



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Biologie*

Présentée et soutenue par *Fatma LAZREK - BEN FRIHA*
Le *29 Septembre 2008*

Titre : *Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin*

JURY

ARLAT Matthieu - Président de jury
LEPRINCE Olivier- Rapporteur
TRIFI-FARAH Neila- Rapporteur
CHARDON Fabien - Examineur
GENTZBITTEL Laurent - Examineur
SALHI-HANNACHI Amel - Examineur
HUGUET Thierry - Directeur de thèse
/ Mohamed Elarbi AOUANI

Ecole doctorale : *ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE-BIOTECHNOLOGIES*
Unité de recherche : *Laboratoire Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM)*
Directeur(s) de Thèse : *Thierry HUGUET / Mohamed Elarbi AOUANI*
Rapporteurs : *LEPRINCE Olivier / TRIFI-FARAH Neila*

Dédicace

Cette thèse représente l'aboutissement du soutien et des encouragements que mes parents m'ont prodigués tout au long de ma scolarité.

La patience et l'encouragement de mon mari m'ont aidé à surmonter toutes les difficultés rencontrées au cours de cette thèse.

A mes deux enfants SALAH et YOUSSEF

Remerciements

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse: Olivier LEPRINCE et Neila TRIFI pour leur lecture de ce manuscrit, Amel HANNACH, Fabien CHARDON, et Laurent GENTZBITTEL pour leur participation au jury. Je remercie Matthieu ARLAT pour tous ses efforts et sa contribution au bon déroulement des procédures administratives aboutissant à la soutenance de ma thèse qui de plus m'a fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

Les travaux de ma thèse étaient financés par une bourse BDI-PED (Bourse Docteur Ingénieur – Pays en développement) qui m'a été attribuée par le CNRS pour une période de trois ans.

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité de mon directeur de thèse, Monsieur Thierry HUGUET, Directeur de Recherche au CNRS, que je veux particulièrement remercier. Je voudrais aussi le remercier pour le temps et la patience qu'il m'a accordés tout au long de ces années, d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir fourni d'excellentes conditions de travail au sein de son équipe à l'INRA et par la suite à l'ENSAT. De plus, les conseils qu'il m'a procurés tout au long de la rédaction, ont toujours été clairs et enrichissants, me facilitant grandement la tâche et me permettant la finalisation de cette thèse.

J'adresse mes plus sincères remerciements au professeur Mohamed Elarbi AOUBANI, directeur du réseau africain des sciences biologiques du NEPAD (Nouveau partenariat pour le développement de l'Afrique) et directeur du laboratoire de recherche du technopôle de Borj Cédria, qui en agissant à titre de co-directeur a fortement aidé à l'aboutissement de cette thèse. Ses conseils et ses commentaires m'ont été fort utiles.

Je remercie Joelle RONFORT aussi bien pour les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec elle, ses suggestions et sa contribution au démarrage de mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier David BARKER pour son suivi, en étant membre de mon comité de thèse, et ses conseils tout au long de ces années.

Je pense ici en particulier à Fabien CHARDON, à qui la majorité du travail sur la recherche des QTL est due.

Valérie ROUSSEL m'a bien aidée avec ses connaissances et son sérieux à finaliser mon article de thèse.

Je n'oublierais pas les aides permanentes reçues du personnel administratif et technique de l'INRA.

J'adresse mes remerciements, pour la sympathie qu'ils m'ont témoignée, à Michèle Gérardi, Philippe THOQUET et Gaëlle CARDINET.

Merci aussi à tous mes collègues et amis du LIPM et LILM. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite beaucoup de bien.

Enfin, une pensée émue pour tous les étudiants avec qui j'ai partagé une salle, un café, un repas ou une console d'ordinateur pendant mes années de recherche à l'INRST et les trois années passées à l'INRA.

Cette thèse m'a donné l'occasion de rencontrer et de travailler avec des personnes absolument épatantes. Il est difficile de leur dire ici à quel point j'ai été touchée par tout ce qu'ils ont fait pour moi.

A. Introduction et contexte de l'étude **19**

I. LES LEGUMINEUSES :	19
I.1. PRESENTATION GENERALE DES LEGUMINEUSES	19
I.2. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES LEGUMINEUSES	22
I.2.1. Importance de l'azote dans la nutrition des plantes	22
I.2.2. Fixation biologique de l'azote	23
I.2.3. Etablissement de la symbiose fixatrice de l'azote	23
I.2.3.a. Taxonomie des rhizobium	23
I.2.3.b. Les étapes de la nodulation	24
I.2.3.c. Structure des nodules indéterminés	27
I.2.3.d. Régulation du nombre de nodules	30
I.2.3.e. Spécificité symbiotique	30
I.2.4. Intérêt de la fixation symbiotique d'azote	30
I.2.5. Haute teneur en protéines	31
I.2.6. Métabolites secondaires	31
I.2.7. Importance des légumineuses dans les systèmes de culture	32
I.2.8. Autres	32
I.3. SITUATION DES LEGUMINEUSES CULTIVEES EN TUNISIE	33
I.3.1. Les légumineuses alimentaires	33
I.3.2. Les fourrages	34
I.4. LE MILIEU NATUREL TUNISIEN	36
I.5. SITUATION DES RESSOURCES NATURELLES DES LEGUMINEUSES EN TUNISIE ET AU MAGHREB	37
I.6. BESOIN D'UNE PLANTE MODELE DES LEGUMINEUSES	38
II. LA PLANTE MODELE : <i>M. TRUNCATULA</i>	40
II.1. INTERET BIOLOGIQUE	40
II.2. INTERET AGRONOMIQUE	40
II.3. INTERET GENETIQUE	41
II.4. SYNTENIE AVEC LES LEGUMINEUSES	41
II.5. LES RESSOURCES NATURELLES CHEZ <i>M. TRUNCATULA</i>	42
II.6. OUTILS GENETIQUES ET GENOMIQUES DISPONIBLES	44

II.6.1. Microsatellites	45
II.6. 2. Microarrays et analyse du transcriptome	45
II.6.3. Collections de variants naturels et de mutants	46
II.6.4. Mutagenèse insertionnelle	46
II.6.5. Cartes génétiques, physique et cytogénétique	46
II.6.6. Séquençage et Annotation du génome	47
II.7. LES PROGRAMMES INTERNATIONAUX	47
II.8. RESSOURCES BIOINFORMATIQUES POUR <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i>	48

B. Objectifs du travail **49**

C. Contexte du travail **49**

Chapitre 1 **50**

Diversité génétique des lignées de *M. truncatula* **50**

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE: DIVERSITÉ NATURELLE DES PLANTES, INTÉRÊTS ET UTILISATIONS	51
I.1. BIODIVERSITÉ ET VARIATIONS NATURELLES	51
I.2. LA CONSERVATION DES RESSOURCES GÉNÉTIQUES: LES COLLECTIONS	52
I.3. DIVERSITÉ NATURELLE DES LÉGUMINEUSES EN TUNISIE	53
I.4. UTILISATION DE LA DIVERSITÉ NATURELLE POUR L'AMÉLIORATION DE LA TOLÉRANCE AU SEL	53
II. MÉTHODOLOGIES	54
II.1. ANALYSE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE	54
II.1.1. Caractérisation de la diversité naturelle	54
II.1.1.1. Marqueurs morphologiques	54
II.1.1.2. Allozymes	55
II.1.1.3. Marqueurs neutres	55
II.1.2. Paramètres d'analyse de la diversité	56
II.1.2.1. Hétérozygotie (H0)	56
II.1.2.2. Déséquilibre de liaison (DL)	56

II.1.2.3. Indices de diversité	57
II.1.2.4. ACP et AFC	58
II.1.2.5. Test sur permutations	59
II.1.2.6. Isolement par la distance (test de Mantel)	59
II.2. CORRELATIONS DE LA DIVERSITE GENETIQUE AVEC LES CONDITIONS ECOGEOGRAPHIQUES	60
II.3. CORRELATION ENTRE LA DIVERSITE MOLECULAIRE ET PHENOTYPIQUE	61
III. MATERIEL & METHODES	61
III.1. CONSTITUTION DE LA COLLECTION TUNISIENNE DE <i>M. TRUNCATULA</i>	61
III.1.1 Mode de collecte	62
III.1.2. Choix des sites de collecte	62
III.1.3. Obtention des lignées	62
III.2. FLORAISON	65
III.5. LES MARQUEURS MICROSATELLITES	65
IV. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DE LIGNEES DE <i>M. TRUNCATULA</i>	66
IV.1. LES CARACTERES RELEVES	66
IV.2. LA FLORAISON	66
IV.3. EFFET DES CARACTERES RELEVES SUR LA DIVERSITE	72
IV.4. GROUPEMENT DES POPULATIONS	72
IV.5. CORRELATIONS ENTRE CARACTERES MORPHOLOGIQUES	76
IV.5. CORRELATIONS ENTRE CARACTERES MORPHOLOGIQUES	77
IV.6. CORRELATIONS MORPHOLOGIE / ENVIRONNEMENT	77
V. DIVERSITE GENETIQUE DES LIGNEES DE <i>M. TRUNCATULA</i> REVELEE PAR MICROSATELLITES	80
V.1. INTRODUCTION A L'ARTICLE	80
V.2. ARTICLE	80
V.3. INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES ET CONCLUSIONS A L'ARTICLE	93
VI. CORRELATIONS	96
VI.1. CORRELATION DIVERSITE GENETIQUE / MOTIF MICROSATELLITE	96
VI.2. CORRELATIONS PHENOTYPE/GENOTYPE	96
VI.3. CORRELATIONS PARAMETRES GENETIQUES ET ECO-GEOGRAPHIQUES	96
VII. DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES	98
<i>Chapitre 2</i>	102

