAS262	AJ849324.1	(TCT)2	GGGCATACTCGTGGAAGA	60	50	AAAGCCCATCAATACCAAG	60	45	212
DAS263	AJ849324.1	(TGG)3	TAATCAGGGCTGTGGGCTAC	60	55	ACAGCAAACCCAATTGGAAG	60	45	271
DAS264	AJ849324.1	(GCACAG)2	GGTGCTAACACAGTGGCTCA	59	55	ACAGCAAACCCAATTGGAAG	60	45	167
DAS265	AJ849324.1	(TACTGG)2	CTTCCAATTGGGTTTGCTGT	60	45	AATGGCTCTGCTCTCAAAA	60	45	210
DAS266	AJ849324.1	(ACCC)2	CGAGCATGTCTGACCAAGAA	60	50	AACGCGATAGCCATACCAAC	60	50	172
DAS267	AJ849324.1	(TCTT)2	ACCTCCAGCACCCTTTTTG	60	50	AAAGCCCATGCAATACCAAG	60	45	180
DAS268	AJ849324.1	(TGG)3	TAATCAGGGCTGTGGGCTAC	60	55	ACAGCAAACCCAATTGGAAG	60	45	271
DAS269	AJ849324.1	(TCA)3	CTTCCAATTGGGTTTGCTGT	60	45	CATTTAATTTGTGGGGTGGC	60	45	252
DAS270	AB058678.1	(GCG)3	GCTACAAATCCCAGAGCGAG	60	55	AAGGCCTTCAACCAACCTAC	60	55	244
DAS271	AB058678.1	(TTAA)3	CAAAGCTTGGGATGACCAAT	59	45	ACAGTTCCACAGCCCTTCAA	60	50	261
DAS272	AB058678.1	(CTTTG)2	GAAATTTGAAGGGCTGTGGA	60	45	TCATTAGCTTTCTCTGGCATCA	60	41	211
DAS273	AB219366.1	(AAAAG)2	ATCTGCAGAATTCGCCCTTA	59	45	CCGAGTAGTCTTGTCTGGAG	60	60	161
DAS274	AB219366.1	(CACCG)2	CACCTTCGTGCTCGTCTACA	60	55	AAGATCCATTGGTTCATCCCA	60	45	222
DAS275	AB219366.1	(TGGG)2	CTGGGATGACCAATGGATCT	59	50	CAGATGATGCGAAGACTGGA	59	50	263
DAS276	AB219366.1	(GCC)3	ACCAATGGATCTTCTGGGTG	59	50	CAGATGATGCGAAGACTGGA	59	50	255
DAS277	AB219366.1	(TTGC)2	TCCAGTCTTCGCATCATCTG	59	50	TCGGATCCACTAGTAACGGC	60	55	192
DAS278	JF834203.1	(GTTGG)2	GGCATGATCTTCGTCTTGT	60	50	ATGATCTCAGCACCCAAACC	59	50	263
DAS279	JF834203.1	(TTAA)2	GGAGTTTTGGAGCTGCTGTC	60	55	CGTCTGAAAACCATGGATCA	59	45	208
DAS280	JF834203.1	(TGG)3	GGCATGATTTTCGTCTTGT	59	45	ATGATCTCAGCACCCAAACC	59	50	263
DAS281	AY823263.1	(CCG)3	TCTCCGCCAAGGACTATCAT	59	50	GTAAAGGAAGAGCAGCGTGG	60	55	122
DAS282	AY823263.1	(GAGCTG)2	CGTGTTTCATGGTTCCTTGG	60	50	CCCCAAAAACAGTGGGAAGAA	59	45	274
DAS283	AF062393.1	(GCG)3	GGAAGGACGAGGTGATGGA	61	58	GATGTACAGGAACAGCAGCG	59	55	167
DAS284	AF062393.1	(CCG)3	GAAGGACGAGGTGATGGAGA	60	55	GATGTACAGGAACAGCAGCG	59	55	166
DAS285	AF062393.1	(GACG)2	GCTGTTCTGTACATCACCG	59	55	GGTGCAGTAGACCAGGATGAA	60	52	154
DAS286	AF062393.1	(GCG)3(GGCCGTG)2*	GGTACAAGCACAGACGGAC	60	60	TGAAGTAGGCGTTTGGGAAC	60	50	279
DAS287	AF062393.1	(CACCG)2	GACTCACATGTCCCAGTCTT	60	55	CCCAGAAGATCCAATGGTTG	60	50	169
DAS288	AF062393.1	(CTC)3	TGGTCGTTTTTGTTCAGCA	60	40	TTTTTCAATTACGGCGAACC	59	40	215
DAS289	AF062393.1	(ATCA)2	CTCCTGCTTGTCTGTGTGT	59	55	TTTTTCAATTACGGCGAACC	59	40	185
DAS290	FJ607305.1	(TGGTGT)2	GGGCAAAGATGTTGAGGTTT	59	50	CATACCTCCAAAAGCCCAAG	59	50	274
DAS291	NM_001035774.1	(AAG)4	CCACTCCAACAGAGAAGCAA	59	50	CGATGACTGTCAAAAACGGTG	60	50	242
DAS292	NM_001035774.1	(ACCGGA)2	ACTGACCCCAAACGTAGTGC	60	55	ATGAATGGTCCAACCCAAAA	60	40	206

DAS293	NM_001035774.1	(CATT)2	TGCCGTGTTTCATGGTACATT	59	45	TGTTTAGACGTTGGCAGCAC	59	50	238
DAS294	NM_001035774.1	(TTTC)2	GCTGCCAACGTCTAAACACA	59	50	GGAAACTCTTTGATTTTCATTGATTA	57	28	220
DAS295	KF641172.1	(GAGCAG)2	AGCTGCCATAGCTGCAATTT	60	45	AAAAGCACGAAAGCGAAAGA	60	40	237
DAS296	KF641172.1	(CTTTTCG)2	GAGCAGCCAAAGCTCTAGGA	59	55	CTTTATAAACATCATGAAAGATCTC G	57	31	239
DAS297	AY494191.1	(TTAC)2	GGACTACAGAAGTGCCCGAA	60	55	CTCCCAGGCACTGAGCTATC	60	60	274
DAS298	AY494191.1	(TACA)2	CGAAAAATTTTCGCTACCTCG	59	45	GTGCGGTGCATTAATCCTT	60	45	274
DAS299	AY494191.1	(GGA)3	GATAGCTCAGTGCCTGGGAG	60	60	GTGCGGTGCATTAATCCTT	60	45	239
DAS300	AY494191.1	(GGTC)2	ATCTACAATCGCAGCAAGCC	60	50	GTAAGTAGCCGCCAAAGCTG	60	55	258
DAS301	AY494191.1	(ATTGGA)2	CAGCTTTGGCGGCTAGTTAC	60	55	TCATGCCCTCATCCATATCA	59	45	194
DAS302	AY494191.1	(TCCC)2	TGATATGGATGAGGGCATGA	59	45	TCCAAGACAAGCCACAACAC	59	50	175
DAS303	AY243801.1	(GGC)3	AAGGACGACGTGATCGAGAG	60	55	GATGTACAGGAACAGCAGCG	59	55	165
DAS304	AY243801.1	(GACG)2(GCGTCG)2*	AAGGACTACACGGACCCCTCC	60	60	GACGAGGACGAAGATCATGC	60	55	246
DAS305	AY243801.1	(CGG)3	CTCTACATCGTGGCGCAGT	60	58	TGTAGACGAGCACGAAGGTG	60	55	172
DAS306	AY243801.1	(TCGC)2	CCTACTTCGACAGGTACGGC	59	60	TGTAGACGAGCACGAAGGTG	60	55	105
DAS307	AY243801.1	(CTCCC)2	CACCTTCGTGCTCGTCTACA	60	55	CACCCAGAAGATCCAGTGGT	60	55	229
DAS308	AY243801.1	(TGGG)2	CTACAACAAGGACAAGCCCTG	59	52	CCAAGTTCGATCGATGAATGA	59	45	236
DAS309	AY243801.1	(GGCG)2	ACCACTGGATCTTCTGGGTG	60	55	CCAAGTTCGATCGATGAATGA	59	45	210
DAS310	AY243801.1	(TCAT)2	CTACCACCAGTACATCCTCCG	59	57	AACCAAAACCAATCTCACGC	60	45	239
DAS311	AY243801.1	(TGGT)2	TCATTCATCGATCGACTTGG	59	45	ACCATAAGAGCAGAGCGGAA	60	50	165
DAS312	FJ851079.1	(CCAAG)2	TTGAAGTTGGAGGACAAGGC	60	50	GGTCGGTTTGGCTCTTGTA	60	50	192
DAS313	FJ851079.1	(GTG)3	TTACAAGAGCCAAACCGACC	60	50	AGAGACACTTTCTCGCCAA	60	50	183
DAS314	FJ851079.1	(ATGTGG)2	TGCACTGCTGGTATCTCAGG	60	55	ATGATCTCAGCACCCAATCC	59	50	239
DAS315	FJ851079.1	(CACTGG)2	GGATTGGGTGCTGAGATCAT	59	50	AAAATCCATTGGTTCATCCCA	60	40	245
DAS316	FJ851079.1	(AGAAA)2	TGGGATGACCAATGGATTTT	60	40	AAAACCATGAACCCAAGCAC	59	45	259
DAS317	FJ851079.1	(ATG)3	GTGCTTGGGTTTCATGGTTT	59	45	GACACAAGGCACTTTGCTCA	60	50	122
DAS318	AY995195.1	(AGAC)2	CTTGTTTCGACCCTGAAGAGC	60	55	AAGTCACAGCCGGTTTATG	60	50	260
DAS319	AY995195.1	(ACTGG)2	GTGTCGTTGATAAGGGCGTT	60	50	ATCTCAGCACCCAAAGCAGT	59	50	167
DAS320	AY995195.1	(TTAA)2	GGCAGCATTCTACCACCAAT	60	50	CGTGGAAACACCATAGCCTT	60	50	144
DAS321	AY995195.1	(AAT)3	AAGGCTATGGTGTTCACG	60	50	GTTTTGGCCTTATCCTGCAA	60	45	130
DAS322	AY995195.1	(ATC)5	TTGCAGGATAAGGCCAAAAC	60	45	AGAGAAGCCAGGAACCTTAATGA	57	41	234
DAS323	EU572717.1	(CCA)3	AAGGAAGTGAGCGAGGAACC	60	55	AGGACAAAGATCATGCCACC	59	50	257
DAS324	EU572717.1	(TCCTCT)2	CGCTGGTCCCTTACAGAGC	60	60	AGGACAAAGATCATGCCACC	59	50	164
DAS325	EU572717.1	(CGG)3	GGTGGCATGATCTTTGTCT	59	50	CTTGCTGTAGCCCACACTCA	60	55	240
DAS326	EU572717.1	(TGTT)2	TGAGTGTGGGCTACAGCAAG	60	55	AAGATCCATTGGTTCATCCCA	60	45	271
DAS327	EU572717.1	(GATG)2	AGGAAATCAAGATCTCCGCA	59	45	ATGCACAACCACTGGCTACA	60	50	164
DAS328	AB206099.1	(ACTG)2	AGTGGGCGTTTTATAGGGCT	60	50	CAGTGATACCTTCCTCCCA	59	55	272
DAS329	AB206099.1	(TGG)3	TGGGGAGGAAGGTATCACTG	59	55	AGGAACATGGGAGTCACGAG	60	55	256
DAS330	AB206099.1	(CACCGG)2	TCTTCCTATTGGATTTGCCG	60	45	CCCAAGCCTTGCTACCATTA	60	50	122
DAS331	AB206099.1	(GCTA)2(GTCT)2	ATTCTGAGAGCTGCTGCCAT	60	50	TGCCCAAACATTAAGGAGC	60	45	205
DAS332	AB206099.1	(CATC)2	GCTCCTTAATGTTTGGGCA	60	45	CAAAAATACACCTTGGACTCA	57	43	174
DAS333	DQ341104.1	(CCG)3	ATGTCGAAGGACGTTGAGGT	59	50	GGTCGTCTGGCTCTTGTAGC	60	60	201
DAS334	DQ341104.1	(TCCTCT)2	CAGTCATCGCCGAGTTCATA	59	50	CGTACCATGTACAACACCG	60	55	263