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE: TOLÉRANCE AU SEL DES LEGUMINEUSES	103
I.1. PROBLÈME DE LA SALINITÉ DES SOLS	103
I.2. EFFET DE LA SALINITÉ SUR LES PLANTES	104
I.2.1. Les mécanismes touchés par la salinité	105
I.2.2. Les stratégies d'adaptation	105
I.2.2.1. Homéostasie cellulaire	105
I.2.2.2. Séquestration du sodium dans des vacuoles	105
I.2.2.3. Prélèvement de K ⁺	106
I.2.2.4. Biosynthèse d'osmoprotectants	106
I.2.2.5. Synthèse de protéines induites par le sel	106
I.2.2.6. Synthèse d'antioxydants	107
I.2.2.7. Régulation de croissance	107
I.2.3. Limites de la physiologie	107
I.3. LES LEGUMINEUSES ET LA SALINITÉ	108
I.3.1. Le niveau de tolérance des légumineuses	108
II. MATÉRIEL & MÉTHODES	109
III. TOLÉRANCE AU SEL DE DIFFÉRENTES LIGNÉES DE <i>M. TRUNCATULA</i>	110
III.1. Croissance sous alimentation en KNO ₃	111
III.1.1. Matière sèche des parties aérienne	111
III.1.2. Longueurs des tiges	113
III.1.3. Efficacité d'utilisation de l'azote minéral	114
III.1.4. Comparaisons entre les paramètres analysés	119
III.2. En symbiose	120
III.2.1. Diversité symbiotique naturelle	120
III.2.2. Impact du sel sur la symbiose : exemple de la souche 2011	120
III.2.3. Impact du sel sur la symbiose : Etude de la combinaison lignée * sel	128
III.3. Variation de la tolérance des lignées de <i>M. truncatula</i> en fonction de la source d'alimentation azotée	128
III.4. Analyse de plusieurs lignées inoculées par plusieurs souches de <i>Rhizobium</i>	128

IV. EFFET DE L'AVG SUR LA REPOSE AU SEL DES ASSOCIATIONS SYMBIOTIQUES	136
V. EFFET DU STRESS SALIN SUR LES POPULATIONS D'ORIGINE CONSTITUANT LA COLLECTION TUNISIENNE DE <i>M. TRUNCATULA</i>	139
V.1. Matériel végétal et conditions de culture	143
V.2. Analyse globale des populations	143
V.2.1. Allongement des tiges	143
V.2.2. Production de matière sèche des parties aériennes	143
V.3. Variation de réponse au sel à l'intérieur des populations	145
V.4. Variation de réponse au sel entre populations	157
VI. DISCUSSIONS ET CONCLUSION GENERALES	165

Chapitre 3 **170**

Bases génétiques de la tolérance au stress salin **170**

I. INTRODUCTION	171
LES QTLs DE SALINITE	172
II. METHODOLOGIES DE DETECTION DES QTL : L'ETUDE DU CONTROLE GENETIQUE DES CARACTERES COMPLEXES	173
II.1. METHODES	174
II.1.1. Populations en ségrégation	174
II.1.2. Carte génétique	176
II.1.3. Phénotypage d'une population	176
II.1.4. Effet environnement	177
II.2. MODELES ET OUTILS DE RECHERCHE DE QTLs	179
II.2.1. METHODES	179
II.2.1.1. Méthode Marqueur par marqueur	179
II.2.1.2. Cartographie d'intervalle	180
III.2.1.2.1. IM Interval Mapping	180
III.2.1.2.2. Cartographie d'intervalle composite: CIM Composite Interval Mapping	181
III.2.1.2.3. MIM Multiple Interval Mapping	181
II.2.2. PUISSANCE ET FIABILITE DES ANALYSES STATISTIQUES DANS LA RECHERCHE DE QTL	182
II.2.3. PARAMETRES ESTIMEES LORS D'UNE RECHERCHE DE QTL	183
II.2.2.3.1. Intervalle de confiance du QTL: IC	183

II.2.2.3.2. Effet du QTL	183
II.3. PUISSANCE DE DETECTION DE QTLs	184
II.3.1. Effectif de la population	184
II.3.2. Densité des marqueurs génétiques	184
II.3.3. Héritabilité du caractère / R^2 du QTL	184
II.3.4. Autres facteurs	185
III. MATERIEL & METHODES	185
III.1. CROISEMENTS	185
III.2. CARTE GENETIQUE	187
III.3. DISPOSITIF EXPERIMENTAL	187
III.3.1. Phénotypage des lignées	187
III.4. ANALYSES STATISTIQUES POUR LA LOCALISATION DE QTL	188
III. Mises au points des conditions de culture	190
IV. Analyse de la population RIL	190
<i>Distribution de la variabilité phénotypique</i>	192
<i>Héritabilités</i>	196
<i>Corrélations entre caractères</i>	199
<i>Localisation de QTLs</i>	199
DISCUSSIONS ET CONCLUSION GENERALES	206
<u>Synthèse générale et perspectives</u>	<u>209</u>
<u>Références Bibliographiques</u>	<u>215</u>

Abréviations

ACP	Analyse factorielle en Composantes Principales
AFC	Analyse Factorielle de Correspondance
AMOVA	Analysis of Molecular Variance
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
EAA	Efficacité d'Assimilation de l'Azote
EFA	Efficacité de Fixation de l'Azote
EST	Expressed Sequence Tagged
I50	La valeur à partir de laquelle on a 50% d'inhibition
LOD	Logarithm of the Odds Ratio
LT	Longueur des Tiges
MSA	Matière Sèche des parties Aériennes
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pop	Population
QTL	Quantitative Trait Locus
RIL	Recombinant Inbred Line
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
YEMA	Yeast Extract Mannitol Agar

Liste des figures

FIGURE 1: CLASSIFICATION DES LEGUMINEUSES DE LA FAMILLE DES PAPILIONOIDEAE	20
FIGURE 2: DIALOGUE MOLECULAIRE ENTRE LA PLANTE ET LA BACTERIE LORS DE LA MISE EN PLACE D'UNE ASSOCIATION SYMBIOTIQUE FIXATRICE D'AZOTE.	26
FIGURE 3: LES DEUX TYPES DE NODULES FIXATEURS D'AZOTE.	28
FIGURE 4: STRUCTURE CELLULAIRE D'UN NODULE DE TYPE INDETERMINE.	29
FIGURE 5 : EMBLEMMENT DES SITES DE LA COLLECTION TUNISIENNE DE <i>M. TRUNCATULA</i> .	63
FIGURE 6 : POLYMORPHISME DES FEUILLES (FORME, COULEUR, TACHES FOLIAIRES, ET CRANTAGE) POUR 4 POPULATIONS TUNISIENNES DE <i>M. TRUNCATULA</i> : ENFIDHA (VERT), JELMA (ROSE), AMRA (BLEU), ET MAJEL BEL ABBES (JAUNE).	68
FIGURE 7 : POLYMORPHISME DU PORT DES PLANTES: ERIGE POUR LA MAJORITE DES POPULATIONS (EXEMPLE JELMA) ET RAMPANT, CARACTERISTIQUE DE LA POPULATION DE THALA.	69
FIGURE 8 : DATE DE FLORAISON POUR LES 10 POPULATIONS DE <i>M. TRUNCATULA</i> EN DEUX CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES DIFFERENTES EN FRANCE ET EN TUNISIE.	71
FIGURE 9 : POIDS FACTORIEL: INFLUENCE DES CARACTERES MORPHOLOGIQUES (VOIR NOTATIONS AU TABLEAU I.1) SUR LES DEUX FACTEURS PRINCIPAUX DE L'ACP, FACT1 ET 2.	73
FIGURE 10 : REPARTITION DES POPULATIONS TUNISIENNES DE <i>M. TRUNCATULA</i> SUR LE PLAN BIDIMENSIONNEL DE L'ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES (ACP).	74
FIGURE 11 : DISTANCES D'AGREGATION (METHODE DE WARD) ENTRE LES POPULATIONS NATURELLES DE <i>M. TRUNCATULA</i> BASEES SUR LES DISTANCES EUCLIDIENNES POUR LES CARACTERES MORPHOLOGIQUES	76
FIGURE 12: UN EXEMPLE DE POLYMORPHISME DETECTE POUR TROIS POPULATION DE <i>M. TRUNCATULA</i> ET LA LIGNEE DE REFERENCE J6 (JEMALONG) AVEC LE MICROSATELLITE MTIC 564.	94
FIGURE 13 : ASSOCIATION ENTRE LES 136 INDIVIDUS DE LA COLLECTION TUNISIENNE DE <i>M. TRUNCATULA</i> SELON UNE AFC BASEE SUR 18 SSR. CHAQUE AXE (1 ET 2) REPRESENTE RESPECTIVEMENT 9.68 ET 7.85 % DE LA DIVERSITE DES MICROSATELLITES.	94
FIGURE 14: REPARTITION DE LA FREQUENCE DES DISTANCES GENETIQUES ENTRE LES INDIVIDUS DE CHAQUE POPULATION DE <i>M. TRUNCATULA</i>	95
FIGURE 15 : RELATION ENTRE LE NOMBRE DE REPETITION DU MOTIF MICROSATELLITE (DI ET TRI NUCLEOTIDIQUES SONT REPRESENTES SEPAREMENT) ET LA MOYENNE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DES POPULATIONS DE LA COLLECTION TUNISIENNE DE <i>M. TRUNCATULA</i> .	97

FIGURE 16: ARBRE PHYLOGENETIQUE NEIGHBOR-JOINING CONSTRUIT AVEC LES DONNEES DE LA MATRICE DES DISTANCES GENETIQUES DE NEI DES 10 POPULATIONS DE <i>M. TRUNCATULA</i> .	99
FIGURE 17: MATIERE SECHE AERIENNES DES LIGNEES SANS AJOUT D'UNE SOURCE D'AZOTE DANS LE MILIEU DE CULTURE	112
FIGURE 18: POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA MATIERE SECHE AERIENNE SOUS ALIMENTATION AZOTEE POUR CHAQUE LIGNEE ETUDIEE A 15, 30, 45, 60, 75 ET 90MM DE SEL.	116
FIGURE 19: POURCENTAGE D'INHIBITION DE L'ALLONGEMENT DES TIGES SOUS ALIMENTATION AZOTEE POUR CHAQUE LIGNEE ETUDIEE A 15, 30, 45, 60, 75 ET 90 MM DE SEL.	117
FIGURE 21: NOMBRE DE NODULES PAR PLANTE A 60 JOURS POUR LES DIFFERENTES LIGNEES DE <i>M. TRUNCATULA</i> EN ABSENCE DE SEL ET EN PRESENCE DE 15, 30, 45, 60, 75 ET 90 MM DE SEL.	123
FIGURE 22: POURCENTAGE DE NODULATION A 60 JOURS APRES INOCULATION PAR RAPPORT AU TEMOIN POUR CHAQUE LIGNEE INOCULEE PAR LA SOUCHE 2011 ET A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE SEL	124
FIGURE 23: EFFET DU SEL (60 MM DE NA ₂ CO ₃) SUR LA CINETIQUE DE NODULATION DES DIFFERENTES LIGNEES DE <i>M. TRUNCATULA</i> PAR LA SOUCHE 2011 EN FONCTION DU TEMPS.	125
FIGURE 24: POURCENTAGE DE LONGUEUR DES TIGES PAR RAPPORT AU TEMOIN POUR CHAQUE LIGNEE INOCULEE PAR LA SOUCHE 2011 ET A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE SEL.	125
FIGURE 25: POURCENTAGE DE MATIERE SECHE AERIENNE PAR RAPPORT AU TEMOIN (SANS SEL) POUR CHAQUE LIGNEE INOCULEE PAR LA SOUCHE 2011 ET A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE SEL	126
FIGURE 26: POURCENTAGE DU PARAMETRE EFA PAR RAPPORT AU TEMOIN POUR CHAQUE LIGNEE EN SYMBIOSE AVEC LA SOUCHE 2011 ET A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE SEL	127
FIGURE 27: EXEMPLE DE DIVERSITE DE NODULATION EN PRESENCE DE 60 MM DE SEL: CINETIQUE DE NODULATION EXPRIMEE EN POURCENTAGE PAR RAPPORT AU TEMOIN SANS SEL POUR LES LIGNEES JEMALONG, DZA315.16 ET F83005.5 AVEC DIFFERENTES SOUCHES.	131
FIGURE 28: POURCENTAGE DE DIMINUTION DE LONGUEUR DES TIGES EN PRESENCE DE 60 MM DE SEL POUR CHAQUE ASSOCIATION PAR RAPPORT AU TEMOIN SANS SEL.	133
FIGURE 29: POURCENTAGE DE MSA EN PRESENCE DE 60 MM DE SEL POUR CHAQUE ASSOCIATION PAR RAPPORT AU TEMOIN SANS SEL.	133
FIGURE 30: POURCENTAGE DE L'EFA EN PRESENCE DE 60 MM DE SEL POUR CHAQUE ASSOCIATION PAR RAPPORT AU TEMOIN SANS SEL.	134

FIGURE 31: CORRELATION ENTRE EFA EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE SEL POUR LES DIFFERENTES ASSOCIATIONS SYMBIOTIQUES.	135
FIGURE 32: NODULATION (NOD/PLANTE) DE JEMALONG AVEC PLUSIEURS SOUCHES DE DIFFERENTES ORIGINES	137
FIGURE 33: ALLONGEMENT DES TIGES (CM) DE JEMALONG AVEC PLUSIEURS SOUCHES DE DIFFERENTES ORIGINES	138
FIGURE 34: PRODUCTION DE MATIERE SECHE AERIENNE (MG) DE JEMALONG AVEC PLUSIEURS SOUCHES DE DIFFERENTES ORIGINES	138
FIGURE 35: COMPORTEMENT DES LIGNEES DE <i>M.TRUNCATULA</i> PAR RAPPORT A LA NODULATION AVEC LA SOUCHE 2011 EN PRESENCE D'AVG (0.3 μ M) DANS LE MILIEU EN CONDITIONS CONTROLES ET EN PRESENCE DE 60 MM DE NA _{CL} .	140
FIGURE 36: POURCENTAGE DE NODULATION DE LA LIGNEE TN6.18 INOCULEE PAR LA SOUCHE 2011 EN ABSENCE D'AVG, EN PRESENCE DE 0.5 ET 1 μ M D'AVG, ET EN CONDITIONS CONTROLES.	142
FIGURE 37: EFFET DU SEL SUR LES PARAMETRES LONGUEUR DES TIGES ET MATIERE SECHE AERIENNE EN CULTURE SUR 3MM D'AZOTE (KNO ₃) CHEZ LES 10 POPULATIONS NATURELLES DE <i>M. TRUNCATULA</i>	144
FIGURE 38: A: DISTRIBUTION DES FREQUENCES (EN POURCENTAGE) DES INDIVIDUS DES POPULATIONS DE <i>M.TRUNCATULA</i> POUR LA LONGUEUR DES TIGES CULTIVES SUR AZOTE MINERAL EN CONDITIONS CONTROLES ET EN PRESENCE DE 60 MM DE SEL.	147
FIGURE 39: POURCENTAGE D'INHIBITION PAR 60MM DE NA _{CL} DES POPULATIONS TUNISIENNES POUR LES DEUX CARACTERES LONGUEUR DES TIGES (LT) ET PRODUCTION DE MATIERE SECHE AERIENNE (MSA).	158
FIGURE 40 : REPRESENTATION DU RENDEMENT EN LONGUEUR DES TIGES (L60/L0) EN FONCTION DE CELLE EN MSA (M60/M0) SOUS L'EFFET DE 60MM DE SEL.	159
FIGURE 41: LIGNEES RECOMBINANTES. CHAQUE PAIRE DE CHROMOSOMES SCHEMATISE LA STRUCTURE DU GENOME D'UNE PLANTE. LES PORTIONS (NOIRES OU BLANCHES) REPRESENTENT LES CONTRIBUTIONS DES LIGNEES PARENTALES	175
FIGURE 42: REPRESENTATION DE DIFFERENTES POSSIBILITES DE COMBINAISON DES EFFETS DU GENOTYPE ET DU MILIEU.	178
FIGURE 43: CROISEMENTS REALISES ENTRE COUPLES DE LIGNEES DE <i>M. TRUNCATULA</i> ET DONT LEUR DESCENDANCE EST AU STADE F2 OU RIL.	186
FIGURE 44 : GERMINATION DES GRAINES DE LA GENERATION F2 ISSUES DU CROISEMENT X07 ENTRE TN6.18 ET JEMALONG.	186
FIGURE 45: SYSTEME DE CULTURE DES PARTIES AERIENNES: LA PLANTE TN8.20 APRES 60 JOURS DE MISE EN TUBES EN ABSENCE DE SEL ET EN PRESENCE DES CONCENTRATIONS DE 15, 30, 45, 60, 75 ET 90 MM DE NA _{CL} .	189
FIGURE 46: SYSTEME DE CULTURE DES PARTIES RACINAIRES: LA PLANTE JEMALONG APRES 7 JOURS DE MISE EN BOITES EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE 100 MM DE NA _{CL} .	189

FIGURE 47: VITESSE D'ALLONGEMENT DES RACINES DE J6 EN PRESENCE DE 0, 50, 75, ET 100 MM DE NAACL APRES 7 JOURS DE MISE DANS LES BOITES DE PETRI.	191
FIGURE 48: FREQUENCE DE LA DISTRIBUTION DES LIGNEES LR5 POUR LES CARACTERES DE LA CROISSANCE DE LA PARTIE AERIENNE.	194
FIGURE 50: LOCALISATION DES QTL DETECTES SUR LA CARTE GENETIQUE DE LR5	204

Liste des tableaux

TABLEAU 1: COMPOSITION DES RESERVES DE QUELQUES GRAINES D'ESPECES CULTIVEES.	21
TABLEAU 2: SPECIFICITE DE LA SYMBIOSE RHIZOBIUM / LEGUMINEUSE	25
TABLEAU 3: SURFACES CULTIVEES OCCUPEES PAR LES LEGUMINEUSES ALIMENTAIRES EN TUNISIE	33
TABLEAU 4: DISTRIBUTION DES POPULATIONS DE M. TRUNCATULA COLLECTEES DANS DIFFERENTS PAYS ET COMPOSANT LES COLLECTIONS MONDIALES EXISTANTES	43
TABLEAU 5: CARACTERISTIQUES CLIMATIQUES ET PEDOLOGIQUES POUR LES SITES DE COLLECTE DES POPULATIONS TUNISIENNES DE M. TRUNCATULA.	64
TABLEAU 6: CARACTERES MORPHOLOGIQUES RELEVES POUR LA COLLECTION TUNISIENNE DE M. TRUNCATULA	67
TABLEAU 7: DONNEES QUANTITATIVES PHENOTYPIQUES DES DIX POPULATIONS DE M. TRUNCATULA POUR 4 CARACTERES: FLORAISON NOTEE EN FRANCE (FLOR), LONGUEUR DE L'AXE ORTHOTROPE (AO), LONGUEUR DU PEDONCULE FLORAL PAR RAPPORT AU PETIOLE (PPF) ET LE NOMBRE DE TOURS DE SPIRES DES GOUSSES (GS).	70
TABLEAU 8: COEFFICIENTS DE CORRELATION ENTRE LES DIFFERENTS CARACTERES MORPHOLOGIQUES	78
TABLEAU 9: POIDS FACTORIEL DES DIFFERENTS CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DES SOLS.	78
TABLEAU 10: CORRELATIONS ENTRE LES PARAMETRES CLIMATIQUES ET PEDOLOGIQUES DES SOLS D'ORIGINE DES POPULATIONS NATURELLES DE M. TRUNCATULA	79
TABLEAU 11: COEFFICIENTS DE CORRELATION ENTRE LES DONNEES MORPHOLOGIQUES ET LES DONNEES ENVIRONNEMENTALES : ALTITUDE, SALINITE ET PLUVIOMETRIE.	79
TABLEAU 12: VALEURS DE LA MATIERE SECHE AERIENNES DES LIGNEES SANS AJOUT D'UNE SOURCE D'AZOTE DANS LE MILIEU DE CULTURE	112
TABLEAU 13: MATIERE SECHE AERIENNE (MG/PLANTE) POUR DES LIGNEES DE M. TRUNCATULA CULTIVEES EN PRESENCE D'AZOTE MINERAL ET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE SEL.	115
TABLEAU 14: LONGUEUR DES TIGES POUR DES LIGNEES DE M. TRUNCATULA CULTIVEES EN PRESENCE D'AZOTE MINERAL ET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE SEL.	115
TABLEAU 15: EAA POUR DES LIGNEES DE M. TRUNCATULA EN PRESENCE D'AZOTE MINERAL ET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE SEL.	118
TABLEAU 16: CONCENTRATIONS DE SEL DONNANT 50% D'INHIBITION POUR LES DIFFERENTES LIGNEES ET POUR LES PARAMETRES: LONGUEUR DES TIGES ET MSA SOUS ALIMENTATION AZOTEE MINERALE.	119