DAS335	DQ341104.1	(GCG)3	GCTACAAGAGCCAGACGACC	60	60	CGCTACCATGTACAACACCG	60	55	200
DAS336	DQ341104.1	(GCTCC)2	CGGTGTTGTACATGGTAGCG	60	55	AGGTGAACCATGAATACGGC	59	50	277
DAS337	DQ341104.1	(TTGT)2	GGGTGCCTTTTGTGATCTGT	60	50	GGAAATTGGATGATGATGGC	60	45	100
DAS338	DQ341104.1	(CAT)3	GGGTGCCTTTTGTGATCTGT	60	50	CGCAGAAAAATAGAGTGGGAAA	59	43	128
DAS339	KP164981.1	(CCG)3	GACCAAGGACGTTGAGGTTG	60	55	GTAAAGGAAGAGCAGCGTGG	60	55	157
DAS340	KP164981.1	(ACTGC)2	ATTGCTTGGTCTTTTGGTGG	60	45	AGCAGATTGGAAGGCTTTGA	60	45	201
DAS341	KP164981.1	(GAGCTG)2	CGTGTTTCATGGTTCACTTGG	60	50	AGTGGTGCTCCTGAATGACC	60	55	223
DAS342	JQ364746.1	(GCG)3	TGATTGGGTACAAGCACCAG	59	50	CGGCAGTGCAGTAAACAAGA	60	50	123
DAS343	JQ364746.1	(ACTGC)2	GCTTTTGGTGGCATGATTTT	59	40	CCACCATGTTAGCTCCACCT	60	55	229
DAS344	JQ364746.1	(GTTGG)2	TGTCACTGCCAAGAGCATT	60	50	CCACCATGTTAGCTCCACCT	60	55	126
DAS345	GQ411363.1	(TGG)3	TGTGGTGTAGGGTGGTGAA	59	50	AGGGTTGATACCAGTGCCAG	60	55	276
DAS346	GQ411363.1	(AGATGG)2	GACCACGGATGTTCTGGCT	60	55	TTACTACAATTGGCCCCCA	60	45	278
DAS347	JQ846268.1	(CTT)3	GGACACAAAACCACAGACAAA	60	50	CTCTCCTCGCTCTGCAACTT	59	55	133
DAS348	JQ846268.1	(ACTGG)2	GTGAAGGCGTTCCAGAAGTC	59	55	ACAGCAAATCCAATGGGAAG	59	45	209
DAS349	JQ846268.1	(ACTGGT)2	CTTCCCATTGGATTTGCTGT	59	45	TTTGGTTGAAGATCACTGCG	59	45	109
DAS350	JQ846268.1	(ATTC)2	CGCAGTGATCTTCAACCAAA	59	45	GGACCCTCAGACAGACTTGC	59	60	249
DAS351	JQ846268.1	(GTCT)2	CTTTTGTGGAGCTGCCATT	60	45	GTCCTGTCCCACAGACACG	60	63	257
DAS352	JQ846268.1	(GGACA)2	GAGGGTCCCTTTAGCAATCC	59	55	GCTTTTGGGAGGAAACAACA	60	45	231
DAS353	AY189974.1	(ATCA)2	CCCTCAACCTTTCTGCATTT	59	45	AAGAACAAAAGCGTGGCAAT	59	40	272
DAS354	AY189974.1	(TCTG)2	ATATGTGCCCCCTGCTCAC	60	55	CCATAACATCAGGGTAGACAG	59	50	225
DAS355	GAJT01000003.1	(TCAAA)2	CCCCTTCCCCTTCTCTCT	61	60	TACCTTCTGGTTTGGGTGCC	60	50	128
DAS356	GAJT01000003.1	(AGGA)2	ACCAACAAAACGCATCAACA	60	40	GCACGGTAGAAGGACCAGAG	59	60	183
DAS357	GAJT01000003.1	(ACTGC)2	CTCTGGTCCTTCTACCGTGC	59	60	AGGAACAGCCCAAATGTCAC	60	50	236
DAS358	GAJT01000003.1	(GTTGG)2	GTGACATTTGGGCTGTTCT	60	50	ATCTCAGCACCCAAAGCAGT	59	50	197
DAS359	GAJT01000003.1	(GCA)4	CGTGTTTCATGGTTCACTTGG	60	50	TTAGTTTGTGGGGTTGCTCC	60	50	232
DAS360	GAJT01000003.1	(ACTGC)2	CTCTGGTCCTTCTACCGTGC	59	60	AGGAACAGCCCAAATGTCAC	60	50	236
DAS361	GAJT01000003.1	(GTTGG)2	GTGACATTTGGGCTGTTCT	60	50	ATCTCAGCACCCAAAGCAGT	59	50	197
DAS362	GAJT01000003.1	(A)10	GGAGCAACCCCAAACTAA	60	50	CACAAAACGGAAAACAAGCA	59	40	126
DAS363	GAJT01000003.1	(TAGA)3	GGAGCAACCCCAAACTAA	60	50	AAAGAAAAGATGGGATGGTTCA	59	36	183
DAS364	XM_002306151.2	(AGTG)2	CACCTTAGGCCACTCACACA	59	55	GCAGGTGGTGGATCAACATA	59	50	152
DAS365	XM_002306151.2	(CAAA)2	GAAGTAGGGCAAACACG	59	55	AAGATCATGCCACCAAAAGC	60	45	233
DAS366	XM_002306151.2	(TGG)3	GGCTTACATGGTGGCTCAAT	60	50	CAAAGCTGTGCCAGTGTGT	59	50	136
DAS367	XM_002306151.2	(AGGA)2	GCTGCTGCATACCACAGTA	59	55	GGGCAAAAAGAAGAAAGTCC	60	50	229
DAS368	XM_002306151.2	(TTAT)2	TTTGGGATCTTTCCGTAGCA	60	45	CACAACCTCCCATGACAATG	59	50	247
DAS369	AB377269.1	(CGCCG)2	CAAGGAGGTGAGCGAGGA	60	61	GTAGAGGAAGAGCAGCGTGG	60	60	157
DAS370	AB377269.1	(CCT)3	GCATGATCTTCGCTCTGTC	60	55	TCCTTCATGATGCCCTTGAC	61	50	181
DAS371	AB377269.1	(CGG)3	GTCAAGGGCATCATGAAGGA	61	50	GTAGACGAGGACGAAGGTGC	59	60	123
DAS372	AB377269.1	(AGCGC)2	GCACCTTCGTCCTCGTCTAC	59	60	GGATGTACTGGTGGTACGCC	60	60	279
DAS373	AB377269.1	(GGC)4	CGCGGTCATCTACAACAAGA	59	50	ATTAATTTATTGGCCGGCGT	60	40	182
DAS374	EF364436.1	(AGAGA)2	TGAAGGAGAAGGATAAGTGAG	59	43	CACCACATGGATCAGACTGC	60	55	250
			A						
DAS375	EF364436.1	(ACTGC)2	CAGTCTGATCCATGTGGTGG	60	55	AGCCCGGATAAGAGACACCT	60	55	165
DAS376	EF364436.1	(CACCGG)2	GGGTTTGTCTTTCATGGT	60	50	GGGTTTTTAGTTGGTGGGT	60	50	246

DAS377	EF364436.1	(GCA)3	AAAGTTTGGGACGACCAGTG	60	50	GGGTTTTTAGTTGGTGGGGT	60	50	144
DAS378	EF364436.1	(TTTG)3	AAAGTTTGGGACGACCAGTG	60	50	GGGGCTCTCATCATCAACAT	59	50	248
DAS379	EF364436.1	(ATG)4	ACCCACCAACTAAAAACCC	60	50	GCCCAAAGCTAACAAAGAAGG	60	48	210
DAS380	KF770829.1	(CCA)3	TGAGGTCAAGAACAAGGTGC	60	48	CCCAAGCAATACCCAAAAGA	59	45	248
DAS381	KF770829.1	(TTCTTT)2	TACCAAGATCCACCACCAGT	60	55	CTGCCGATTTATGTGTCCT	60	50	280
DAS382	KF770829.1	(AATG)2	GGCTGCAATCTACCACCAAT	60	50	TATTCCAAACACACAGGCC	60	50	213
DAS383	KF770829.1	(TATGAT)3	GGGCCTGTGTGTTTGAATA	60	50	GGAGGGATACAAATACCCCT	60	52	144
DAS384	KF770829.1	(TATG)2(TATGT)2*	GGGCCTGTGTGTTTGAATA	60	50	AAAATGGAGGGATACAAATACCC	59	39	149
DAS385	KF770829.1	(TTTTTG)2	GGGCCTGTGTGTTTGAATA	60	50	TGAGAACACATGAGAAATCCTTG	59	39	207
DAS386	NM_129273.4	(GCG)3	CGAGTTCGTAGCCACTCTCC	60	60	TGAAGATCATGCCACCAAAA	60	40	149
DAS387	NM_129273.4	(GTTTG)2	CGAGTTCGTAGCCACTCTCC	60	60	TGTAAAGCACCCGCCCTAATC	60	50	257
DAS388	NM_129273.4	(TGGG)2	ACTGATCCCAAACGTAACGC	60	50	GTGACTTGGAACTGAAGCC	59	55	268
DAS389	NM_129273.4	(TATG)2	GATCCTTCAGAAGTGCAGCC	60	55	AACATTGGCATTGGCACATA	59	40	202
DAS390	NM_129273.4	(TGCCAA)2	GATCCTTCAGAAGTGCAGCC	60	55	GAGAAGGCCAAAACAATTTGG	57	40	251
DAS391	AF141900.1	(AGTG)2	GGGATAAGTGAGAAGAGAGAAC AGA	59	44	CACCACATGGATCAGACTGC	60	55	251
DAS392	AF141900.1	(ACTGC)2	CAGTCTGATCCATGTGGTGG	60	55	AGCCCGGATAAGAGACACCT	60	55	165
DAS393	AF141900.1	(CACCGG)2	GGGTTTGCTGTCTTCATGGT	60	50	GGGTTTTTAGTTGGTGGGGT	60	50	246
DAS394	AF141900.1	(GCA)3	AAAGTTTGGGACGACCAGTG	60	50	GGGTTTTTAGTTGGTGGGGT	60	50	144
DAS395	AF141900.1	(CCCT)2	AAAGTTTGGGACGACCAGTG	60	50	GGGGCTCTCATCATCAACAT	59	50	248
DAS396	AF141900.1	(ATG)4	AAAGTTTGGGACGACCAGTG	60	50	AAAAAGGAGGAGAGGGGGCTC	61	55	261
DAS397	AF141900.1	(TGA)3	ACCCACCAACTAAAAACCC	60	50	GCCCAAAGCTAACAAAGAAGG	60	48	215
DAS398	EF624001.1	(AGAC)2	GACGTTGAGCAGGTCACAGA	60	55	AGGATGAAGATCATGCCACC	59	50	278
DAS399	EF624001.1	(TTTTTC)2	TCCTGTGTACCCAAAACAA	60	45	TGAACAAGCAAAGAGAAAATTGA	59	30	240
DAS400	KF641173.1	(TACTG)2	AACATAACGGCCAAATCTGC	60	45	CCAAAGCACATCCACAAATG	60	45	222
DAS401	KF641173.1	(CATT)2	GTTTTCAACGAGAGCAAGCC	60	50	TCCCAACGCTTTAACAGCTC	60	50	126
DAS402	KF641173.1	(GAGCTG)2	GTTTTCAACGAGAGCAAGCC	60	50	ACTCCTGAAAGATCCCAACG	59	50	138
DAS403	KF641173.1	(CTTT)2	GAGCTGTTAAAGCGTTGGGA	60	50	TGAAGAACAACAATAACAACCC	58	39	213
DAS404	JN632527.1	(CTCTT)2	GCTACCAAATGGTCGTTTT	60	45	GTCGGTCTGGCTCTTGAGC	60	60	109
DAS405	JN632527.1	(GACC)2	GCTACCAAATGGTCGTTTT	60	45	AGGAACAGCCCAAATGTCAC	60	50	255
DAS406	JN632527.1	(ACTGC)2	GCTACAAGAGCCAGACCGAC	60	60	AGGAACAGCCCAAATGTCAC	60	50	166
DAS407	JN632527.1	(CGG)3	GTGACATTTGGGCTGTTCT	60	50	CCGGAACATGGGAGTCTCTA	60	55	277
DAS408	JN632527.1	(CACTGG)2	ACACCGTCTTCTCTGCCACT	59	55	AAAATCCATTGGTCATCCCA	60	40	205
DAS409	HQ328778.1	(TCTT)2	ATCGACGTTGAGGAACTTGG	60	50	TCTTGAGGGGATCAGTTTGG	60	50	133
DAS410	HQ328778.1	(GTG)3	ATCGACGTTGAGGAACTTGG	60	50	AAAGATCATGCCACCAAAGG	59	45	198
DAS411	HQ328778.1	(ACAAGG)2	TCCTATTTTGGCACCTTTG	60	45	TGGTGTACAGAGCTGCAAG	60	55	201
DAS412	HQ328778.1	(CCTT)2	CTTGACGCTGTACCACCA	60	55	CTTTCCTCCCTCCACAGA	59	50	248
DAS413	EF079902.1	(GACC)2	AGGTTGGTGGTGAGTTCCAG	60	55	AAGATCATGCCACCAAAGC	60	45	253
DAS414	EF079902.1	(ATGA)2(AATGA)2*	GCCGCAATCTATCACCAGTT	60	50	AAAGCAAAGTTTGGAGGCACA	58	40	254
DAS415	EF079902.1	(TTTA)2	TGAAGCAAGAACTGTGCAGC	60	50	GAAAAAGGAAAAGGAACTGAACT C	58	38	199
DAS416	AB206100.1	(CTAG)3	CACACAGCAAACACAGTCCT	57	50	TGACCACTTTGTCAGCTCCA	60	50	169
DAS417	AB206100.1	(TCCTCT)2	GACGTGGAAGAAGTGGGAGA	60	55	AGGATGAAGATCATGCCACC	59	50	275