TABLEAU 17: DONNEES CONCERNANT LE NOMBRE DE NODULES A 60 JOURS, LA LONGUEUR DES TIGES (MM) ET LA MATIERE SECHE AERIENNE (MG) DES LIGNEES DE M.TRUNCATULA EN SYMBIOSE AVEC LA SOUCHE 2011 ET EN ABSENCE DE SEL.	121
TABLEAU 18: DECOMPOSITION DE LA VARIANCE POUR LES 3 CARACTERES: NODULATION, ALLONGEMENT DES TIGES ET MATIERE SECHE AERIENNE (MSA) EN CONDITIONS DE SYMBIOSE AVEC LA SOUCHE 2011.	129
TABLEAU 19: CONCENTRATIONS DE SEL DONNANT 50% D'INHIBITION POUR LES DIFFERENTES LIGNEES ET POUR LES PARAMETRES MESURES EN SYMBIOSE AVEC LA SOUCHE 2011: NODULATION, LONGUEUR DES TIGES ET MSA.	129
TABLEAU 20: DATES EN JOURS CORRESPONDANT A 100% DE NODULATION POUR CHAQUE ASSOCIATION SYMBIOTIQUE ETUDIEE.	132
TABLEAU 21: DECOMPOSITION DE LA VARIANCE POUR LES CARACTERES: ALLONGEMENT DES TIGES ET MATIERE SECHE AERIENNE SELON L'EFFET DE LA CONCENTRATION DE SEL, DE LA LIGNEE, DE LA SOUCHE RHIZOBIALE ET DE DIFFERENTES INTERACTIONS.	135
TABLEAU 22: NODULATION DES LIGNEES INOCULEES AVEC LA SOUCHE 2011 A 60 JOURS EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE SEL ET D'AVG (0.3 μ M).	141
TABLEAU 23: LONGUEUR DES TIGES (CM) EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE SEL ET D'AVG (0.3 μ M).	141
TABLEAU 24: PRODUCTION DE MATIERE SECHE AERIENNE (MG) DES LIGNEES DE M. TRUNCATULA INOCULEE PAR LA SOUCHE 2011 EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE SEL ET D'AVG (0.3 μ M).	142
TABLEAU 25: LISTE DES CARACTERES DE LA CROISSANCE VEGETATIVE RELATIVE AUX TIGES ET RACINES MESURES SUR LES PARENTS ET LES RIL DU CROISEMENT LR5.	193
TABLEAU 26: HERITABILITES DES CARACTERES MESURES POUR LES TIGES ET LES RACINES EN CONDITIONS CONTROLES ET SOUS SEL.	198
TABLEAU 27: CORRELATION (COEFFICIENT DE SPEARMAN) ENTRE DIFFERENTS PARAMETRES MESURES POUR LA PARTIE AERIENNE EN PRESENCE OU NON DE SEL.	200
TABLEAU 28: LISTE DES PARAMETRES UTILISES POUR LA DETECTION DE QTL.	202
TABLEAU 29: SYNTHESE DES QTL DETECTES POUR LES DIFFERENTS CARACTERES LIES A LA CROISSANCE AERIENNE ET RACINAIRE POUR LES LR5.	203

Préambule

La Tunisie a toujours été un carrefour de civilisation, d'abord par sa situation géographique, ensuite par son histoire et sa culture. C'est un pays d'Afrique du Nord, situé à la jonction des deux bassins de la Méditerranée. Il a toujours été une voie de communication entre l'Europe et l'Afrique ainsi qu'entre le Machrek (Orient arabe) et le Maghreb (Occident arabe). D'une superficie (164 150 km²), la Tunisie est un pays largement ouvert sur la Méditerranée (1 300 km de côtes et un vaste plateau continental de près de 80 000 km²). La situation géographique de la Tunisie confère à ses écosystèmes une large interdépendance avec l'ensemble de la région méditerranéenne.

La large diversité des conditions naturelles, de son relief, de sa géologie, de ses sols et de son climat, a fini par forger une grande diversité biologique. Elle a défini des biotopes variés permettant la coexistence de nombreuses espèces végétales et animales, souvent adaptées à des conditions abiotiques extrêmes ainsi qu'à de fortes pressions biotiques.

Malheureusement, à l'échelle internationale, cette diversité biologique s'appauvrit d'une manière considérable du fait des activités humaines. En effet, les efforts déployés pour assurer les besoins alimentaires ont engendré des menaces qu'il faut maintenant prendre en compte. En effet la mécanisation poussée pour le travail du sol, l'utilisation des pesticides et des engrais chimiques pour augmenter la production végétale, l'ajout des farines animales pour l'alimentation du cheptel, constituent autant d'entraves pour la pérennité de la vie dans les sols, une menace pour l'état sanitaire des végétaux, des animaux, une source d'altération de la qualité des produits et un problème de santé humaine. Cette situation s'est ajoutée à une utilisation exagérée des ressources énergétiques et hydriques fossiles et la production de nouvelles générations de produits toxiques.

Cette conjoncture a engendré un débat global à l'échelle planétaire qui préconise de réhabiliter les légumineuses dans la consommation humaine, la nourriture animale et les écosystèmes naturels pour des raisons que nous verrons plus loin.

La diversité de cette famille végétale qui comprend environ 20 000 espèces (Gepts *et al.* 2005) offre des possibilités énormes d'exploitation. Ainsi les légumineuses, par leurs intérêts agronomique, alimentaire et écologique, se trouvent actuellement au centre des préoccupations des instances internationales. Leur importance est due entre autres à leur contribution, chaque année, à la fixation d'environ 65 millions de tonnes d'azote atmosphérique intégrés dans la biosphère (Graham et Vance 2003). Grâce à cette fixation d'azote réalisée en association avec les bactéries du sol collectivement appelées *Rhizobium*,

les légumineuses permettent, à la fois, d'enrichir le sol en matière organique et d'épargner les engrais azotés par l'exploitation d'un processus naturel. Une importance considérable doit donc être attribuée au développement des possibilités offertes par cette association symbiotique fixatrice d'azote *Rhizobium*- légumineuse.

Dans les zones arides et semi arides, comme c'est le cas des pays du bassin méditerranéen et donc de la Tunisie, la contrainte saline s'associe au déficit hydrique pour limiter la production des espèces végétales. Chez les légumineuses, cet effet est d'autant plus perceptible que la fixation symbiotique de l'azote est très sensible à la contrainte saline (Zahran 1999b).

Les légumineuses sont donc à la fois un support de travail fondamental et un matériel pour l'amélioration des plantes cultivées.

A. Introduction et contexte de l'étude

Une première partie fera tout d'abord le point sur l'intérêt des légumineuses, ainsi que la contribution de la plante *Medicago truncatula* à leur amélioration. On présentera par la suite le cadre et le contexte dans le quel ce travail de thèse a été initié en 2002.

I. Les légumineuses :

I.1. Présentation générale des légumineuses

La famille des légumineuses est très diverse avec 3 sous familles: Mimosoideae, Caesalpinioideae, et Papilionoideae (Doyle et Luckow 2003) et compte environ 20.000 espèces (Gepts *et al.* 2005). La sous famille des Papilionoideae regroupe les espèces cultivées les plus importantes économiquement: le soja (*Glycine max*, $2n = 4x = 40$), le haricot (*Phaseolus vulgaris*, $2n = 2x = 22$), le pois (*Pisum sativum*, $2n = 2x = 14$), la luzerne (*Medicago sativa*, $2n = 4x = 32$), l'arachide (*Arachis hypogaea*, $2n = 4x = 40$), le pois chiche (*Cicer arietinum*, $2n = 2x = 16$), et la fève (*Vicia faba*, $2n = 2x = 16$). Ces légumineuses cultivées forment deux groupes appelés Galegoïdes et Phaseoloïdes (Figure 1), à l'exception de l'arachide qui appartient au groupe des Aeschynomeneae (Broughton *et al.* 2003).

Les légumineuses sont cultivées principalement comme source de protéines pour la consommation humaine (haricot, pois, fève,...) ou l'alimentation animale (soja, luzerne,...) grâce à la fixation symbiotique de l'azote. Elles sont aussi une source importante d'huiles végétales (arachide) et de bois de qualité (bois de rose, ébène).

Les légumineuses à graines constituent toujours une part importante de l'alimentation du monde, particulièrement dans les Pays en Développement où elles sont la principale source de protéines pour l'homme. Citons le Haricot (*Phaseolus vulgaris*) en Amérique Latine, le Pois Chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens culinaris*) et la Fève (*Vicia faba*) dans le bassin méditerranéen, le Soja (*Glycine max*) en Asie sans oublier l'Arachide (*Arachis hypogea*) et le Pois (*Pisum sativum*) dans le monde entier.

Les graines de légumineuses sont plus riches en protéines et moins riches en glucides que celles de céréales (Tableau 1): on distingue les espèces à graines riches en protéines et en huile, sans amidon, classées comme oléagineux (soja, arachide) et les espèces à graines riches en protéines, classées comme protéagineux (pois, féverole) ou légumes secs (haricot, lentille, pois chiche).

Figure 1: Classification des légumineuses de la famille des Papilionoideae
(Zhu *et al.* 2005)

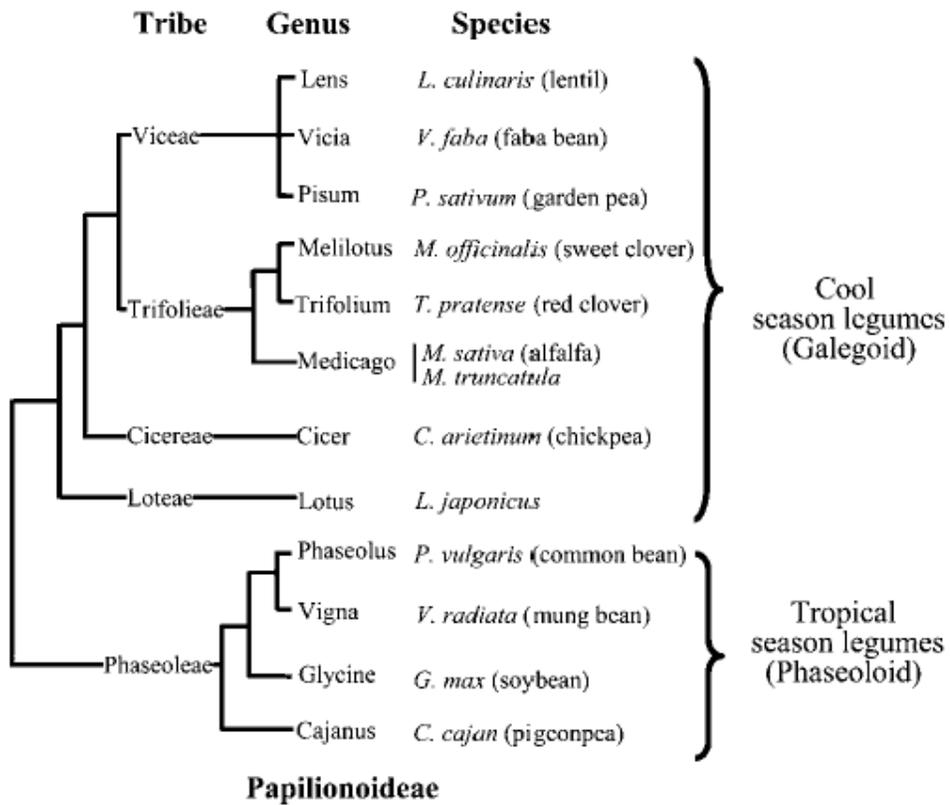


Tableau 1: *Composition des réserves de quelques graines d'espèces cultivées.*

D'après Bewley et Black (1994)

	Composition moyenne en %		
	Protéines	Huiles	Carbohydrates (amidon)
Céréales			
Orge	12	3	76
Maïs	10	5	80
Avoine	13	8	66
Seigle	12	2	76
Blé	12	2	75
Légumineuses			
Haricot	23	1	56
Petit pois	25	6	52
Arachide	31	48	12
Soja	37	17	26

Les légumineuses occupent la deuxième place, après les céréales, pour les terres cultivées et la production. En 2004, plus de 300 millions de tonnes de légumineuses à graines ont été produites sur une superficie de 190 millions d'hectares, soit 13% des terres cultivées (selon FAO).

En Europe, en 2000, 4% des surfaces cultivables sont occupés par les légumineuses à graines, principalement du pois (43%) et du soja (18%). L'Union Européenne est le premier producteur mondial de Pois (3,1 Mt de Pois en 2000, soit environ le tiers de la production mondiale) pour la nourriture animale essentiellement. Les légumineuses fourragères sont une autre source de protéines pour l'alimentation du bétail (luzerne, trèfle) soit sous la forme de foin ou bien consommées dans les prairies ou les parcours. En France, les principales espèces fourragères cultivées sont la luzerne et le trèfle blanc, puis le trèfle violet, puis loin derrière: le lotier, le sainfoin et le trèfle incarnat. En 2003, les surfaces de luzerne cultivée en pur étaient de 320 000 ha dont environ 100 000 ha pour la déshydratation. En France, les prairies et cultures fourragères représentent 45% de la surface agricole cultivée (Huygue 2005).

I.2. Principales caractéristiques des légumineuses

La spécificité de la famille des légumineuses est leur aptitude à fixer l'azote en symbiose avec des microorganismes du sol. Cette caractéristique sera détaillée dans les pages suivantes.

I.2.1. Importance de l'azote dans la nutrition des plantes

L'azote est l'un des éléments majeurs de la vie. C'est le quatrième constituant des plantes qui est utilisé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle. C'est le constituant principal de l'atmosphère terrestre sous forme d'azote gazeux (N_2) mais les plantes n'ont pas la capacité de l'assimiler directement. Les plantes absorbent l'azote dans le sol sous forme de nitrates (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu.

Mais les légumineuses peuvent aussi acquérir l'azote grâce à leur aptitude à établir une symbiose avec des bactéries du sol collectivement appelées *Rhizobium*. Dans ce cas, elles ne nécessitent pas l'apport d'engrais azotés, à la différence des céréales ou des oléo-protéagineux comme le colza et le tournesol.

La production des engrais azotés demande beaucoup d'énergie: L'énergie nécessaire à la production chimique d'une tonne d'engrais azoté par l'industrie, est de 2.5 tonnes de pétrole (<http://www.fondation-nicolas-hulot.org/page.php?id=1>). Leur coût ne cesse donc

d'augmenter proportionnellement au prix du pétrole. La fertilisation azotée des plantes joue donc un rôle important dans l'accroissement de l'effet de serre et est ruineux économiquement tout en créant une pollution importante car souvent les nitrates sont lessivés lors des pluies et atteignent la nappe phréatique (Link *et al.* 2006). La culture des Légumineuses représente donc le meilleur moyen de produire des protéines tout en respectant l'environnement: c'est un exemple de culture dans le cadre d'une agriculture durable.

1.2.2. Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est effectuée par des microorganismes soit autonomes soit en symbiose avec des plantes supérieures. En dehors des légumineuses, seul un petit nombre d'espèces (quelques centaines au plus) possèdent des nodules fixateurs d'azote. Il s'agit exceptionnellement d'une association avec les Rhizobiums (on ne connaît qu'un seul exemple: *Parasponia*) mais le plus souvent la symbiose est réalisée avec des actinomycètes (bactéries filamenteuses) du genre *Frankia* (Benson et Silvester 1993). Dans ce cas, les plantes hôtes, dites plantes actinorhiziennes, sont des arbres ou des arbustes appartenant à des familles primitives: *Alnus*, *Casuarina*...

La symbiose fixatrice d'azote est un processus complexe déterminé par les deux partenaires. L'un des systèmes les plus étudiés est celui associant les bactéries rhizobiales avec les légumineuses.

1.2.3. Etablissement de la symbiose fixatrice de l'azote

Les bactéries de la famille des rhizobiacées peuvent infecter les racines des légumineuses entraînant la formation de structures appelés nodosités ou nodules. Par ces nodules, la plante hôte (la légumineuse) offre un micro habitat exceptionnellement favorable à la bactérie tout en lui procurant des substrats carbonés provenant de la photosynthèse. Le processus de la fixation, lui-même, consiste en la réduction de l'azote atmosphérique N₂ sous forme ammoniacale. Cette réaction est catalysée par un complexe enzymatique appelé Nitrogénase d'origine bactérienne (Downie 2005). Cette association à bénéfice réciproque entre la légumineuse et les bactéries est appelée symbiose fixatrice de l'azote atmosphérique.

1.2.3.a. Taxonomie des rhizobium

.Par convention, on nomme « *Rhizobium* » toute bactérie, quelque soit son genre, qui est capable d'établir une symbiose avec une légumineuse. La taxonomie des Rhizobium est en changement permanent. Ceci est dû aux progrès technologiques dans chacun des trois critères utilisés en taxonomie: la morphologie, la physiologie et l'analyse des séquences.

Jusqu'en 2003, 36 espèces rhizobiales étaient distribuées parmi 7 genres (Tableau 2). Au cours des trois années suivantes, huit nouvelles espèces rhizobiales ont été décrites. Les 44 espèces identifiées (Sahgal et Johri 2006) sont désormais classées en 11 genres, dont 9 appartiennent à l' α -proteobacteria: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*. Le genre *Sinorhizobium* est composé de 5 espèces: *S. meliloti*, *S. medicae*, *S. teranga*, *S. saheli*, et *S. fredii* (Biondi *et al.* 2003).

I.2.3.b. Les étapes de la nodulation

Le site de fixation symbiotique est le nodule, le seul organe localisé sur la racine qui fonctionne pour la survie des bactéries et l'activité de la Nitrogénase. La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiont et la plante hôte (Foucher et Kondorosi 2000; Limpens et Bisseling 2003) (Figure 2). L'interaction commence avec la colonisation de jeunes poils absorbants par les rhizobia et un échange de molécules-signaux. Les bactéries reconnaissent des flavonoïdes qui sont sécrétées par la plante hôte. Ces molécules induisent la production de facteurs NOD par les rhizobia (Oldroyd 2001). Les facteurs NOD sont des lipo-chitooligosaccharides (LCO) (Dénarié *et al.* 1996) émis par la bactérie, à l'origine de la reconnaissance spécifique entre les deux symbiotes et du déclenchement du programme d'organogenèse nodulaire chez le végétal par une cascade d'expression de gènes spécifiques.

Les facteurs NOD agissent essentiellement sur deux types de cellules au niveau de la racine: Les cellules épidermiques et corticales. Au niveau des cellules épidermiques, les facteurs NOD induisent une dépolarisation de la membrane plasmique, une oscillation du flux de Ca^{2+} , une induction de l'expression de gènes spécifiques et une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite en «crosse de berger» qui enferme les rhizobia (Esseling *et al.* 2003).