DAS418	AB206100.1	(ACTGC)2	TGAGTTCATAGCCACCCTCC	60	55	AGAACAGCCCAAATGTCACC	60	50	218
DAS419	AB206100.1	(TTAA)2	TGCAAGAAGTTTTGGTGCTG	60	45	CGGCCATATTGTATTCAGGG	60	50	229
DAS420	AB206100.1	(GGAA)2	ACACATTCTGAGGGCTACCG	60	55	AAGAAGGCCAAAGAAACACA	59	45	169
DAS421	AB206100.1	(TTTCT)2(TTTC)2*	AGTGGCTGCAATCTACCACC	60	55	CTCTTGGCGGTTTCCCTCTAA	59	50	242
DAS422	AB206100.1	(GTAT)2	CCCTGAATACAATATGGCCG	60	50	CATTACTAGCACAAGGAAACACG	58	43	223
DAS423	GQ253563.1	(ACTGC)2	CCTTGGTGGCATGATTTTT	59	40	AGCACCTAACCCAGTTCCCT	60	55	263
DAS424	GQ253563.1	(GTGC)2	TGCACTGCTGGTATCTCAGG	60	55	AGCACCTAACCCAGTTCCCT	60	55	231
DAS425	GQ253563.1	(ACCGGT)2	CTTCCCATTGGATTTGCTGT	59	45	CACCAATGAAAAGGTCCAACC	60	50	160
DAS426	KP164982.1	(ACTGC)2	CAGTCTGATCCATGTGGTGG	60	55	AGCCCGGATAAGAGACACCT	60	55	165
DAS427	KP164982.1	(CACCGG)2	GGGTTTGCTGTCTTCATGGT	60	50	TGGTCGTCCCAAACCTTTTTTC	59	45	119
DAS428	KP164982.1	(GCA)3	AAAGTTTGGGACGACCAGTG	60	50	GGGGCTCTCATCATCAACAT	59	50	248
DAS429	KP164982.1	(ATG)4	AAAGTTTGGGACGACCAGTG	60	50	AAAAAGGAAGAGAGGGGCTC	58	50	261
DAS430	KP164982.1	(TGA)3	GCAGCAGCATACCACCAGTA	59	55	GCCCAAAGCTAACAAAGAAGG	60	48	280
DAS431	JX119006.1	(TCT)3	CAGGCACTTCCTAAAAATTCG	58	43	GGGATCAGATTGGTTGCTGT	59	50	254
DAS432	JX119006.1	(CCG)3	TTGAGGCCAAGGACTACCAC	60	55	CCCACGCAATACCAAGAACT	60	50	222
DAS433	JX119006.1	(ACTGC)2	AGTTCCTGGTATTGCGTGGG	60	50	GGCGCCACATATAGCTCCTA	60	55	184
DAS434	JX119006.1	(CGG)3	GACATTTGGGCTGTTTTGG	60	45	ACGGGCGTTTCTTTAGGAT	60	50	259
DAS435	JX119006.1	(ATCAGG)2	TGCATCTGGCCACAATACAT	60	45	CTGCTCCTGAAGGAACCAAG	60	55	208
DAS436	JQ364745.1	(GCG)3	ATCGGGTACAACGTCCAGTC	59	55	GAACTGGTTGAACGGATGCT	60	50	273
DAS437	JQ364745.1	(GGTC)2	CGTCATCTACGACCAGAGCA	60	55	AAGGCAGAGGCATGAGTGAT	59	50	214
DAS438	JQ364745.1	(CTAT)2	CGTCATCTACGACCAGAGCA	60	55	ACGAGAAAAGGCAGAGGCAT	61	50	221
DAS439	JQ846269.1	(GTG)3	TGGAGCTAACCAAATGGTCC	59	50	AGAACGAAAATCATGCCACC	59	45	193
DAS440	JQ846269.1	(ACTGC)2	GGTGGCATGATTTTCGTTCT	59	45	GAGCCACCATGTACAACACG	60	55	133
DAS441	JQ846269.1	(TGG)3	GTCAAGGCCTTTCAGAGTGC	60	55	AGTGGTGCCAAAACAGGAAC	60	50	191
DAS442	JQ846269.1	(CACTGG)2	GTTCCGTGTTTTGGCACCCT	60	50	ACAGCTGCACCAAGACTCCT	60	55	113
DAS443	JQ846269.1	(TTGGG)2	GTTCCGTGTTTTGGCACCCT	60	50	CAAACATGGGAGGAGTTGCT	60	50	269
DAS444	AJ849326.1	(ACTGC)2	CCTTGGTGGCATGAATTTT	59	40	ATGGCACGTACAAGGGAGAC	60	55	121
DAS445	AJ849326.1	(TTTA)2	TCTGGGACTGGCCAATATGT	60	50	TATACCGTCTTGGGTACGGG	59	55	221
DAS446	XM_002322841.1	(AGAA)2(AAAGA)2*	AACATTGTTTCATGCCTTCTGA	59	36	GGACTTCATGGGTGTGCTTT	60	50	205
DAS447	XM_002322841.1	(ATTT)2	TGTTTCATGCCTTTCTGATTGA	59	38	GGACTTCATGGGTGTGCTTT	60	50	200
DAS448	XM_002322841.1	(CACT)2	AAAGCACACCCATGAAGTCC	60	50	CTGAACTCGCCTCCAACCTC	60	55	264
DAS449	XM_002322841.1	(ACCA)2	TCCACACTTCCACCACAAAA	60	45	CTGAACTCGCCTCCAACCTC	60	55	126
DAS450	XM_002322841.1	(ACTGC)2	CCTTGGTGGCATGATTTTT	59	40	AGCACCTAACCCAGTTCCCT	60	55	263
DAS451	XM_002322841.1	(TTTA)2	TCTGGGACTGGCCAATATGT	60	50	GTCGTGAATTTCTTCCCTG	59	50	267
DAS452	XM_002322841.1	(AATC)2	GTGAGCTTGGGCACTTGTTT	60	50	CGTGAATTTCTTCCCTGAC	59	50	200
DAS453	AB275280.1	(CCG)3	AGTACGGGGCCAAGGACTAC	60	60	GTAGAGGAAGAGCAGCGTGG	60	60	125
DAS454	AB275280.1	(CGG)3	CGGTGCTCTACATCATCGC	60	58	TGTAGACGAGCACGAAGGTG	60	55	177
DAS455	AB275280.1	(AGCGC)2	CACCTTCGTGCTCGTCTACA	60	55	CACCCAGAAGATCCAGTGGT	60	55	229
DAS456	AB275280.1	(GCC)3	ACCACTGGATCTTCTGGGTG	60	55	TCTTTTTTCAGTGCCTCCGAT	59	45	165
DAS457	EF364437.1	(GGTCCT)2	TTGAAGGACTACCACGACCC	60	55	AGGATGAAGATCATGCCACC	59	50	239
DAS458	EF364437.1	(CAAC)2	AGTCTCGGAGCTGCTGTCAT	60	55	CATGTGGAACTGCTCTTGA	59	50	168
DAS459	EF364437.1	(GAGCTG)2	TCTACAACCAACCCAAAGCC	60	50	TCCTACAGGGCCACAAATTC	59	50	264
DAS460	EF364437.1	(TTTC)2(CTTTC)3*	ACGAATTTGTGGCCCTGTAG	60	50	CATCACTACTACAAAACGAGGCA	59	43	117

DAS461	KF770830.1	(ACTTT)2	CTGAACGTGGCTCTTTCTCC	60	55	AAGATCATGCCACCAAAGC	60	45	253
DAS462	KF770830.1	(GTTGG)2(GGTT)2*	CAGAGTTTGGGGGCTATTTG	59	50	AAAACCGGCACATGAGAATC	59	45	215
DAS463	KF770830.1	(TGG)3	TGGAGTTGGGTTGGTTAAGG	59	50	AAAACCGGCACATGAGAATC	59	45	195
DAS464	KF770830.1	(AAGAT)2	GATTCTCATGTGCCGGTTTT	59	45	GCTTTAGCAGCACCAGCTCT	59	55	242
DAS465	KF770830.1	(TGAT)2	AGTGGTGTCTGCTAAAGCTC	59	55	AGGCTCCCTCTGTAACGAAA	58	50	190
DAS466	KF770830.1	(TTTC)2	AGCTGGTGCTGCTAAAGCTC	59	55	GGAAAGTGAAAAAGGCTCCC	59	48	203
DAS467	KF770830.1	(TCTTTT)2	AGCTGGTGCTGCTAAAGCTC	59	55	TCAATGAGTACAAAGGATTACAGA AGA	59	33	278
DAS468	NM_129274.3	(ACTT)2	CAAGCCCTACAACAACCACA	59	50	GAGAGTGGCTACGAACCTCGG	60	60	207
DAS469	NM_129274.3	(GCG)3	CGAGTTCGTAGCCACTCTCC	60	60	TGAAGATCATGCCACCAA	60	40	149
DAS470	NM_129274.3	(GTTTG)2	TTTTGGTGGCATGATCTTCA	60	40	GAGTCCGGTGCCTGTATTGT	60	55	256
DAS471	NM_129274.3	(AACGC)2	ACAATACAGGCACCGGACTC	60	55	AAACTCTAGCCGGGTTGAT	60	50	205
DAS472	NM_129274.3	(TGGG)2	GCAACGCTAGAGACTCCAC	60	60	TTCTGAATGAACCGAGGGAC	60	50	270
DAS473	NM_129274.3	(TTCA)2	GGGACCATTATTGGAGCTA	59	50	CGTTGCAAAGATGAATTGAAAA	60	32	258
DAS474	KF641174.1	(ACTGC)2	GGTGGCATGATCTTCGTTCT	60	50	CACCTCCGTGCTCATTGTAA	59	50	208
DAS475	KF641174.1	(GCACCG)2	TTACAATGAGCACGGAGGTG	59	50	AAAACCTTCGAGCTGGGTTGA	59	45	250
DAS476	KF641174.1	(CACCG)2	GCCACAGATCCCAAGAGAAA	60	50	ATGAATGGTCCAACCCAAA	60	40	209
DAS477	KF641174.1	(CATT)2	TCAACCCAGCTCGAAGTTTT	59	45	CTTCTGAACGATCCCAGAGC	60	55	169
DAS478	KF641174.1	(TGTTTT)2(TTTTG)2*	AAGCTCTGGGATCGTTCAGA	60	50	TGCATTAACACACAGCCAA	60	40	220
DAS479	EU402412.1	(TCCTCT)2	TGGCTGAACTCAAGTCATGG	59	50	AAGTCACCGCAGGGTTAATG	60	50	231
DAS480	EU402412.1	(GTTGG)2(GGTT)2*	CATTAACCCTGCGGTGACTT	60	50	CCTTGTGTAGCCAGAAGCC	59	55	188
DAS481	EU402412.1	(AGC)3	CCAATAGGGTTCGCAGTGTT	60	50	TTTTTAGTTGGTGGGGTTGC	59	45	249
DAS482	EU402412.1	(ATGA)2	GCAACCCCACTAACTAAAAA	59	45	GCAAAAAGCTAACACGAAGGA	59	43	187
DAS483	EF624002.1	(CCT)3	TTGTGGCAAGGGGGTAGTAG	60	55	AGAGGAAAAGCAAAGTGGCA	60	45	194
DAS484	EF624002.1	(TGG)3	GGTGGCATGATCTTCATCCT	59	50	ACCCAATCCAGTACCTGTGC	59	55	255
DAS485	KR866285.1	(AAGA)2	TCTTCATCACTCCCTTGCAAT	59	43	CTAACAGAGGAGCTGGTGGC	60	60	183
DAS486	KR866285.1	(ATAC)2	GTTTTGTCCCTTGCTAT	60	50	AAGTCGGAACGATCTCAA	60	45	250
DAS487	KR866285.1	(TTGT)2	TTTGAGATCGTCCGAGCTT	60	45	GCTTCAGCCATCTTGGCTAC	60	55	234
DAS488	KR866285.1	(AAGCA)2	TTGAGATCGTCCGAGCTT	60	45	TGCACTTTGCTTCAGCCATA	60	45	264
DAS489	KR866285.1	(TTTCC)2	AGATGGCTGAAGCAAAGCAG	60	50	CTTACCAAGCCTCGTTTCCA	60	50	180
DAS490	AB206101.1	(TCTT)2	TCAAACCCTCAAACCTTTCCC	59	45	TCTTCTGCGTCAATCAGTGG	60	50	164
DAS491	AB206101.1	(GTG)3	CCACTGATTGACGCAGAAGA	60	50	AGGATGAAGATCATGCCACC	59	50	212
DAS492	AB206101.1	(ACTGC)2	TGGTGTGGTATTCTTGGCA	60	45	CCCAAGCATTGAGCCACTAT	60	50	177
DAS493	AB206101.1	(TGG)3	CTATTTTTGGCACGCAAGGT	60	45	AAGACAGGCACATGGGAATC	59	50	269
DAS494	AB206101.1	(CAAC)2	AGTTTTCGGAGCTGCTGTGAT	60	50	CTGCTCCTGCCCTTAAGATG	60	55	130
DAS495	AB206101.1	(TAAT)2(TATTAA)2(A TTA)2*	CATCTTAAGGGCAGGAGCAG	60	55	CAAAAGGCTCCCTCTGTAC	59	55	180
DAS496	AB206101.1	(TCT)3	TGTGACAGAGGGAGCCTTTT	59	50	GTACAGACAAGACCGGGGAA	60	55	127
DAS497	KF921089.1	(A)10	AAAATCCTTGGAAACAAAGAAAA	58	26	GTGGTGGGTCATGGTAGTCC	60	60	277
DAS498	KF921089.1	(A)10	TCCTTGAAACAAAGAAAATGAA	60	30	GTGGTGGGTCATGGTAGTCC	60	60	273
DAS499	KF921089.1	(GCTCA)2	CCGCTCTCCTTCAACATTA	60	50	GCAATCAAGGCCCTGTAAAA	60	45	266
DAS500	KF921089.1	(CCA)3	CATGGTGAAGGACGTGACAG	60	55	CAGCATTCTTTGCAGGATCA	59	45	212
DAS501	KF921089.1	(ATTG)2	GACTACCATGACCCACCACC	60	60	CAGCATTCTTTGCAGGATCA	59	45	169

DAS502	KF921089.1	(TCTT)2	TTTACAGGGCCTTGATTGC	60	45	CAGCATTCTTGCAGGATCA	59	45	109
DAS503	KF921089.1	(GTG)3	TGATCCTGCAAAGAATGCTG	59	45	GGTTAATGTGCCCTCCTGAA	59	50	125
DAS504	KF921089.1	(TGG)3	TTCAGGAGGGCACATTAACC	59	50	GACCAAAACAAAAGTCCCGA	59	45	244
DAS505	KF921089.1	(TTTTG)2	CCCGAAAGGTCTCACTGGTA	60	55	GTCTCTGGCATTCTCTTCG	60	55	242
DAS506	KF921089.1	(CCAG)2	CGAAGAGGAATGCCAGAGAC	60	55	GATCCAAGAGCCTTCACAGC	60	55	268
DAS507	KF921089.1	(TGGT)2	CATTCAGGAGCAACCCAAC	60	50	CAAAAGCCTCCCATTTC	60	40	204
DAS508	KF921089.1	(TTTGT)2(TTTG)2*	CATTCAGGAGCAACCCAAC	60	50	TGAACCAACCAAGAAAACCA	59	40	274
DAS509	KF921089.1	(TTGG)2	TTGAAAATGGGAGGCTTTTG	60	40	GCAAAGGAGCCTAACTTTTCTT	58	41	162
DAS510	XM_002316331.1	(CCA)3	TTTTTGGTATGGCGAAGGAC	59	45	AAAGATCATGCCACCAAAGG	59	45	278
DAS511	XM_002316331.1	(ACTGC)2	TGTGGTGGGGTGGTATTCT	60	50	GCTCCTAAGCATTGAGCCAC	60	55	185
DAS512	XM_002316331.1	(TGG)3	ATGGTGGCTCAATGCTTAGG	60	50	AAAACAGGCACATGGGAGTC	60	50	224
DAS513	XM_002316331.1	(TGCT)2	TTGGATCTTCTGGGTTGGAC	59	50	CCCAGACCCAAAAGGGATAAT	60	50	218
DAS514	XM_002316331.1	(TGCA)2	GCGCTTGCCTTAGAATTCAC	60	50	TCTACATTGTGCAATGCCAAGA	59	38	163
DAS515	NM_125459.3	(TGCGGT)2	GCTGTGACGGTGGGACTATT	60	55	ACCTTTGTTGTAGCCATCGG	60	50	180
DAS516	NM_125459.3	(AGC)5	GCCGTCTTCATGGTTCATTT	59	45	GCCAAGAGCTTTAATCGCAG	60	50	207
DAS517	NM_125459.3	(ATTT)2(TTAAA)2*	TGCGATTAAGCTCTTGGCT	60	45	ACGAATGGGAAATTCATGA	60	40	212
DAS518	NM_125459.3	(TTCA)2	GCTGCGATTAAGCTCTTGG	60	50	CATTTACAATTACACGAATGGGA	58	35	227
DAS519	NM_125459.3	(TTAA)2	GCTGCGATTAAGCTCTTGG	60	50	AAAGCGAACTTGAGATTTATCTT	57	29	273
DAS520	EF364438.1	(CCG)3	TCTCCGCCAAGGACTATCAT	59	50	GTAAAGGAAGAGCAGCGTGG	60	55	122
DAS521	EF364438.1	(ACTGC)2	CCACGCTGCTCTTCTTTAC	60	55	ACCAAAATGGCTCCAAGAC	60	50	269
DAS522	EF364438.1	(GAGCTG)2	GCCGTTTTCATGGTTCATT	60	45	CCCCAAAACAGTGAAGAA	59	45	276
DAS523	EF364438.1	(ATTGGA)2	TTCTTCCACTGTTTTGGGG	59	45	TCATGCCCTCATCCATATCA	59	45	108
DAS524	EF364438.1	(TCCC)2	CTGTTTTTGGGGTGAAGAA	59	45	GGAAAAGATAAGCATGAAGTGA	59	39	192
DAS525	EF364438.1	(CTTT)2	CTGTTTTTGGGGTGAAGAA	59	45	TTTTAGGAAAAGATAAGCATGAAG TG	59	31	197
DAS526	KF641175.1	(CAAAG)2	GGGAAAGACGTTGAAGTTGC	59	50	AAGAGGAGAGTGGCGATGAA	60	50	149
DAS527	KF641175.1	(TGTT)2	AAAGCCTGGGATGATCAATG	59	45	CAGAGCAGCAGCAAGAATTG	59	50	274
DAS528	KF641175.1	(TGC)3(CTGCT)2*	GCAACGCTTGAAAATCCTTC	59	45	ATTCCATGACGAACAAAGGC	59	45	183
DAS529	KF641175.1	(GAAA)2(AAAGAA)2*	GCCTTTGTTGTCATGGAAT	59	45	ACAGGAGCCCCAATTC	59	45	132
DAS530	KF641175.1	(AAAAG)2	GCCTTTGTTGTCATGGAAT	59	45	CAAAGGATAAGGATGAAACACGA	60	39	173
DAS531	EU402413.1	(TGAT)2	AGTGAAGAAGGACAGGGTGC	59	55	AAAGATCATGCCACCGAAAG	60	45	234
DAS532	EU402413.1	(TCCTCT)2	TGGCTGAACTCAAGTCATGG	59	50	AAGTCACCGCAGGGTTAATG	60	50	231
DAS533	EU402413.1	(GTTGG)2(GGTT)2*	CATTAACCCTGCGGTGACTT	60	50	CTCAGCTCCCAAAGCAGTTC	60	55	208
DAS534	EU402413.1	(AGC)3	CCAATAGGGTTCGCAGTGTT	60	50	TTTTTAGTTGGTGGGGTTGC	59	45	249
DAS535	EU402413.1	(ATT)3(ATGA)2(ATG)4 *	GCAACCCCACTAAACTAAAA	59	45	AAGAAACGACACTAAGGAATCAA	57	35	212
DAS536	AB206102.1	(CCT)4	GCCATGACTAAGGACCTTGAA	59	48	AGGATGAAGATCATGCCACC	59	50	266
DAS537	AB206102.1	(TCCTCT)2	CCTCCTCCAGCTCCTCTCTT	60	60	AGGATGAAGATCATGCCACC	59	50	212
DAS538	AB206102.1	(CACTGG)2	ACTCTCACGTCCCCGTATTG	60	55	CTGCTCCTGAAAGAACCAG	60	55	262
DAS539	AB206102.1	(GGATGA)2	CTGGGTCTTTCAGGAGCAG	60	55	ATACACCCGGTTGCTGAATC	59	50	215
DAS540	AB206102.1	(AATT)2	GATTCAGCAACCGGGTGTAT	59	50	CCACTGCACAAAATAACGACA	59	43	129
DAS541	NM_125459.3	(TGCGGT)2	GCTGTGACGGTGGGACTATT	60	55	ACCTTTGTTGTAGCCATCGG	60	50	180
DAS542	NM_125459.3	(AGC)5	GCCGTCTTCATGGTTCATTT	59	45	GCCAAGAGCTTTAATCGCAG	60	50	207

DAS543	NM_125459.3	(ATTT)2(TTAAA)2*	TGCGATTAAAGCTCTTGGCT	60	45	ACGAATGGGAAATTCCATGA	60	40	212
DAS544	NM_125459.3	(TTTCA)2	GCTGCGATTAAAGCTCTTGG	60	50	CATTTACAATTACACGAATGGGA	58	35	227
DAS545	NM_125459.3	(TTAA)2	GCTGCGATTAAAGCTCTTGG	60	50	AAAGCGAACTTGAGATTTTATCTT	57	29	273
DAS546	AB540221.1	(TCTTCG)2	CACCGGGAGGTGTACGAG	60	67	GGAAGAGGGTGATGTTGCC	60	58	274
DAS547	AB540221.1	(GCCG)2	ATCTCCACGCTCATCTTCGT	59	50	GGAAGAGGGTGATGTTGCC	60	58	223
DAS548	AB540221.1	(TCC)3	GGCAACATCACCCCTTCC	60	58	ATGACGATCTCCAGGACCAC	59	55	164
DAS549	AB540221.1	(CCATCG)2	GTGGTCTGGAGATCGTCAT	59	55	GACCCAGTACACCCACTGGT	59	60	231
DAS550	AB540221.1	(CGG)3	ACCAGTGGGTGTACTGGGTC	59	60	TAGTAGTCGGTGGTGGGGAG	60	60	112
DAS551	JF834207.1	(CGC)3	ATCTCGACGCTCATCTTCGT	60	50	CGCGGAGGAGAGAGATATTG	59	55	226
DAS552	JF834207.1	(GGGAGT)2	GTCACCAACGGCCAGACTAC	60	60	AGACCAGTCCGAACGTCATC	60	55	100
DAS553	JF834207.1	(TTTC)2	GATGACGTTCCGACTGGTCT	60	55	ACGAACTCGTAGATGACCCC	59	55	261
DAS554	NM_129238.3	(TGGCT)2	CCTCATCCTTAAATTCGCCA	60	45	GCTCCAACAATGAAACCGAT	59	45	201
DAS555	NM_129238.3	(ACCA)2	GATGACATTCCGGCTTGT	59	45	TTCGTAGATGAGTCCAGCGA	59	50	256
DAS556	NM_129238.3	(TTTGAA)2	TCGCTGGACTCATCTACGAA	59	50	GAAATTGCAATGGCCACTCT	60	45	240
DAS557	AY839872.2	(GCCA)2	ATGCCGATTAACAGAATCGC	60	45	CCCCTATCCGTCAGCTTGT	60	55	153
DAS558	AY839872.2	(GGGCC)2	TTAGCTGGTGGTGCATTTGA	60	45	AAAGCCCCTAATTGCATTCC	60	45	250
DAS559	FJ861240.1	(GGC)4	TAGGGAGGTACGACGAGGTC	59	60	CGAACGTGACAGCAGGATTA	59	50	249
DAS560	FJ861240.1	(TGGCA)2	TGATTTTGTGTTTGTGGC	59	40	CAGTGGAGCCAAGACACTGA	60	55	255
DAS561	FJ861240.1	(CGCCGT)2	TCAGTGTCTTGGCTCCACTG	60	55	ATTCGAGGGTCACCCTTCTT	59	50	189
DAS562	FJ861240.1	(GGACT)2	AAGAAGGGTGACCTCGGAAT	59	50	GTAATCCAGTGGTGGGCAAT	59	50	256
DAS563	FJ384629.1	(GGCC)2	GCCGATCAGAAACATAGCG	59	53	GAGACAGCGACGAAAAGACC	60	55	219
DAS564	FJ384629.1	(TGAC)2	AAGAGGCTACTCACCCGAT	60	55	GAGACAGCGACGAAAAGACC	60	55	187
DAS565	FJ384629.1	(TTCATC)2	GGCTCGCTGGTCTCATCTAC	60	60	TCAGGGCATGCAATTGTAAA	60	40	270
DAS566	AY243803.1	(TCTTCG)2	GCTGAGTTCATCTCCACCCT	59	55	AACAGGGTGATGTTGCCG	60	56	230
DAS567	AY243803	(CGG)3	TCTCCACCCTCATCTTCGTC	60	55	GGAACAGGGTGATGTTGCC	61	58	222
DAS568	AY243803	(CGGG)2	GGGGCTCCTGTACTGGGT	59	67	AGGTCATCACGATCTCCAGC	60	55	149
DAS569	AY243803	(CCATCG)2	GAGATCGTGATGACCTTCGG	60	55	GACCCAGTACACCCACTGGT	59	60	222
DAS570	AY243803	(CGG)3	ACCAGTGGGTGTACTGGGTC	59	60	CGGCTTTTAGTAGTCGGTGG	59	55	119
DAS571	KF851321.1	(ACCC)2	CTACGTGGATCGGATTACTCG	59	52	GACAAAAAGTCCGAATGCGT	60	45	223
DAS572	KF851321.1	(CGC)3	CTAATTTTCGCTTTTGC	59	45	GACAAAAAGTCCGAATGCGT	60	45	123
DAS573	KF851321.1	(GTCGCC)2	CTAATTTTCGCTTTTGC	59	45	CACGTAGGATGGTGTATGTTG	59	55	217
DAS574	KF851321.1	(CTACT)2	ACGCATTCGGACTTTTTGTC	60	45	CGGTTGTAGTCATGCCATTG	60	50	201
DAS575	FJ851080.1	(ACAA)2	ATCAGAAACATCGCCGTAGG	60	50	GCCAAATGTAACAGCAGGGT	60	50	267
DAS576	KF851321.1	(GCTT)3	ACCCTGCTGTTACATTTGGC	60	50	GGAAGAGAGTGCGAAACCAG	60	55	158
DAS577	KF851321.1	(CGTT)2	ACCCTGCTGTTACATTTGGC	60	50	ATGGGTGCAATAATTCCCAA	60	40	277
DAS578	KF851321.1	(GAGCTG)2	TTGGGAATTATTGCACCCAT	60	40	CATAAACGACCCCAAGT	60	50	193
DAS579	KF851321.1	(GTT)3	TTGGGAATTATTGCACCCAT	60	40	TAGTCAGTGGAGGGGAGCTG	60	60	245
DAS580	KF851321.1	(GGT)4	ACTTGCTGGGGTCGTTTATG	60	50	CACAAATCACACACCCTTGG	59	50	237
DAS581	AB206104.1	(ACATA)2	TCTTGATCCCAACATCTCTCAA	59	41	TATGGCGGCAGATATAAGGC	60	50	236
DAS582	AB206104.1	(CAGGCT)2	GCAACACACCCAGATACCTT	59	55	GGCTATGGCGGCAGATATAA	60	50	153
DAS583	AB206104.1	(GCCGTC)2	TTATATCTGCCGCCATAGCC	60	50	TTTAAGGAGGAGGCAAGCAA	60	45	194
DAS584	AB206104.1	(TTGC)2(CCT)3*	TTATATCTGCCGCCATAGCC	60	50	TCCACACTCCAACACCAGAA	60	50	255
DAS585	AB206104.1	(CCATTG)2	TTGCTTGCCCTCTCTTAAA	60	45	ACCAGCAAGAATGTTGGCTC	60	50	224

DAS586	AB206104.1	(TCT)3(TTCT)2*	CTCCCCACCACCGATTACTA	59	55	GCGAACCAAATAGTCCCTCA	60	50	190
DAS587	AB206104.1	(ATG)3	CTCCCCACCACCGATTACTA	59	55	ACAGTGCGGCACAAATACAA	60	45	212
DAS588	AB206104.1	(TGTA)2	CTCCCCACCACCGATTACTA	59	55	TTTTTAAATCATAATCGTAGACCCG	59	32	250
DAS589	KP234262.1	(CCAC)2	GAGGAATTGCTGTGGGGAG	60	58	CTGCCACAAAGAGCCCTAGA	60	55	207
DAS590	KP234262.1	(CGTT)2	GCATGCTTAGGGCTCTTTG	60	55	TTGAGCAACAAGCAAGCAAC	60	45	174
DAS591	KP234262.1	(TTGC)2	GCATGCTCTAGGGCTCTTTG	60	55	GAAGACAACGAGAAAGCGGA	60	50	219
DAS592	KP234262.1	(GGGCGT)2	TGCTTGCTTGTGCTCAAGT	59	45	CACGATGAATCCAATGCAGA	60	45	202
DAS593	KP234262.1	(CTGG)2	CAACGCTGTGGTATTTCGAGA	59	50	TAGATAACGCCAGCCAGACC	60	55	276
DAS594	KP234262.1	(CTGG)2	TAGTCATGACGTTCCGGGTTG	59	50	TCCGGGGAGATCATAAACAG	59	50	280
DAS595	KF134811.1	(AATTT)2	CATGGGGGAGTACTACAACTAC	59	46	TCCAATTGCAATGTTACGGA	59	40	100
			A						
DAS596	KF134811.1	(TTTTTG)2	TTGGCCGAGTTTATTTCCAC	59	45	TAGGAGGGTGATGTTACCGC	60	55	234
DAS597	KF134811.1	(GCTT)2	GCGGTAACATCACCTCCTA	60	55	GGTGCAATTGTTCCCAAAC	59	45	241
DAS598	KF134811.1	(ACC)6(CCAC)2*	GGCCTTGCTGGTCTCATCTA	60	55	GAGACACGACCAAACCCATC	60	55	207
DAS599	KF134811.1	(GCG)3	TAAGTCAACCACCACCACCA	59	50	GAGACACGACCAAACCCATC	60	55	135
DAS600	GAJT01000004.1	(GAAA)3	TTTCGAGTATTCAAAAACCTCA	60	35	GATTTCTTCACGGTTTCCGA	60	45	119
DAS601	GAJT01000004.1	(GGCAT)2	TCGGAAACCGTGAAGAAATC	60	45	CCACGAATAGCCCTAAACCA	60	50	192
DAS602	GAJT01000004.1	(ATCA)2(TTGC)3	TGGTTTAGGGCTATTCTGTTG	60	50	CGCCAGAGATAAGGCTGAAG	60	55	214
DAS603	GAJT01000004.1	(CCATTG)2	AGAAGGGTGATGTTGGAACG	60	50	AGACCCAATGGTGAGTCCAG	60	55	156
DAS604	GAJT01000004.1	(CTGGAC)2	AGAAGGGTGATGTTGGAACG	60	50	TTTCCTAGTAATCTGCGGCG	60	50	261
DAS605	GAJT01000004.1	(TGCT)2	CTGGACCTGGACTCACCATT	60	55	AACTCCCAACTTCTCGACC	60	55	202
DAS606	GAJT01000004.1	(TCTTT)2	CTGGACCTGGACTCACCATT	60	55	ATAAACGCCACTGGACAGGA	60	50	278
DAS607	AF326500.1	(ACGG)2	ATCTCCACGCTCATCTTCGT	59	50	CCTTGAGGAGGCTGATGTTG	60	55	226
DAS608	AF326500	(GCCT)2(CCT)3*	CTCAAGGCCCTGGTCTACTG	59	60	GTCATGACCATCTCCAGCAC	59	55	155
DAS609	AF326500	(CCATCG)2	GTGGTGCTGGAGATGGTCA	60	58	GACCCAGTACACCCAGTGGT	59	60	231
DAS610		(CAT)4	ACCACTGGGTGTACTGGGTC	59	60	GGAGATGAGATTTGGCATGTT	59	43	209
DAS611	AF326500	(AGACC)2	CGGCAGCAGACTACTGATGA	60	55	GGAGATGAGATTTGGCATGTT	59	43	104
DAS612	AB540226.1	(TCTTCG)2(CCGGCT)2	GCCGAGTTCATATCCATGCT	60	50	CCTTGAGGAGGCTGATGTTG	60	55	235
DAS613	AB540226.1	(TGCC)2(CCT)3*	GCAACATCAGCCTCCTCAAG	60	55	TCATGACGATCTCGAACACC	59	50	168
DAS614	AB540226.1	(CCATCG)2	GTGGTGTTTCGAGATCGTCAT	58	50	GAGCCAGTACACCCAGTGGT	60	60	231
DAS615	NM_113559.3	(TCACT)2	CGTACAACACATAAGAAAAACAA	60	35	AGTGCGTTGGGGTGATAGAC	60	55	150
			ACC						
DAS616	NM_113559.3	(CGCT)2	GTCTATCACCCCAACGCACT	60	55	CCAACAGAGACAGCGACAAA	60	50	188
DAS617	NM_113559.3	(ACCA)2	TGACCCCAAGAACGGTAGTC	60	55	GTCGTAGATAAATCCGGCGA	60	50	214
DAS618	NM_113559.3	(ATTG)2	TCGCCGGAATTACTACGAC	60	50	ATTGCACAAAAGCCCTCCAG	60	45	257
DAS619	NM_113559.3	(ATTGT)2	GCATCGTAATGGGTTTCTGG	60	50	CACATTCCTGGTTTTCTCAA	60	43	171
DAS620	NM_113559.3	(CTAA)2	CTGGAAGGCTTTTGTGCAAT	60	45	TTCATTAATAATTTCCATGTCTCG	58	30	163
DAS621	DQ834702.1	(GTTT)2	TTAAGTTTTCCACCAACGGC	60	45	CAGGCCCAATGATACTGCT	60	50	258
DAS622	DQ834702.1	(GCCT)2	TGCTAACATTCTGGCAGGTG	59	50	GGCTGATGAAGAAGACCTCG	60	55	170
DAS623	DQ834702.1	(CTGGAC)2(ACCA)2*	AGCAGTATCATTTGGGCCTG	60	50	GGCTGATGAAGAAGACCTCG	60	55	122
DAS624	DQ834702.1	(TTTG)2	ATCCATGAACAGTTCGGAGG	59	50	GGAGCCGATCGAATAAGACA	60	50	149
DAS625	AB206105.1	(TGTT)2	TGCGTCTGAGTTTCAACAGG	60	50	GAAGGTAACAGCCGGATTCA	60	50	241
DAS626	AB206105.1	(GTTGT)2(TTGC)3*	CAGCAGGGTATGTCAGCA	60	55	AAATGCCGATGTTTCCAGTC	59	45	236