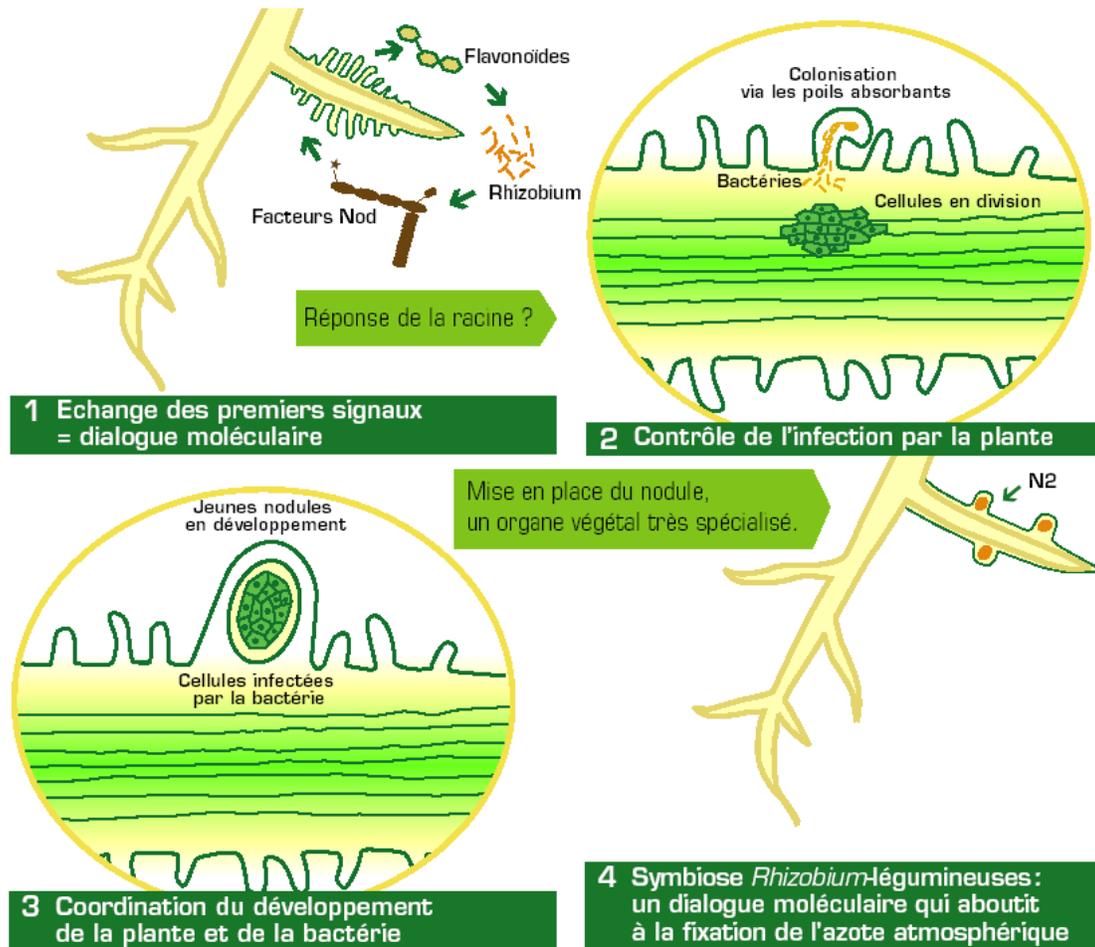
A partir de cette niche, les rhizobia pénètrent la cellule végétale par la formation d'un cordon d'infection qui traverse d'abord le poil absorbant et se ramifie ensuite dans les cellules corticales guidant ainsi les bactéries vers les couches cellulaires intérieures (Gage 2004). Simultanément à l'infection des poils absorbants, certaines cellules du cortex interne se différencient et se divisent à plusieurs reprises, formant un primordium nodulaire. Quand les cordons d'infection atteignent le primordium, certaines cellules arrêtent de se diviser et entrent dans des cycles répétés d'endoréduplication.

Tableau 2: Spécificité de la symbiose rhizobium / légumineuse (Sahgal et Johri 2003).

Genus	Species	Host
<i>Allorhizobium</i>	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>Az. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>B. japonicum</i>	<i>G. max</i>
	<i>B. liaoningense</i>	<i>G. max</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus</i>
	<i>M. loti</i>	<i>Loti</i>
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Leucaena</i>
	<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza, Sophora and Glycine</i>
<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria pedocarpa</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i>
	<i>R. gallicum</i>	<i>P. vulgaris</i>
	<i>R. giardinii</i>	<i>P. vulgaris</i>
	<i>R. hainanense</i>	<i>Centrosema, Desmodium, Stylosanthes, Tephrosia</i>
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Trifolium, Vicia</i>
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>
	<i>R. phaseoli</i>	<i>P. vulgaris</i>
	<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum hedsari</i>
	<i>R. tropici</i>	<i>Leucaena, P. vulgaris</i>
	<i>R. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
	<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpea, Trisperma Corollina varia and Gueldenstaedtia multiflora</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. arboris</i>	<i>Acacia senegal Prosopis chilensis</i>
	<i>S. fredii</i>	<i>G. max</i>
	<i>S. kostiense</i>	<i>A. senegal, P. chilensis</i>
	<i>S. medicae</i>	<i>Medicago spp.</i>
	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>
	<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i>
	<i>S. terangae</i>	<i>Acacia, Sesbania</i>
	<i>S. xinjiangense</i>	<i>G. max</i>

Figure 2: Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice d'azote.

Source: <http://www.crdp-toulouse.fr/>



Elles sont alors envahies par des rhizobia qui sont relâchés des cordons d'infection (Cermola *et al.* 2000; Brewin 2004). Ensuite, la pénétration de la bactérie est faite par endocytose.

Finalement, les cellules végétales infectées et les bactéries infectantes se différencient en cellules capables de fixer et d'assimiler l'azote. La structure nouvellement formée, qui se compose des bactéries qui différencient dans des bacteroïdes enfermés dans une membrane de cellules de la plante, s'appelle un symbiosome.

Dans les nodules déterminés (Figure 3) (nodules avec une activité méristématique limitée dans le temps), les différents symbiosomes fusionnent et/ou les bacteroïdes se divisent dans le symbiosome. Par conséquent, les symbiosomes contiennent typiquement plusieurs bacteroïdes.

Cependant, dans les nodules indéterminés (nodules avec une activité méristématique continue dans le temps), les différents symbiosomes se divisent, ainsi que le bactéroïde, ce qui a la plupart du temps comme conséquence un seul bacteroïde dans un symbiosome (Prell et Poole 2006). Les cellules distales du primordium ne sont pas envahies par les rhizobia et gardent un état non différencié. Elles continuent la division cellulaire et forment le méristème nodulaire.

Ces différentes activités cellulaires conduisent rapidement au développement d'une structure complexe : le nodule.

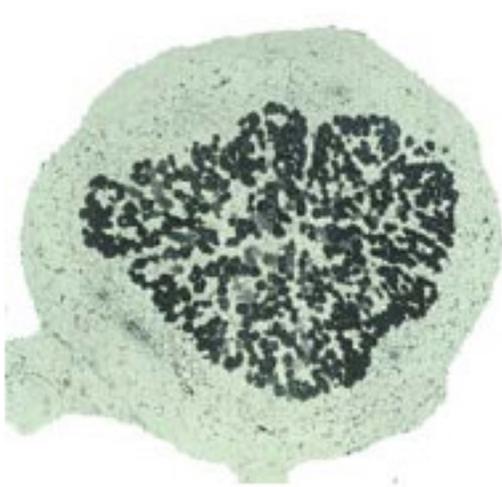
L'ensemble des mécanismes génétiques et moléculaires qui permettent le développement d'un nodule ne sont pas encore ni compris ni complètement décrits.

I.2.3.c. Structure des nodules indéterminés

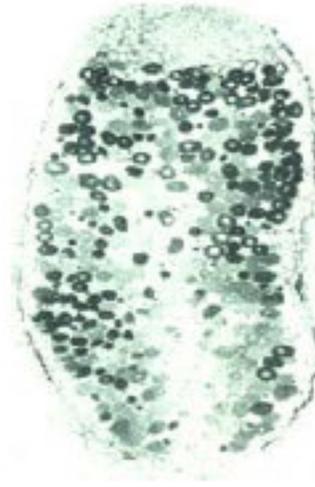
Les nodules indéterminés ont pour origine le cortex interne racinaire. Le méristème apical est persistant et entraîne le développement de nodules de forme allongée, comme chez la luzerne, le pois et le trèfle.

Dans le nodule de type indéterminé (Figure 4), on peut discerner plusieurs zones centrales entourées par différentes couches périphériques. Le méristème est la zone la plus distale (zone I). La zone de différenciation et d'infection est adjacente (zone II). Ces deux zones ont une taille constante durant la vie de la nodosité. La troisième zone (zone III) est la zone de fixation d'azote. Finalement, chez les nodosités âgées, les cellules végétales proximales à la racine et les bactéries dégèrent et forment une zone de sénescence (Foucher et Kondorosi 2000).

Figure 3: Les deux types de nodules fixateurs d'azote.



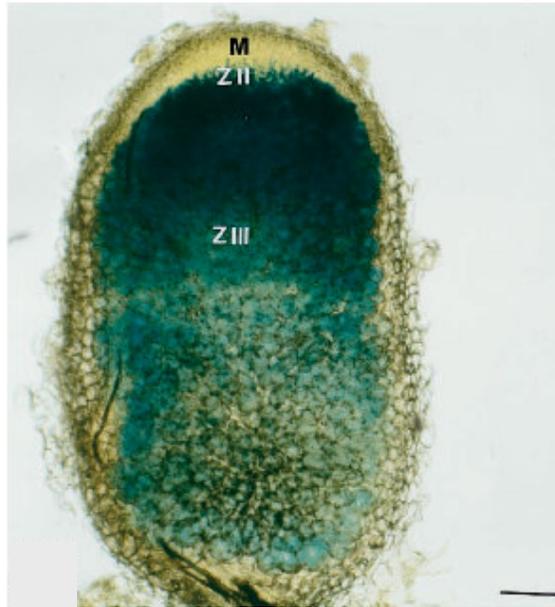
Nodule de type déterminé:
toutes les cellules sont au même
stade de développement.