DAS627	AB206105.1	(CAATTG)2	GACTGGAAACATCGGCATTT	59	45	CTAGGATGTTGGCACCCACT	60	55	186
DAS628	NM_116377.1	(AACT)2	TATATTCGTTTTTCGCGGGTC	59	45	GCAAACGCATGAGACAAAGA	60	45	111
DAS629	NM_116377.1	(TGCGTT)2	TATATTCGTTTTTCGCGGGTC	59	45	TCCGAGTAATTGAGCGATCC	60	50	247
DAS630	NM_116377.1	(GCTT)2	GGATCGTCAATTACTCGGA	60	50	AATCTCGAAAACGACTGCGT	59	45	128
DAS631	NM_116377.1	(TGGT)2	GTGGATCCCAAGAAAAGGTGA	59	50	CCAACCCAATAGACCCCAATG	60	50	176
DAS632	KR866288.1	(CTAG)3	AAGTATGGCCACAAAGCTGG	60	50	CTGGGTTGCCTCATGGTAGT	60	55	167
DAS633	KR866288.1	(ACGG)2	ACTACCATGAGGCAACCCAG	60	55	GGCAACAAAAAGAGCGAAAG	60	45	188
DAS634	KR866288.1	(TGCT)2	ACATCACCCCTCTTACGTGGC	60	55	ACGAAAGCGTTCACATACACC	60	50	148
DAS635	KR866288.1	(ACCA)2	TGTTGACCCGAAGAAGGGTA	60	50	CCGTAGCCGATGAAGAAGAA	60	50	237
DAS636	KR866288.1	(CTGGG)2	CTGGAACCTGGACCAACCACT	60	55	TTAAAACCATCCCATGCACA	59	40	165
DAS637	KR866288.1	(TTTC)2	TTCTTCTTCATCGGCTACGG	60	50	TTGCAACTGGAGAAGTCGAA	59	45	248
DAS638	GU584119.1	(ATCC)3	AGCAGCTACACAGCACACGA	60	55	AGCATGGATGAACCTCGGC	60	50	153
DAS639	GU584119.1	(TCTTCG)2(CCGGCT)2	GCCGAGTTCATATCCATGCT	60	50	CCTTGAGGAGGCTGATGTTG	60	55	235
DAS640	GU584119.1	(TGCC)2(CCT)3*	GCAACATCAGCCTCCTCAAG	60	55	TCATGACGATCTCGAACACC	59	50	168
DAS641	GU584119.1	(CCATCG)2	GTGGTGTTCGAGATCGTCAT	58	50	GAGCCAGTACACCCAGTGGT	60	60	231
DAS642	GU584119.1	(CAAG)2	TACGACATCTGCTTCATCGG	59	50	TGAGGACGTACACCAAGACAA	59	48	250
DAS643	BK007053.1	(GGCC)2	TTCCCATTTCCAATCTCCAG	59	45	GAGACAGCGACGAAAAGACC	60	55	255
DAS644	BK007053.1	(TTCATC)2	GGCTCGCTGGTCTCATCTAC	60	60	TCAGGGCATGCAATTGTAAA	60	40	272
DAS645	JQ846274.1	(CTTTG)2	GTCACCTTTGGATTGGCACT	60	50	ATGGCAATGGGTGCAATTAT	60	40	275
DAS646	JQ846274.1	(CCATTG)2	GCCATTGAAGGAGTGGTGAT	59	50	AGGGGTCCAACCCAGTAGAT	59	55	251
DAS647	JQ846274.1	(GTC)2	CATTGCCATTGGTTTCATTG	59	40	GCATGAACACGTTGCCATAG	60	50	191
DAS648	JQ846274.1	(TTGAT)2(TTGA)2*	AATTGGTGGTGGCTTAGCTG	60	50	CGGACAAAAGAACACAACAA	57	40	115
DAS649	JF834204.1	(ATC)3	GCCATTGTTGCAGCCTTTAT	60	45	AGCCAAGATGTTAGTCCGA	60	50	228
DAS650	JF834204.1	(CCCGG)2	CATCATCACGTTTGCTTTGG	60	45	TTTCCATAGATGAGGCCAGC	60	50	261
DAS651	AB540222.1	(GCGATC)2	TTGCCTATGGGAAACTCACC	59	50	ACGAACTTGAGGAGGAAGCA	60	50	247
DAS652	AB540222.1	(GCC)3	TTGCCTATGGGAAACTCACC	59	50	GGTGACGAACTTGAGGAGGA	60	55	251
DAS653	AB540222.1	(ACGC)2	TGCTTCCTCCTCAAGTTCGT	60	50	GATGACGATCTCCATACCA	59	50	102
DAS654	AB540222.1	(CGG)3	GGAGATCGTCATCACCTTCG	60	55	GACCCAGTAGACCCAGTTGC	59	60	223
DAS655	AB540222.1	(CCAG)2	GCAACTGGGTCTACTGGGTC	59	60	CACGCGTAGTCTGGTCC	60	67	112
DAS656	EF364439.1	(TCCAC)2	TGATTCCCTCAGTTTGCCCT	59	45	CAAGAGCAGCGTCTGATGTC	59	55	125
DAS657	EF364439.1	(CCCG)2	TCGTGATCACTTTCGCTCTG	60	50	TAGACAGATCTCCCATGCC	60	55	256
DAS658	EF364439.1	(TTCT)2	GGAGGAAGAGCAAGTTGTGC	60	55	CACAGCTTGAACCAAAGCAA	60	45	115
DAS659	EF364439.1	(ATGA)2	TCTCAACCCATTTCCCTTTG	59	45	AGAAAAGCAAAGTGGCTGCAC	60	50	202
DAS660	NM_112495.3	(ATTC)2	GTTGCCTTTGGTTCCTTTGA	60	45	CAAGACCAAAAAGTGACGGCT	60	50	262
DAS661	NM_112495.3	(ATC)3	ACTGGATCGCTCAGCTTCTC	59	55	ACGATAAGACCAATGGCGAG	60	50	232
DAS662	NM_112495.3	(TCTT)2(TTGT)2*(TTTG)2*	GTCTTCATGGGTTCTCCGA	60	50	ATTACAACGAAACCGGACCA	60	45	149
DAS663	KR866291.1	(ATC)3	GCCATTGAAGGAGTGGTGAT	59	50	CGGCCAGTATATCCAGTTG	60	55	244
DAS664	KR866291.1	(GGGCC)2	CCAGCTGTGGTTAGTGGTGA	59	55	TGATCTGCAACCCCTTTCTT	59	45	201
DAS665	KR866291.1	(CTCTC)2(TCTT)2*	GTGAAGAAAGGGTTGCAGA	60	50	GGTACGAAGAGACTGGCTGC	60	60	148
DAS666	FJ966882.1	(TCTTCG)2	GATGACTCCTTCAGCTTGGC	60	55	CTCACCTTGGTGTAGGCGAT	60	55	110
DAS667	FJ861241.1	(GCG)3	TCAGCTTGGCCTCTCTCAAG	60	55	GTAGAAGATGCCGGTGAGGA	60	55	275
DAS668	FJ861241.1	(TTTTTG)2	AGCTGAGTTTACTGCCACCC	59	55	GCAACAGTAGCACCAAGCAA	60	50	279

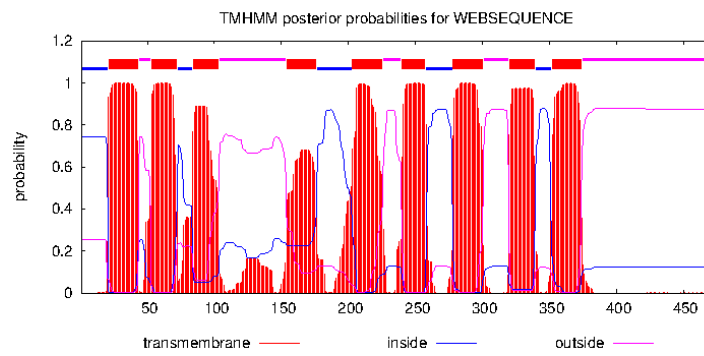
DAS669	FJ861241.1	(TTGT)2	GCTGGAGTTGGATCAGCAAT	60	50	GCAACAGTAGCACCAAGCAA	60	50	245
DAS670	FJ861241.1	(ATC)3	TGGTGCAGGACTAGATGCAG	60	55	CAGCAGATCCAGTGACCTGA	60	55	255
DAS671	AB206106.1	(GCAT)2	TCAGTGTCTGCGTCCATTAAG	60	50	ACCGACACTCCGACGAATAG	60	55	181
DAS672	AB206106.1	(TTGC)2	TGCATTTGCTCTATTTCGTCG	60	45	GGGGCACTTGTGACAAACTT	60	50	189
DAS673	AB206106.1	(ATTG)2	GACCCCAAAAAGGGATCATT	60	45	AGAGGTAGGAAGCTGGGGCAT	60	55	252
DAS674	AB206106.1	(T)10	ATGCCCCAGTTCCTACCTCT	60	55	ACCAAAAAGCCAAATCAAAGC	59	40	168
DAS675	NM_001111560.1	(CGAAGC)2(AGC)3*	AAAAGCTGACTGGACTCCCA	59	50	TCTTGTCTTGCTTGATTGCG	60	45	130
DAS676	NM_001111560.1	(CAAG)2(CAAGA)2*	AAAAGCTGACTGGACTCCCA	59	50	ACGTAGGCCTTGATGGAGGT	60	55	194
DAS677	NM_001111560.1	(TCTTCG)2	CGCAATCAAGCAAGACAAGA	60	45	CATTTCGTGATTTGCCCGTAG	61	55	161
DAS678	NM_001111560.1	(GCGATC)2	ACCTCCATCAAGGCCTACG	60	58	CAGTAGAAGACGCCCGTCAG	61	60	269
DAS679	NM_001111560.1	(ACGC)2	CTGACGGGCGTCTTCTACTG	61	60	AGGTGATGACGACCTCGAAC	60	55	154
DAS680	NM_001111560.1	(CCG)3	TTTCGAGGTCGTCATCACCTT	60	50	AATGAAGACGTCGCCGTAGA	60	50	279
DAS681	NM_001111560.1	(CGG)3	AAACTGGGCTACTGGGTCG	59	55	AACGACGACGGTTTTGAATC	60	45	170
DAS682	NM_001111560.1	(CGT)3(TTTGCT)2*	ATCTCCGCTCTGGATGAATG	60	50	AGGCACATCATATTGGCACA	60	45	107
DAS683	NM_001111560.1	(ATGT)2	ATCTCCGCTCTGGATGAATG	60	50	AGGGCAAAGGCACATCATA	59	47	114
DAS684	AY525639.1	(TCTTCG)2	GTCGCTTCGATGACTCCTTC	60	55	ACCTTGGTGTAGGCGATGAC	60	55	115
DAS685	AY525639.1	(GCG)3	CTCTGTCATCGCCTACACCA	59	55	GTAGAAGATGCCGCTGAGGA	60	55	202
DAS686	AY525639.1	(CCG)3	GAGATCATCGTCACCTTCGG	60	55	GCCCAGTAGACCCAGATGTT	59	55	221
DAS687	AY525639.1	(GGCC)2	GAGATCATCGTCACCTTCGG	60	55	AGGTATCCGGTAGACGACGCC	61	60	269
DAS688	JQ846275.1	(TGCT)2	TACTGGATTGCCAGCTTCT	59	50	GTGTACACCAGCCCGAAAGT	60	55	158
DAS689	JQ846275.1	(CTGGG)2	AGATCGTGATGACTTTCGGG	60	50	CTCGTACACAAGACCGCGA	60	55	263
DAS690	JQ846275.1	(TGGATT)2	ATTCTAGCTGGTGGGGCTTT	60	50	AGAAAAAGCCGTGCAACTGT	59	45	261
DAS691	AB540223.1	(ATCGCC)2	TCCTATGTCGCGGAGTTCAT	60	50	CAGTAGAAGAGCCCGGTGAG	60	60	257
DAS692	AB540223.1	(CCT)3	CTCACCGGGCTCTTCTACTG	60	60	TGATCACGATCTCCATCACC	59	50	151
DAS693	AB540223.1	(GGCC)2	CGTGGTGATGGAGATCGTG	61	58	AGTGGTCCGACCCAGTACAC	59	60	240
DAS694	AY525640.1	(TCTTCG)2	CATCGCTGAGTTCATCTCCA	59	50	CTGGGCAACCCAATAGAAGA	60	50	262
DAS695	AY525640.1	(CCG)3	GAGATCATCGTCACCTTCGG	60	55	TCCAGATGTTGGTGAAGTCG	59	50	211
DAS696	KR866292.1	(TTAT)2	GATAGCTTCCGGCAGTCTTG	60	55	CCAAAAGGTGACAGCTGGATT	60	50	258
DAS697	KR866292.1	(GCCT)2(CCT)3*	AATCCAGCTGTCACCTTTGG	60	50	TCTCCATCACCACCTCTCC	60	55	193
DAS698	KR866292.1	(GCTC)2	GGAAGGAGTGGTGATGGAGA	60	55	CATAAAACAAGCCAGCCAGT	60	50	278
DAS699	KR866292.1	(GCTT)2	ACTGGCTGGGCTTGTTATG	60	50	GCAAAGTTCAAATCACAGCTG	59	41	123
DAS700	NM_117838.3	(CTCT)2	TGTCGGATCAAATGGTGAA	59	40	AAAGCAAGAGCAGAGCCAAC	59	50	137
DAS701	NM_117838.3	(GCTCT)2	TTCTCTTTGTGTTTGCTGGC	59	45	ACGAAGACGAGGAGGAGACA	60	55	280
DAS702	NM_117838.3	(TGTCGC)2	CTCTTGCTTTTGCCAAGCTC	60	50	CGAAGACGAGGAGGAGACAC	60	60	249
DAS703	NM_117838.3	(CTC)3	CGGTGGCAACATCACAGTAA	60	50	CAGAGCAAAGGTCACCACAA	59	50	184
DAS704	NM_117838.3	(AAAG)2	TGTCTCCTCCTCGTCTTCGT	60	55	CTGACAACAGCTGGTCCAAA	59	50	278
DAS705	NM_117838.3	(TGGG)2	TTTGACCAGCTGTTGTCAG	59	50	GGTAGCTTTCTGTGGTGGGA	60	55	145
DAS706	NM_117838.3	(GCTTG)2(GCTT)2*	TCCCACCACAGAAAGCTACC	60	55	TTTGAAGAAACGAGGACCA	60	45	100
DAS707	NM_117838.3	(AATG)2	TCCCACCACAGAAAGCTACC	60	55	CAACTTTGATCTTTTTCTCCACA	58	35	137
DAS708	AB540224.1	(TCTTCG)2	GTCGCTTCGATGACTCCTTC	60	55	TCACCTTGGTGTAGGCAATG	59	50	117
DAS709	AB540224.1	(GCG)3	CCGAGTTCATCTCCACCCT	60	58	CAGTAGAAGAGGCCCGGTGAG	60	60	247
DAS710	AB540224.1	(CCG)3	GAGATCATCGTCACCTTCGG	60	55	TCCAGATGTTGGTGAAGTCG	59	50	211
DAS711	AB540224.1	(GGCC)2	CGACTTCACCAACATCTGGA	59	50	TTAGTAGTCGTTGCTGGCGA	59	50	124

DAS712	XM_002448244.1	(AGAAAA)2	GCTGGAAGCTTGAAGTACCG	60	55	AATGAACTCGGCCACATAGG	60	50	118
DAS713	XM_002448244.1	(GCCATC)2	CCTATGTGGCCGAGTTCATT	60	50	GTAGAAGATGCCGGTGAGGA	60	55	254
DAS714	XM_002448244.1	(CCATCG)2	GACAGGCTATCCCGACACAC	60	60	ACCCAGTAGACCCAGTTGCC	61	60	280
DAS715	XM_002448244.1	(CGG)3	GCAACTGGGTCTACTGGGTC	59	60	GTCCGGATCGACTTTCTTCA	60	50	133
DAS716	XM_002448244.1	(AATGC)2	ACGTGTTTCATCGCCTCTAC	60	55	CGAACGGTTCTCTCGCTTAC	60	55	232
DAS717	XM_002448244.1	(AATGT)2	GTTGATTTACCGTCCTCGT	60	50	GAAAATCCGTCCGGAACATA	59	45	210
DAS718	NM_124117.2	(CTCTT)2	ATCGAAGTTGGAAGTGTGGG	60	50	ACCACCAGAAAATGTTAGCCG	60	50	231
DAS719	NM_124117.2	(AAAG)2	TGGATTGCTCAGTGTCTTGG	59	50	ACCAACTATGAAGCCGATGG	60	50	234
DAS720	NM_124117.2	(TGGG)2	CCATCGGCTTCATAGTTGGT	60	50	TCAAGCAATCACAAAACCCA	60	40	252
DAS721	NM_124117.2	(TGGT)2	CTCCATGAATCCAGCAAGGT	60	50	TGCAAGAAAAGTGACACCAA	60	45	250
DAS722	NM_124117.2	(TGTA)2	TGGGTTTTGTGATTGCTTGA	60	40	CATATGAAAAGAAACCAACATGC	58	35	187
DAS723	NM_124117.2	(TTTC)2	TGGGTTTTGTGATTGCTTGA	60	40	TCGATAACTTTATGAAAGTAAAAAT GCC	60	30	228
DAS624	DQ834702.1	(TTTG)2	ATCCATGAACAGTTCGAGG	59	50	GGAGCCGATCGAATAAGACA	60	50	149
DAS625	AB206105.1	(TGTT)2	TGCGTCTGAGTTTCAACAGG	60	50	GAAGGTAACAGCCGGATTCA	60	50	241
DAS626	AB206105.1	(GTTGT)2(TTGC)3*	CAGCAGGGTTAGTGTGTCAGCA	60	55	AAATGCCGATGTTTCCAGTC	60	45	236
DAS727	GU998837.1	(TTGC)2	TTTGGGTTAGCTCTTGGTGG	60	50	TGATCCCTTCTTTGGGTCAG	60	50	243
DAS728	GU998837.1	(ATC)3	GGATCCATTGTTGCTTGCTT	60	45	TGATCCCTTCTTTGGGTCAG	60	50	174
DAS729	GU998837.1	(GCTC)2	CTGACCCAAAGAAGGGATCA	60	50	ATCAGTGGTCCCACCCAGTA	60	55	184
DAS730	GU998837.1	(TGGG)2	CTGACCCAAAGAAGGGATCA	60	50	ACAATGGTGCATGGTCAGAG	59	50	249
DAS731	GU998837.1	(GGTTT)2	TACTGGGTGGGACCACTGAT	60	55	ACCACCTCATCCATTTCCAC	59	50	280
DAS732	AY525641.1	(TGCC)2	TTTTGGGCCATTCTAAGCC	60	47	GACGAAGATGAGGGTGGAGA	60	55	121
DAS733	AY525641.1	(TCGG)2	CATTCTAAGCCACCATGCCT	60	50	GACGAAGATGAGGGTGGAGA	60	55	113
DAS734	AY525641.1	(TCTTCG)2	TCTTTCAAGGCCTACATCGC	60	50	GTAGAAGATGCCGGTGAGGA	60	55	264
DAS735	AY525641.1	(GGCC)2	CGACTTCACCAACATCTGGA	59	50	GAATGTCTTCCATGGCTGCT	60	50	143

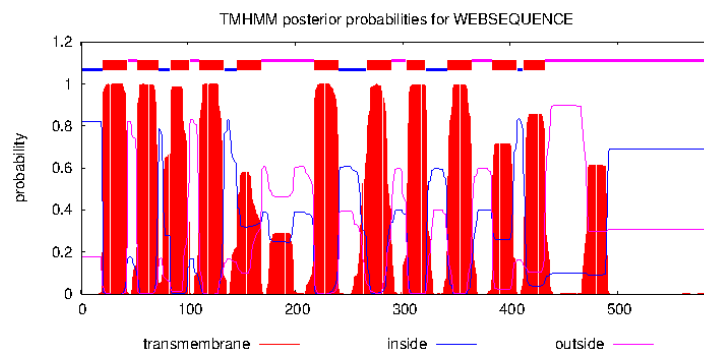


Annexe 4: Hélices transmembranaires des gènes NHX prédits chez *A. spinosa* L.

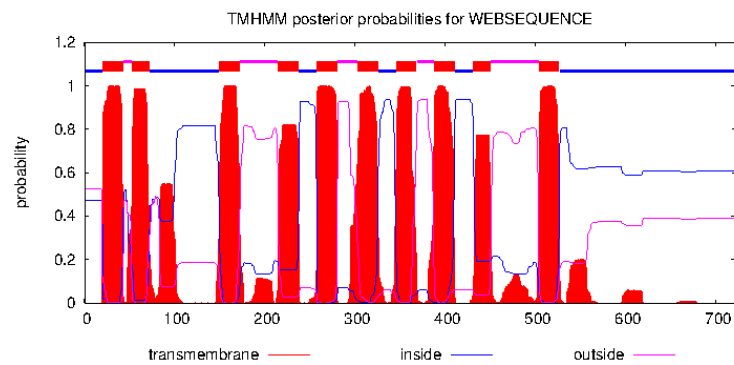
## AsNHX1



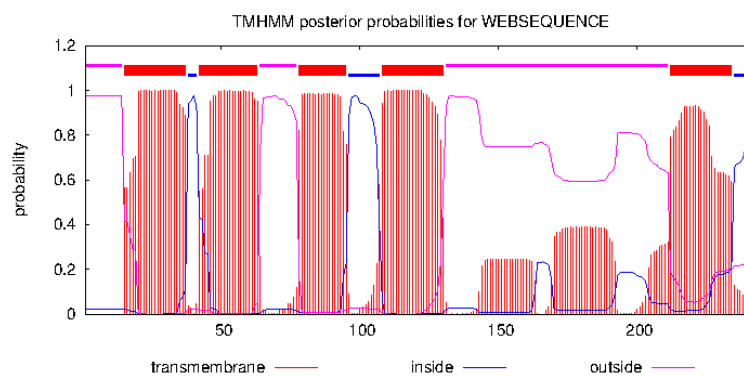
## AsNHX2



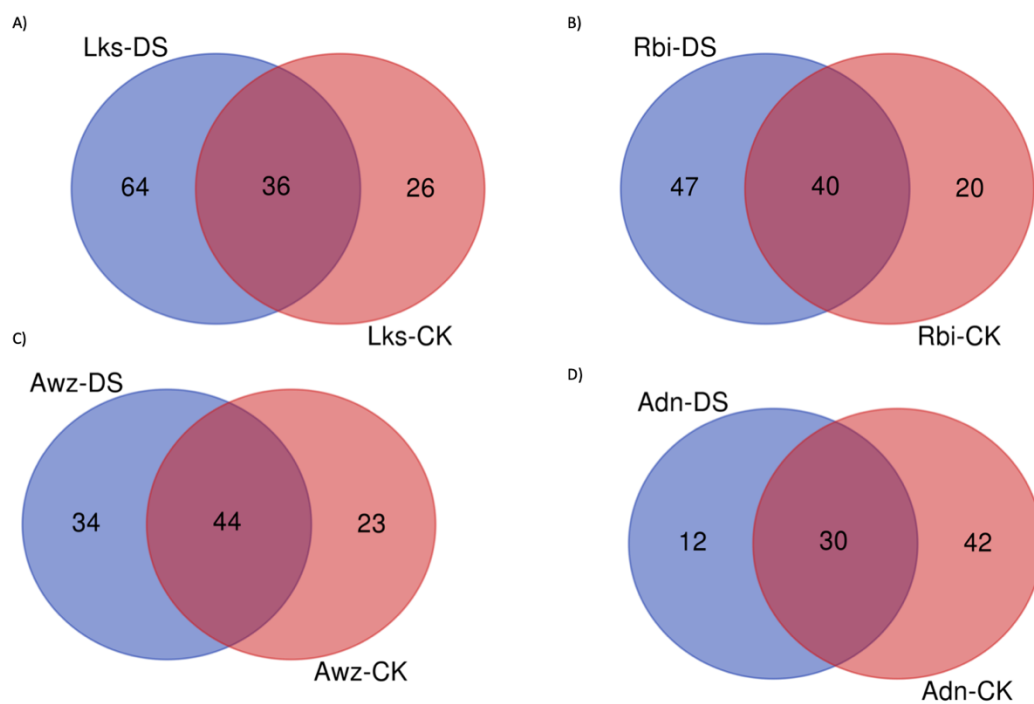
## AsNHX3



## AsNHX4



Annexe 5: Diagrammes de Venn des métabolites communs et spécifiques accumulés chez A) Lkhssas, B) Rbai, C) walouz et D) Admin



Annexe 6: Les principaux métabolites et leurs VIP, fold change et p value chez les quatre écotypes

Aoulouz					Rbai				
Metabolites	VIP	Fold Change	log2(FC)	p values	Metabolites	VIP	Fold Change	log2(FC)	p values
M7	1,8865	2,7077	1,4371	1,94816E-05	M6	2,0474	3,721	1,8957	0,057145323
M25	1,3862	1,4671	0,55299	0,48205588	M33	1,6614	2,6161	1,3874	1,43475E-07
M6	1,3444	1,8618	0,89673	6,91239E-05	M14	1,6101	2,5754	1,3648	0,005597521
M2	1,3076	1,8399	0,87964	0,002522428	M27	1,2221	1,715	0,77823	0,055894527
M4	1,2972	1,7925	0,84199	0,000584632	M57	1,1794	0,68999	-0,53535	0,97063432
M18	1,2769	1,7449	0,80316	8,5222E-08	M25	1,0627	0,6403	-0,64317	0,901152705
M14	1,233	0,55119	-0,85937	0,827472191	M4	1,0484	0,63946	-0,64508	0,031110288
M13	1,2216	0,5774	-0,79236	0,02159381	M8	1,0421	1,4963	0,58138	0,41557984
M22	1,1546	1,5163	0,60059	0,38927605	M10	0,99776	1,4268	0,51278	0,000671023
M27	0,97974	0,72745	-0,45909	0,948402677	M2	0,89251	1,3997	0,48515	0,75240624
M17	0,97584	1,4046	0,49013	0,822290702	M16	0,84012	0,73563	-0,44295	0,415642851
M12	0,84649	1,1271	0,17263	0,411711714	M21	0,81017	1,2084	0,27315	0,281144337
M16	0,72313	0,11093	-3,1723	0,505709898	M22	0,69786	1,1943	0,2562	0,003157593
M21	0,60615	0,84498	-0,24302	0,099026501	M12	0,67473	1,1216	0,16552	0,197309607
M5	0,57127	0,86961	-0,20155	0,056589143	M7	0,63744	1,2059	0,27013	0,08060983
M10	0,39704	0,7706	-0,37595	0,059524874	M11	0,53204	1,2975	0,37571	0,275077504
M8	0,37151	1,067	0,093529	0,104936118	M17	0,47088	0,85382	-0,22799	0,599022961
M11	0,29729	1,0891	0,12313	0,50549058	M15	0,39804	0,90514	-0,14379	0,063846352
M15	0,26566	0,9494	-0,074908	0,382151289	M5	0,26744	1,2693	0,34408	0,000853982
M57	0,15802	1,6398	0,71355	0,00061151	M18	0,13194	1,0811	0,11255	0,741316107
M33	0,13634	0,89529	-0,15957	0,706396384	M13	0,034045	0,67697	-0,56284	0,015633694