Nodule de type indéterminé:
Présence d'un méristème, plusieurs
stades de développement cellulaires

Figure 4: Structure cellulaire d'un nodule de type indéterminé.

Source (Tirichine *et al.* 2000)



M, méristème nodulaire; **Z II**, Zone II ; **Z III**, Zone III.

Echelle (barre noire): 100 μ m.

I.2.3.d. Régulation du nombre de nodules

La nodulation est le résultat d'un dialogue utilisant des signaux moléculaires entre le microsymbiont et la plante hôte. La symbiose est contrôlée par un processus d'autorégulation qui commande le nombre de nodules et la fixation de l'azote par une signalisation à distance (Caetano-Anolles et Gresshoff 1991; Caetano-Anolles *et al.* 1991).

Après inoculation, les nodules sont formés dans les régions spécifiques de la racine. Quand le système racinaire se développe, d'autres régions pouvant être infectées sont continuellement formées. Mais une fois que les nodules sont fonctionnels, la nodulation est inhibée dans les autres parties jeunes. Dans ce cas les plantes contrôlent le nombre de nodules en maintenant un certain équilibre: bénéfique (fixation d'azote) / coût (ressources de carbone) (Stacey *et al.* 2006).

Cette autorégulation est réalisée par des signaux moléculaires émis par la partie racinaire ainsi que par des phytohormones (ex:ABA) produits au niveau des tiges (Oka-Kira et Kawaguchi 2006).

I.2.3.e. Spécificité symbiotique

L'une des caractéristiques majeures des associations rhizobium-légumineuse est leur spécificité d'hôte. En effet, une espèce de rhizobium donnée n'est capable, en général, d'établir une relation symbiotique efficace qu'avec un nombre limité de partenaires végétaux (Tableau 2). De même une espèce de légumineuse ne peut être nodulée que par un certain nombre d'espèces de rhizobium (Tilak *et al.* 2005).

I.2.4. Intérêt de la fixation symbiotique d'azote

La déficience d'azote minéral dans le sol constitue un facteur limitant de la croissance des plantes. On estime que la réduction biologique de l'azote atmosphérique N₂ en ammonium fournit environ 65% de l'azote disponible dans la biosphère (Lodwig *et al.* 2003). La majorité de cet azote est apporté par la symbiose Rhizobium-légumineuses (Zahran 1999a), avec un apport annuel d'azote dans les terres estimé de 200–300 kg N ha⁻¹ (Peoples *et al.* 1995).

Pour les 3 plus importants céréales cultivées: blé, riz et maïs, il est nécessaire de prélever entre 20 et 40 kg N ha⁻¹ du sol dans une période de culture de 3 à 5 mois pour chaque tonne de graines produit (Peoples *et al.* 1995).

Selon Danso (1995), l'azote de la fixation symbiotique a une contribution plus importante pour la croissance des plantes par rapport à celui des engrais azotés appliqués dans l'agriculture des pays en développement. L'azote fixé dans l'atmosphère contribue pour 50 à 60 % du N des légumineuses à graines, 55 à 60 % du N des arbres fixateurs d'azote, 70 à 80 % du N des légumineuses fourragères.

Cette réserve d'azote, étant stockée dans les feuilles, les nodules ou bien les autres organes, reste plus longtemps disponible dans les sols comparativement à l'azote minéral fortement lessivé par les eaux.

1.2.5. Haute teneur en protéines

Dans l'alimentation humaine, les légumineuses et les céréales constituent deux sources de protéines complémentaires. En effet les protéines provenant des céréales sont déficientes en Lysine, et les légumineuses à graines sont déficientes en acides aminés sulfurés et en tryptophane (Wang *et al.* 2003). C'est pour cette raison que dans la majorité des centres de domestication, les légumineuses et les céréales ont été associées (Gepts 2004). Graham et Vance (2003) estiment que les légumineuses fournissent pour l'Homme environ le 1/3 des protéines alimentaires.

Pour le cheptel, les légumineuses fourragères représentent une source d'alimentation riche en protéines, fibres et énergie. Elles sont à la base de la production de lait et de viande (Russelle 2001).

La luzerne (*Medicago sativa*) représente le fourrage le plus répandu dans les zones à climat tempéré (Russelle 2001). Cette plante apporte de nombreux éléments à la ration donnée aux animaux. Elle leur fournit d'abord une part importante des protéines nécessaires à leur croissance, de la Bétacarotène et des fibres indispensables à la digestion chez le ruminant.

D'autres espèces sont aussi importantes pour le pâturage dans les zones tempérées comme les trèfles (*Trifolium spp.*), le lotier (*Lotus corniculatus*), le melilot (*Melilotus spp.*) et la vesce (*Vicia spp.*). Elles sont largement représentées autour du Bassin Méditerranéen. Certaines de ces espèces peuvent jouer un rôle important dans l'amélioration de la production pastorale et/ou fourragère. *Lotus creticus* présente une bonne résistance au sel et peut supporter les eaux saumâtres (Foury 1954).

1.2.6. Métabolites secondaires

Les légumineuses constituent une source d'éléments minéraux essentiels requis pour l'alimentation humaine (Sandberg 2002) et de métabolites secondaires comme les

isoflavonoïdes bénéfiques pour la santé qui peuvent prévenir contre les cancers chez l'Homme (Messina 1999) et d'autres comme les phénylpropanoïdes ayant un rôle défensif pour les plantes contre les attaques de pathogènes et d'insectes (Dixon *et al.* 2002; Ndakidemi et Dakora 2003).

Les légumineuses sont connues par leur effet de réduction du cholestérol dans le sang (Messina 1999), leur effet hypoglycémiant, et elles réduisent l'augmentation de la pression du sang après la prise de repas (Messina 1999).

Par contre, certaines légumineuses produisent des facteurs anti-nutritionnels comme des inhibiteurs de la Trypsine (enzyme digestive), des phytohémagglutinines, et des allergènes (cas de l'arachide) (Messina 1999).

1.2.7. Importance des légumineuses dans les systèmes de culture

Utilisées en rotation ou en association dans les systèmes de culture, les légumineuses apportent une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique. Les résidus des légumineuses sont plus riches en azote et contribuent à enrichir le sol en cet élément. Les cultures succédant aux légumineuses peuvent aussi bénéficier indirectement de l'azote fixé par l'entremise des résidus laissés par la légumineuse (Chalck 1998).

Il est maintenant bien établi que les précédentes légumineuses augmentent généralement les rendements des cultures non fixatrices d'azote mais cet apport d'azote atmosphérique n'explique pas toujours les rendements souvent très élevés des cultures succédant aux légumineuses. D'autres effets bénéfiques des légumineuses semblent intervenir dans l'accroissement des rendements et certains auteurs comme Chalck (1998) préfèrent le terme 'effet rotation' pour désigner cet effet positif des légumineuse sur la culture suivante.

Certains auteurs attribuent l'effet bénéfique des rotations à l'amélioration des propriétés physiques et biologiques des sols et à la capacité de quelques légumineuses à solubiliser des phosphates de calcium et le phosphore par leurs exsudats racinaires.

1.2.8. Autres

Les légumineuses non cultivées, en plus de leur contribution à la fixation symbiotique de l'azote, constituent un potentiel de reforestation et de contrôle de l'érosion des sols (Ahmad *et al.* 1984). Des associations symbiotiques avec ces légumineuses peuvent même fournir un couvert végétal pour les terres dégradés (Jha *et al.* 1995).

I.3. Situation des légumineuses cultivées en Tunisie

La flore végétale tunisienne est extrêmement riche en diverses espèces spontanées souvent consommées par les animaux, mais dont la valeur fourragère est encore inconnue (Zoghلامي et Hassen 1999). La grande variation des conditions du milieu fait que pour chaque espèce, il existe un grand nombre d'écotypes dont la variabilité génétique constitue un matériel de choix pour la sélection et la création de variétés adaptées aux conditions diverses.

En Tunisie, les légumineuses alimentaires constituent une composante de base dans les systèmes agronomiques traditionnels. Elles interviennent directement dans la ration alimentaire ou indirectement dans la nourriture du cheptel.

En conditions naturelles les légumineuses fourragères peuplent à l'état natif tous les sols. Elles se sont depuis fort longtemps adaptées aux différentes conditions bioclimatiques et édaphiques du pays.

I.3.1. Les légumineuses alimentaires

Les légumineuses occupent moins de 4.5% de terres arables dans le nord tunisien et moins de 9% de la surface des terres cultivées (Kharrat *et al.* 1991).

Au cours des dernières décennies les aires occupées par les légumineuses ont diminués de 30% entre 1990 et 2000 et leur proportion par rapport aux céréales est passé de 7 à 3 % (FAO 1996) (<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPS/Pgrfa/pdf/tunisia.pdf>).

Le rendement des légumineuses à graines n'a guère dépassé les 4.5 quintaux par hectare au cours de la même période. Cette situation est le moins qu'on puisse dire alarmante en comparaison avec les normes internationales qui préconisent pour les légumineuses un pourcentage des emblavures par rapport aux céréales supérieur à 20 % et des rendements supérieurs à 7 quintaux/ha.