Admin					Lkhssas				
Metabolites	VIP	Fold Change	log2(FC)	p values	Metabolites	VIP	Fold Change	log2(FC)	p values
M5	2,3456	0,022337	-5,4844	0,000128237	M16	2,3696	31,365	4,9711	7,52224E-13
M6	1,9257	16,81	4,0712	0,053106268	M22	1,5992	3,9366	1,9769	0,013823472
M22	1,9191	0,096392	-3,3749	0,512213164	M15	1,3572	3,2271	1,6902	0,002596148
M12	1,6868	4,3609	2,1246	0,032935275	M10	1,3394	3,2184	1,6863	0,022252923
M2	1,1214	2,422	1,2762	0,002909955	M27	1,2578	0,46094	-1,1174	0,070957474
M25	0,8405	1,7356	0,79543	0,01533973	M8	1,1877	2,4094	1,2687	0,002739525
M10	0,72755	0,65357	-0,61359	0,595505129	M7	1,0994	2,1697	1,1175	0,004925821
M33	0,68491	1,5209	0,60491	0,10814321	M2	1,0096	2,0046	1,0033	0,210194493
M13	0,67895	0,77653	-0,3649	0,737532189	M6	0,93556	1,7662	0,82066	0,003321738
M18	0,52741	1,5981	0,67635	0,257641298	M5	0,92059	1,7465	0,80444	0,036488046
M27	0,3684	1,639	0,7128	0,363059279	M18	0,75938	1,1288	0,17477	0,019775847
M21	0,31299	1,4645	0,55038	0,324322061	M57	0,71146	0,69111	-0,53301	0,531115098
M8	0,28821	1,5451	0,62771	0,416217952	M33	0,65617	0,76781	-0,38118	4,73668E-06
M14	0,25679	1,3764	0,4609	0,452200073	M21	0,63742	1,4202	0,50606	0,120164558
M7	0,23279	1,0735	0,1023	0,314980131	M12	0,39453	3,7569	1,9096	0,125671424
M17	0,21399	1,3433	0,42582	0,488970405	M25	0,30428	1,0944	0,13012	0,003650858
M4	0,19204	1,2861	0,36295	0,535017649	M17	0,14259	1,1092	0,14951	0,621937864
M11	0,17157	1,2012	0,26447	0,568251261	M11	0,1377	1,7164	0,77939	3,07494E-05
M57	0,097701	0,86886	-0,20281	0,761399831	M14	0,12365	0,99857	-0,0020627	0,995879054
M15	0,0365	1,1474	0,19843	0,706232197	M4	0,12128	1,4039	0,48945	0,003954889
M16	-	-	-	-	M13	0,10319	1,026	0,037008	0,932294244

Annexe 7: Les séquences protéiques et nucléotidiques des gènes d'AQP prédits chez *A. spinosa* L.

## &gt;AsPIP1.1

MECKEEDVRLGASKFSEKQPIGTAAGGGDKDYIEPPAPFFPELGSWSFYKARIAEFMATFLFYITVLTIMGVVRSRPSKSTVGIQGIWAFAFGSMIFT  
LVYCTAGISGGHINPAVTFGLLLERKLSLTRAIFYMVMQCLGAICDAGVVKGFEGSQYEVLGDGANSVNPYTKGDGLGAEIIGTFVLVYTVFSATGA  
KRNARDFHVPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPARSLGAAIINYKEHAWNDHWIFVWGPFIGAALAALYHQVVIRAIPIFK

## &gt;AsPIP1.4

MEGREEDVRLGANKFAERQPIGTAAGGGDKDYKEPPAPLFDPEELTSWSFYRAGIAEFTATFLFYITVLTVMGVAKSPTKSTVGIQGIWAFAFGGMI  
FALVYCTAGISGGHINPAVTFGLLLANKLSLTRAIFYMVMQCLGAICGAGVVKGFQESQYEVLGGGANSVNHGYTKGDGLGAEIVGTFLVYTVFSAT  
TDAKRSARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPARSLGAAIINYKEHAWDDHWIFVWGPFIGAALAALYHQVVIRAIPIFKSK

## &gt;AsPIP1.5

MEGKEEDVTLGANKFREGQPLGTSAQTKDYTEPPAPLFEPELQSWFSYRAGIAEFMATFLFYITILTVMGVVKNNSKCATVGIQGIWAFAFGGMIFA  
LVYCTAGISGGHINPAVTFGLFLARKLSLTRAIFYMVMQCLGAICGAGVVKGFQESQYEVLGGGANSVNPYTKGDGLGAEIVGTFLVYTVFSAT  
DAKRSARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPARSLGAAIINYKDHAWDDHWIFVWGPFIGAALAALYHQVVIRAIPIFKSKA

## &gt;AsPIP2.7

MTKDVEVAEQSEFSKDYTDPPPAPLVDVEELTKWSFYRALIAEFIATLLFLYITVLTVIGYKSTQDPAKNSDQCGGVGILGIAWAFAFGGMIFILVYCTAG  
ISGKYTLNLSPSHSHHAWSGSVIATYLRGHINPAVTFGLFLGQKVSILRALMYMVAQCLGAICGVLGKGFQKSYVRYGGGANEVATGYNKGTALG  
AEIIGTFVLVYTVFSATDPRKRNARDSHVPVLAAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNVEKAWDDQWIFVWGPFIGAAIAAFYHQYILRA  
AAIKLALGSFRSNA

## &gt;AsPIP2.5

MVKEAGVAEQGSFAKDYQDPPPAPLIDPVLCQWSFYRALIAEFIATLLFLYITVLTVIGYKSTQDPAKNSDQCGGVGILGIAWAFAFGGMIFVLVYCTA  
GISGGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAVLYMVAQCLGAICGVLGKSFQKQYDYKGGANVLADGYSIGTGLAAEIIIGTFVLVYTVFSATDPRKRNARD  
HVPVLAAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSLGAAVIYDNKAWDDQWIFVWGPFIGAAIAAFYHQFILRAGA VKALGSFRSSSHV

## &gt;AsPIP2.4

MAKDVKVAEHGSFAKDYHDPAPLIDPAELTQWSFYRAIAEFIATLLFLYITVLTVIGYKSTQDPAKNPAADPCGGVGLGIAWAFAFGGMIFVLVYCTA  
TAGISGGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAVLYMVAQCLGAICGVLGKSFQKQYDYKGGANVLADGYSIGTGLAAEIIIGTFVLVYTVFSATDPRKRNARD  
RDSHVPVLAAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNHDKAWDDQWIFVWGPVIGAAIAAFYHQFILRAAAVKALGSFRSSSTRV

## &gt;AsPIP2.3

MAKEVEVGEKELPAKDYKDPAPLIDVVEELTKWSFYRALIAEFIATLLFLYISILTVIGYKSTQDPAKNSDQCGGVGILGIAWAFAFGGMIFILVYCTA  
GISGQRLDSRKKKGGHINPAVTFGLFLARKVSLIRALMYMVAQCLGAVCGVGLGKGFQKSNYVRYGGGANEVAPGYNKGTALGAEIIGTFALVYTV  
LSATDPRKRNARDSHVPVLAAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNQDKAWDDHWIFVWGPVIGAAIAAFYHQYILRASVIKALGSFRSNA

## &gt;AsPIP2.6

MAKDIEVGGGAGAGAGAGAFSTKDYQDPPPAPLIDGELTQWSFYRAIAEFIATLLFLYITVLTVIGYKSTQDPAKNTDECQGVGILGIAWAFAFGGMIF  
ILVYCTAGISGGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAIMYTV AQCLGAICGCGLVKAFQKAYVRYGGGANELSSGYSTGTGLAAEIIIGTFVLVYTVFSATDP  
KRNARDSHVPVLAAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYKKEAWDDQWIFVWGPVIGAAIAAFYHQYILRAAAVKALGSFRSSA

## &gt;AsPIP2.2

MSKEVSEEGTQHGKDYVDPAPLIDVGEQLWSFYRALIAEFIATLLFLYITVATVIGHKKQASPCDQGVGILGIAWAFAFGGMIFILVYCTAGISGGHINP  
AVTFGLFLARKVSLIRAVLYMVAQCLGAICGVLGKAFMKHDYNSLGGGANSVALGYNKGTALGAEIIGTFVLVYTVFSATDPRKRNARDSHVPVLAAP  
LPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYFNKKIWDQWIFVWGPVIGALAAAAHYQYILRAAAIKALGSFRSNPTN

## &gt;AsTIP1.1

MPHQIAGVGRPAEATHPDTRLRAGLAEFISTLIFVFAEGSGMAFNKLTNDGSTTPAGLVAASLAHAHAFGLFVA VTVGANISGGHVNPAVTFGAFVGGNIT  
LLRGIVYWIAQLLGSTVACLKLFATGGLVSIADFYICFVGVGSFVGTIVFEIVMTFGLVYTVYATAIDPKKGNVGHAPIAIGFIVGANILAGGAFDGDAS  
MNPVAVSFGPALVSWDWTNHVYVWAGPLIGGGIAGVYVELVIFSHSHEPLPGSEY

## &gt;AsTIP1.3

MIFADKLTNDGSTTPAGLVAASLAHAHAFGLFVA VAVGANISGGHVNPAVTFGAFVGGNITLLRGILYVVAQLLGSVVAACLLKLFATGGLETSAFSLSD  
VSAWNALVFEIVMTFGLVYTVYATAVDPKKNVGVIVAPIAIGFIVGANILAGGAFDGDASMNPAVSGPAAVSWTWNHVVYVWGPLIGSAAIALVYD  
NIFIGQNPHEQLPVADY

## &gt;AsTIP2.1

MPAIAFGFRFDSFSLGSVKAYLAEFISTLLFVFAVGSAMAYDKVTSDAALDPSGLVAVAICHGFALFVA VSVGSNISGGHVNPAVTFGLALGGQVTL  
SGIFYWIAQLLGSIVACYLLKVVAGGLATPIHSVAAAGIGAVEGVLTTPRRVHALLPRLLLVSLLEPTYWPPALSFSGGSMNPARSFGPAVSGDFHDNW  
IYWVGPLVGGGLAGLIYANVFMQEHGHAPLSSDF

## &gt;AsTIP3.2

MSQPRRYALGRAEEATHPDSMRATLSEFLSTFIFVFAEGSVLANKLYSETTLTASGIVMIALAHALGLFAAVAASMNVS GGHVNPAVTFGALVGGR  
VSLIRALYWLAAQLLGA VVASL LLLATPGMRPVGFAVGSVGEWNALLEIVMTFGLVYVYVYGTADPKRGLGTIAPLSIGFIVGANILVGGPFDDGA  
SMNPARAFGPALVGRWRNHVYVWGLPFVGGGLAGLIYEFGLIQSYETPPHHQHPHHPHQLAPEDY

## &gt;AsTIP2.3

MVKLAFSGSDFSIGSIRAYLAEFIATLLFVFAVGSAMAFSKLTSGAALDPAGLVAVVAHAHAFALFVGSMAANFSGGHVNPAVTFGLAIGGNITILT  
GIFYWIAQVLGSTVACLKLFATGGLVSIADFYICFVGVGSFVGTIVFEIVMTFGLVYTVYATAADPEKGLGILAPIAIGFIVGANILAAGPFSGGSMNPAR  
STGPALVSGDLSQIWIYVWGPLVGGALAGLIYGDVFIASHEPLPAPENY

## &gt;AsTIP4.1

MAKIALGDGREATQPDCLKALIVEFICTFLVFTGVGSAMASDRLLGGDSLGLFFVAAAHALVAVMISAGLRISGGHVNPAVTLGLCVGGHITVFRSI  
LYWIDQLASAAACALLKYL TGGGATPVHLAGGMNLVQGLMEGVLTFSLFTVYATVDPKGYLNLGLPQLTGFVVGANIMAGGAYSGASMNPA  
ARSFGPALVSGQWNDHWVYVWGPLVGGGLAGLIYENFFIVRSHAPLPRDDNPAF

## &gt;AsTIP5.2

MNRVSNLNAVPTSYWAMASLTSRLEHSIKPDALRSYLAEFISTLIFVFAVGSAMAAASKTVRDGATDPSNLIAMGNVAFGLSAAVYLAANISGGH  
VNPAVTFGMAVGGHISVPMIAIFYWISQLVGSIMACLLKLVATVSHVPTHGLPSEMTEFGASILEGVMTFALVYTVCAAGDPRRGMGAIGPLVIGF  
VAGANVLASGPFPTGGSMNPAVYSGSSIVGGNFKNAIYVWGPLVGAALATILYDNNVFPQLVPGIAAEGSGV





ccatgacatctccatcagaatgaccgggttgagcatccatattggaagggtgatgacattgctttggtfacacggctcgcagccggggacccgagacgggtccgatgggagcgcaccattgtaat  
cgggttgctgagcagcaacgactctgacatccggcgctttacgggtggcgaatgaccggcttactcttttcttattgttggggcaattcaagaaccggcaatctattggctggcccttggtggggct  
cgcttgctactattctcagcaacgctggttccctctcaggtgctgctgacagcaggggttgggtttaa

### >QLOD01016044.1:AsTIP2.3

atggtgaagttggcttccgtagcatcgccgactcttcagttatagggtcaatcagggtctttagccgaatttattgcgacactctcttttccgctggttgatcgctggtttatgtaagctcacatgggtgcagc  
cttggatccagcgggctggtggcggtggcgtctatgattgcaactcttgggtgtgctgatggcagccaacttcccgccgactgaaaccagctgaccttccgaltggccatcggcgcaacatccat  
cctaactggctctctattgattgacaaattcttgcctccacgctgctgctcctcccaattctgactaaatgctgactaaatgctgacgctgctgacccacgggggtgctgctgggagcagcgggttcgaggggtggtgatgga  
aatagtataacgttgcgactggtacacagctcagccacggctgacagcccgagaaagggtcctgctggaataatgcacccatcgaactgggttcatagctggtgcaacatttagccggcccttcagcggc  
ggttccatgaaccggcctgacgactgcccggccttgcagcggggattgctcagatctggaactctggtggccactgttggcgccgctggttgaataatattggtgacgtcttattgctgacacgagc  
cccttctgccccgaaaactccttag

### >QLOD01000771.1:AsTIP2.1

atgcagaccattgctttggacgtttgacattcttcagtttgggctctgcaaggcttctcggagtttactcaaccctactcttttcttctgctgagttgcttctcaatggctttagacaaggtcactcagatgctgctct  
gatccatctgggctgtgagctgtgctatttgcacattgctcttcttggctgctgctggatcacaatttccgggtgctcagctgtaaccggctgctcacttgggttggctgctggggccgggacaccatcttccagg  
catctttactggattgctcagctttagctcattgctgcttcttaccctctaaagtgtgctggtgcttggcaactctattcagatgctgctggaattggaagctggaaggtgctgacccaagaagggttcaat  
ggcagcattggcccgttctattgcttcttggagcccaatattggccggccttcttccctccggagcactgcaatgaaaccagctcgtcttttggcccggctgttagcgggtgacttccacgacaactggtatc  
actggctgaccactgctggaggtgttggctgactcattatgcaaatgttcatgagggagcagctgacactcttcaagtgacttctag

### >QLOD01023144.1:AsNIP1.5

atggctgattcaccctcagttgatgagttatgttttcccaagctaaactagtagacatccattggaaggaaagccggacaagctcaagaatcgccatcagactcggcttctcctaatactccaaaagtgtgtgc  
agagctgtgggacttacccttcttattgctgggggtggagcagcttcttggatggaaagggcttacaatggtggcagatgcaatggtgggactgcttggatgtagtatatacattcgggacatctccg  
gtcccatgttaaccctcagtcacattccttctgcttgcagattccactgacacaaagtccctgtgtatttggcccagttgctgggtgcaacactgcatgctcaccctcagggggttctccagccaagatg  
atattccccaatagttactcagttcagttcaactagcttgaagcattgcttggagttcataatcatttccactctcagttaccatctggtgggtgctagtgatcacagagcgaacaaaggatggtgagttgca  
ataggagctacagttgttfaatgcccctggtgctggccaactgagcagcacaatgaaaccctgcaaggatgagggcggcgtgctgttctggaattataaagaatctgtgggtctacgttggcccctatccttggag  
cctggcagcggcattacatacagctctctcaggtgcccgaaccagataaatcaaggacaagaacatccaaccattcaaatgacatctatctgagccataa

### >QLOD01064041.1:AsNIP7.1

atgaaaccttatttgcagaccacacactgatatttcaatgagcagcactagcagctcaactaaatgatatcatgacaagaagggtctctaatcaacatcacaacagggttagtggaataacaataatcat  
cagcaaatgagaacactgttaattgctcttcccttgggtgatgatcaaatcctccaggaaggtatgacagagcattggccacttctatttggcttctgctgactggatcatagccatcacacagctcagc  
caggagaataggacgttggaaatgagccacaggtgcttcaacagtagtagtgggtgttttctccataggagaccatctggagctcatgcaatcctgcaattacaattgcttggcagcttttggacaattccatgctcaa  
ggttcttttaccattctgacaagctcagggatcctggcaacatagttgggatggttggatgtagtggatgacataaaatcagaactgacacaccagaccactgcatgctgctcggctgcttcttgggtgagctcagc  
cttggatgctagttggtagcttccctcattgacatataagctaaatgtaggtcattgtcgggatttattgctgacagctgtaggactgcaatcagggccgatttccagggatcagcaaccccgaagctc  
gtagggccctgcaatgcttccggaattgatgtagtggattatatactgagcccaaccattggagcagttgggggtgactcctgtttcattgcttctgaccaccctctgttcaactctcacaaccccggct  
ctgccaagccaactaattctcattag

### >QLOD01062335.1:AsNIP5

atgcctgaatcggaaatcgaacccgagcgtgctgacaccggcaaccgagcagccaggtgaccgttatttcttccctgccaatgactcgttctgacgatcgaagctattgccccgatgcaagctgttgccttcc  
gacgctccaactgggggtccctcactctcctcagatctcctgacccaatgtctcactcaccgaaagggtggagcagagatttggggagcgttcatgctgatctcggcgcagacgggtccaatagtgaaac  
agaatacaacggctggagagctgatgaaatgcagcagctgctgggtggcagttacaattgtaftctgctgactgctcacatctccggagctcacttaaccctccctcacaattgcttctgctccctccgctacttcc  
catgggtccaagtccacgctacatagcagcaaatgctccctcctcctcctcaatgctgcttctcctcctcaaaaggaatttccaccccttcatctgctggtgctgactgttctcctcctgacattggcagggcttctgttgaattc  
tcattcctcaactcctcttggctcagcgttggcactgataaccggcggccttggcggatgagcaggaatagcagttggagctacgctgtaatttttggtagccggcctgtatgtgctgcaatgaaaccgg  
ttcggactctggggcagctgtgacaggaatatacctgatattgctcactgtagaccccaactcggggccctagctggtgagctatctacacagctggaagctcagggggagcagctcgaacccctcc  
tcgcaagttgagagcttccgctgtag

### >QLOD01007643.1:AsNIP1.2

atgatgctgagattcgggagcgaatgaaacatgaggtgcttgaatataaaaggtgtagataatacaaacacacttccaagctctccgccaagagcgtcagcagcagctgcttctgcttctgcttctcc  
aaaagtgtgctggaggtgttgggaacatacttctgataattgcccggctcgcgctggtggtgtaattcggccagcagaaaggtgacgctccccggaatccgtatgttgggactgcccgtgatggtgatgctac  
tcagctggccacatttccggagcccatttaccctgacacactgcttcttctcactgcaaaaggcttccggtggaacaggtgccccttcatctgctcagagctcaaaagcttcaactgctgctcagagcttcaactgctgact  
atttcaatgtaggcaagatcttggcaggaacactccagcggctccaacatgcaactgctgcttgaagtataatcacacttctacatctgctgctcagaccgataaccgagcattggagaacttg  
ctgacttccggttggcgaactgttcttaacgtgatgttggggcccaatatacagagcagcaatgaaaccagcgaagattggggccagcaattgttcaaacattacaaggcagatgatacttagtggcacc  
cgttttagggccgtatctgctgcttctcacaacatcaggttactgacaagcccttgcgtgagattccatgactggaacttctcaagggtttggatcacgcagctag

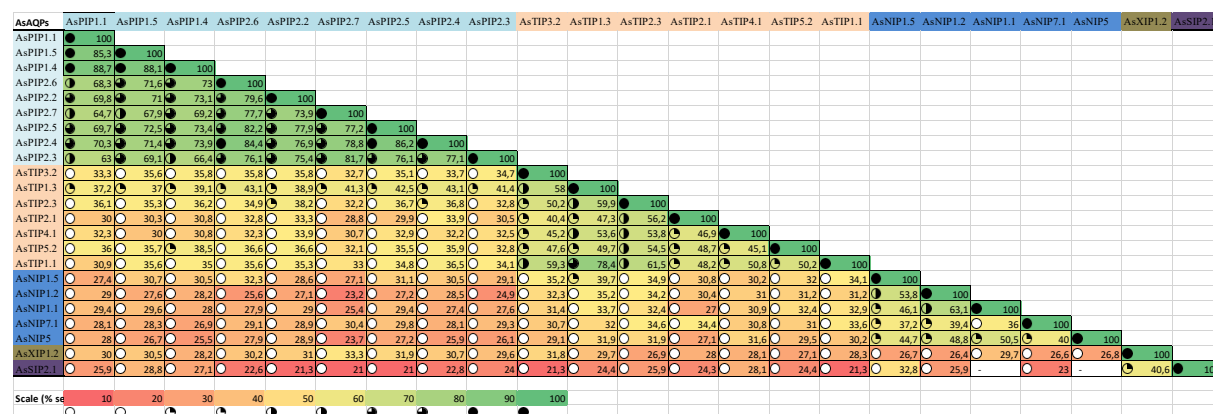
### >QLOD01007643.1:AsNIP1.1

atggctcaattctgatgaaigtgtagcaaccgtgagttgttggaggtcaaaatggtgactcaatcacaacccctcaaaagtctccgccaataaattgagaccggcctcattgctactgatttcaatgcaaaa  
gggtgatgcaagattggcgggacatactgtgataattggtgggtgctgacgggtggtgaaatttagacaagaacagaaatggtgactcttccggaattgcaattgctggggcttctgtgatgctcgttctactccct  
ggccactctccggcgcacatttaccagccctgacacactgcttcttgcacacccgcttccaggaatcaggtgccaatataattcgttcaaatattggatcaaccgctggcaagtgcaactgctgattggtattc  
agtggggagcagctatctcaggagacgttccggaagggtcagatgttcaactctctgttggaggtcaataactcttcttaattggttggctgctgattgctcactgagctgctcagagctcacaagagaaactgttgggt  
tgcattgagccacagttcagtcagattgttcttccgggttggtttccaggggcaatgaaaccgcaagaagctggggccagcaattgttgaacaaltacaaggcctgtgatatacattgtagccccactgct  
ggagccatagggggttggctgataaattctcagacactactgccaagagtgtgctcctcagaggcctgtaccagttgggtggagccagagcagaacgaaccagggagggattgccaagcagcaagaaattgtaaaat  
ctctag

### >QLOD01019018.1:AsSIP2.1

atggcttattggtgaatcagcttactgttctgattctgctatcctctcattggtgatgctggtgcttctgctgactgattgctgactgcttctgggttggacaccagcaacaaaaggggaaagcagcaaatgcgct  
cggcagatcaacatgttcttcttctgctatctggtgaaatctcacaaggggttccataactcctcaccgctttagcaaggtccactctccgggattcagccgcttctctcagcgtgctgcaagattcctgctcag  
gtcttggatattgcaagggttagctcactacgaaaccttctgaaataggacatggccaccgttgaattgctcactcaacagcgcattgacagagggattgctcacttgcattgctcactcctcactcggctt  
caagaacatccctggaaattctatgcaagactggatctccagctctccaagctcctcacttataactgttctccgatcactggtgagcatgaaaccagcactgtaattgggtgggcttattgctggggatcata  
ccacaaggagcactactgttactgcttccccagtagagcaacgtattgcaagctggtgacatttaagtctgctcggccgccaagaaagaggtgagcaaacgaagaaagaaagcagacta

Annexe 8: Matrice de similarité des séquence protéiques entre les gènes *AsAQP*



Annexe 9: Vérification de la qualité et la quantité d'ARN extrait

Code	Concentration de l'ARN (ng/μl)	Rapports	
		DO 260/280	DO 260/230
1	179,9	2,1	1,8
2	221,4	1,94	1,25
3	362,8	2,02	1,69
4	351,1	1,92	1,35
5	483,1	2,06	2,15
6	429,4	2,13	2,02
7	160,6	2,1	2,16
8	221,8	2,12	2
9	299,4	2,08	1,68
10	397,7	2,2	1,91
11	66,3	2,1	1,83
12	107	2,2	1,72
13	120,2	2,1	1,83
14	330,5	2,14	2,02
15	160,3	2,04	1,38
16	220,2	2,02	1,36

## RESUME

L'arganier (*Argania spinosa* L.) a développé au cours de son évolution, des pouvoirs d'adaptation en modulant et ajustant divers mécanismes. Leur élucidation reste la clé pour la sauvegarde de cette espèce, sa préservation face aux changements climatiques et son amélioration *via* des programmes de sélection assistée par des marqueurs identifiés. La présente recherche a pour but d'évaluer la capacité d'adaptation d'écotypes d'arganier à travers l'étude de leur comportement physiologique, biochimique, métabolomique et génomique, sous l'effet de stress abiotique. Suite à une investigation *in silico*, différents marqueurs SSR adéquats associés aux gènes aquaporines ont été développés pour la sélection d'arganiers adaptés au changement climatique. Par-ailleurs, l'étude des gènes candidats par exploration du draft du génome d'arganier publié a porté sur deux membres de famille des gènes : Aquaporines et NHXs. Un total de 23 gènes putatifs codant pour l'aquaporine (AQPs) ont été identifiés et ils sont subdivisés en cinq sous-familles distinctes. Le nombre d'exon varie de 3 à 5 selon les membres d'AQPs. Tous les membres d'AQPs possèdent deux domaines conservés 'NPA' (Asparagine/Proline/Alanine) et dont la fonction est identifiée chez plusieurs espèces végétales. En ce qui concerne les antiporteurs NHX, 4 gènes ont été prédits et identifiés. La longueur de leur séquence protéique et leur masse moléculaire varient de 243 acides aminés (26.87 KD) à 721 (80.39 kD), respectivement pour les protéines AsNHX4 et AsNHX3. Les hélices transmembranaires varient de 5 à 11 hélices.

L'étude du comportement de l'arganier sous stress hydrique, des plantules d'arganier issues de quatre régions contrastées ont été soumises à trois traitements d'eau (100%, 50% et 25% de la capacité au champ) et un arrêt total de l'irrigation (0% CC) pendant 45 jours. Au niveau physiologique et biochimique, des différences significatives ont été observées pour chaque trait. En condition de stress hydrique (0% CC), nous avons enregistré une augmentation significative des osmolytes (sucre soluble et proline) et de la composition phénolique. Sur le plan métabolomique, le stress hydrique a induit des changements significatifs des métabolites lipidomiques notamment les acides gras. Ainsi, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide arachidique, l'acide linoléique et l'acide alpha-linolénique ont montré une accumulation significative principalement chez l'écotype 'Lkhssas', sous contrainte hydrique (0% CC). Sur le plan génomique, 9 gènes codant pour l'aquaporine ont été choisis en vue d'évaluer l'expression différentielle des transcrits en réponse au stress hydrique. Ces études sont en cours.

**Mots-clés :** *Argania spinosa* L., AQP, NHX, stress hydrique et salin, *In silico*, Génomique et Métabolomique.

## ABSTRACT

The argan tree (*Argania spinosa* L.) has developed during its evolution, adaptation strategies by modulating and adjusting previous mechanisms. Their elucidation remains the key to the preservation and survival of argan trees in the face of climate change via selection programs assisted by identified markers. The goal of this study is to assess the adaptability of argan tree ecotypes by studying their physiological, biochemical, metabolomic, and genomic behavior under abiotic stress. Following an *in silico* investigation, various appropriate SSR markers associated with aquaporin genes have been developed for the selection of argan trees adapted to climate change. The study of candidate genes by exploring the draft of the published argan genome focused on two members gene family: aquaporins and NHXs. A total of 23 putative genes coding for aquaporin (AQPs) have been identified and they are subdivided into five distinct subfamilies. The number of exons varies from 3 to 5 depending on the members of AQPs. Two conserved "NPA" (Asparagin/Proline/Alanine) domains shared by all AQP members have been linked to specific functions in several plant species. Four genes have been predicted and identified in relation to NHX antiporters. The length of their protein sequence and their molecular mass vary from 243 amino acids (26.87 KD) to 721 (80.39 kD), respectively for AsNHX4 and AsNHX3 proteins. Transmembrane helices range from 5 to 11 helices.

Argan tree seedlings from four distinct areas were grown in four different conditions (100%, 50%, and 25% of the field capacity) and cease complete irrigation (0% FC) for 45 days in order to evaluate their behavior under drought stress. At physiological and biochemical level, significant differences were observed for each trait. Under water stress conditions (0% FC), we recorded a significant increase in osmolytes (soluble sugars and proline) and phenolic compounds. Water stress caused considerable alterations in lipidomic metabolites, particularly fatty acids, at the metabolomic level. Thus, under conditions of water stress (0% FC), large accumulations of palmitic acid, stearic acid, arachidic acid, linoleic acid, and alpha-linolenic acid were recorded, particularly in the 'Lkhssas' ecotype. To assess the differential transcript expression in response to hydric stress at the genome level, 9 genes encoding aquaporin were selected. These studies are ongoing.

**Keywords :** *Argania spinosa* L., AQP, NHX, drought and salt stress, *In silico*, Genomic and Metabolomic.