Tableau 3: Surfaces cultivées occupées par les légumineuses alimentaires en Tunisie (moyenne de 4 années 1984-87) (Kharrat *et al.* 1991)

	Surface moyenne (1000 ha)	%
Fève (Faba bean)	57 510	47.8
Pois chiche	42 260	35.1
Autres légumineuses alimentaires	20 550	17.1

Les techniques agricoles utilisées, souvent intensives, associées à l'introduction de cultivars sélectionnés parfois à partir de germoplasme étranger jugé à haut rendement a conduit de façon inattendue à une réduction de la production. En effet, ces nouveaux cultivars subissaient des dégâts considérables occasionnés par des agents pathogènes dont en particulier les champignons.

En plus, l'incapacité des cultivars introduits à établir une bonne symbiose avec les populations rhizobiales autochtones, les a privés des conditions optimales de nutrition azotée. Ces légumineuses sont d'autant plus affectées par ces contraintes biotiques, qu'elles se trouvent soumises à des contraintes osmotiques dues à une salinité du sol ou au manque d'eau ainsi que sa surcharge ionique.

De telles circonstances ont comme conséquence l'application d'engrais azotés pour augmenter les rendements, et l'arrosage là où il était possible de le faire, en dépit de la qualité médiocre de l'eau. Cet acharnement de l'agriculteur à rechercher les rendements souhaités, a engendré une augmentation des coûts de production, une perte d'énergie et une pollution de l'environnement.

Cette situation à l'échelle du pays est d'autant plus contradictoire qu'il existe encore un patrimoine local de légumineuses alimentaires (comme la fève et le pois chiche) et fourragères adaptées aux contraintes biotiques et abiotiques pouvant être utilisées directement ou comme réserve génétique afin de développer une stratégie de recherche pour l'exploitation de ce potentiel. La présence d'une grande diversité de bactéries rhizobiales capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote efficaces représente une opportunité pour optimiser la production des légumineuses et un facteur de développement d'une agriculture biologique.

1.3.2. Les fourrages

Au niveau des espèces fourragères (Selon FAO), la Tunisie possède un patrimoine génétique riche et diversifié. Les fourrages annuels sont cultivés pour l'essentiel dans les zones de culture pluviale au nord et, dans un moindre degré, en irrigué.

Les principales cultures sont les suivantes:

Avoine (*Avena sativa*): Cette graminée est cultivée seule ou mélangée à de la vesce; c'est une culture bien enracinée dans la tradition des petits exploitants. C'est le fourrage prédominant en Tunisie et il occupe environ 172 000 ha (60 - 70 pour cent des fourrages annuels).

Ray-grass italienne (*Lolium multiflorum*): Cette graminée est cultivée au sec dans les zones humides et dans les zones irriguées. Non seulement elle est plus productive que l'avoine, mais elle a une valeur nutritive élevée.

Bersim (*Trifolium alexandrinum*): Il est extrêmement répandu dans les zones méditerranéennes. En Tunisie, c'est un fourrage d'hiver traditionnel dans les petites exploitations en irrigué. Il est sensible au gel et préfère des sols argileux profonds ou calcaires. Certains petits producteurs cultivent du bersim pour ses rendements élevés et l'avantage qu'il offre dans les rotations du fait que c'est un bon précurseur de céréales. En tant que légumineuse, le bersim fournit une grande quantité d'azote au sol. Les rendements varient entre 4 et 8 tonnes de matière sèche/ha au niveau des petites exploitations. Le développement du bersim en Tunisie s'explique essentiellement par son rôle important dans le mode d'alimentation des vaches laitières en hiver et par la disponibilité des semences, pour la plupart produites sur place par les éleveurs.

Sorgho fourrager (*Sorghum sudanense*): Le sorgho fourrager est une graminée d'un intérêt nutritionnel particulier dans les zones relativement sèches en été. Le sorgho est un fourrage intensif pour les bovins laitiers. On le cultive en été avec des variétés importées (variétés : *Super graze II*, *Sweet sorghum*, *Piper*). La superficie en sorgho est d'environ 8 000 ha, plus du double de tous les autres fourrages d'été. En effet, le sorgho tolère une salinité élevée (jusqu'à 7 g/l), et il pousse sur une grande variété de sols (le pH variant entre 4.5 et 8.5) dans les zones recevant 500-900 mm de précipitations annuelle. De même cette plante présente une résistance à la sécheresse.

Fourrages pérennes: Ils sont peu utilisés aujourd'hui mais l'ont été beaucoup dans le passé. La luzerne, *Medicago sativa*, était un fourrage traditionnel des oasis qui pousse bien dans les sols bien drainés où les précipitations sont supérieures à 450 mm; il pousse aussi très bien dans les zones irriguées.

Le sulla, *Hedysarum coronarium*, outre qu'il s'agit d'une composante importante des pâturages naturels sur les marnes, est une plante qui a été largement utilisée (Sulas *et al.* 1999). Quand on la sème sur des sols où elle ne pousse pas naturellement, il est nécessaire d'inoculer sa bactérie spécifique. Les types de *Hedysarum coronarium* cultivés (cultivar italien en général) se comportent habituellement comme des plantes biennales. Si cette plante a l'avantage de produire une grande quantité de fourrage, elle a l'inconvénient de présenter un

pic de croissance au printemps; ses tiges épaisses la rendent inadaptée pour être conservée sous forme de foin.

L'espèce pérenne *Medicago sativa*, est le fourrage le plus cultivé. D'autres populations naturelles annuelles de *Medicago laciniata*, *Medicago polymorpha* et *Medicago truncatula* se développent spontanément et représentent une portion importante de la flore native tunisienne (Seklani et Hassen 1990).

Plusieurs génotypes locaux de légumineuses fourragères ont été sélectionnés et développés sur le plan commercial aussi bien en Tunisie qu'à l'étranger. On peut citer *Medicago truncatula* «BORUNG» (<http://www.pi.csiro.au/ahpc/legumes/pdf/borong.pdf>), *Medicago sativa* «GABES», *Trifolium alexandrinum* «KHADRAOUI», et plusieurs variétés *Trifolium subterraneum* à faible teneur en phytoestrogène qui ont été utilisées dans la création de prairies permanentes dans la région de Sedjenane (Tunisie).

I.4. Le milieu naturel tunisien

Le milieu naturel tunisien, caractérisé par une rareté relative des ressources en eau, en sol et en couvert végétal naturel et par la fragilité de ces ressources, est appelé à subvenir aux besoins croissants d'une population en nette progression (en 10 ans elle est passée de 8 785 364 à 9 910 872 habitants en 2004, Source : www.infotunisie.com).

En Tunisie le climat est de type méditerranéen allant de l'humide à l'extrême Nord au désertique à l'extrême sud. Compte tenu des conditions climatiques et géomorphologiques, trois grandes zones agro-écologiques se distinguent :

- ❖ Le **Nord**, avec une pluviométrie moyenne entre 400-600 mm et un relief marqué par des massifs montagneux au Nord Ouest et des plaines fertiles au Nord-Est, constitue la région sylvo-agricole (forêts et cultures annuelles essentiellement).
- ❖ Le **Centre**, avec une pluviométrie entre 200-400 mm, se distingue par une morphologie constituée par une basse steppe à l'Est avec des plaines fertiles interrompues par des dépressions et une haute steppe avec des massifs montagneux et des plaines. L'ensemble est à vocation agro-pastorale (parcours et plantations).
- ❖ Le **Sud**, avec une pluviométrie aléatoire de 100 à 200 mm, est caractérisé par son aridité et la vulnérabilité de ses sols à la désertification. C'est un espace à vocation pastorale avec des oasis autour des points d'eau.

La Tunisie est confrontée à un certain nombre de facteurs d'origines naturelles et anthropiques convergents qui sont à l'origine de l'état de dégradation assez avancée des sols. Il s'agit essentiellement de l'érosion hydrique, éolienne et de la salinisation.

La Tunisie possède des côtes étendues sur environ 1300 Km, ainsi que de vastes zones salées (chott et sebkha) et d'importantes quantités d'eaux salées de qualité très médiocres (Mezni *et al.* 2002). Ces facteurs ont fait de la salinité un facteur limitant majeur de la production des légumineuses.

I.5. Situation des ressources naturelles des légumineuses en Tunisie et au Maghreb

La région du Maghreb, située dans le nord-ouest de l'Afrique, comprend cinq pays qui bordent l'océan Atlantique (Mauritanie, Maroc) et la mer Méditerranée (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye). Considérant la gestion locale de la biodiversité agricole, on distingue successivement quatre grands types de milieux : la région côtière tempérée, les zones montagneuses, la steppe couvrant les hautes plaines, et les oasis du désert du Sahara. Ces milieux abritent une flore riche très typée de la biodiversité en particulier pour les mécanismes adaptatifs à l'aridité.

La région fait partie du centre d'origine méditerranéen défini par Vavilov pour la biodiversité agricole et continue d'être la source de nouveaux caractères, en particulier de résistance à la sécheresse et à la salinité, recherchés pour l'amélioration de la production agricole d'un grand nombre de cultures importantes au niveau mondial comme les légumineuses (luzernes).

La flore tunisienne est représentée par 2 103 espèces végétales environ, dont 400 espèces rares ou très rares. Les familles des composées, papilionacées, graminées et crucifères représentent 66 % des espèces (respectivement 22 %, 18 %, 17 % et 9 %) (El Gazzah et Chalbi 1995). Ces ressources sont concentrées surtout dans la moitié nord du pays, à cause de conditions écologiques plus favorables. Cependant, le Sud tunisien reste d'un intérêt évident, quant à la valeur génétique des espèces végétales caractéristiques, remarquablement bien adaptées aux zones arides et particulièrement celles qui sont adaptées aux milieux spécifiques que sont les oasis dans le sud du pays.

Il est bien établi que les introductions de variétés améliorées entraînent souvent, à court ou à long terme, une érosion génétique des ressources locales, particulièrement au niveau des plantes allogames. Ainsi donc, un grand problème se pose pour les populations humaines installées dans des régions historiquement connues pour leurs ressources génétiques traditionnelles. Dans ces régions, une érosion massive et accélérée entraîne la disparition de nombreuses espèces végétales bien adaptées aux conditions locales du milieu, généralement peu favorables aux génotypes introduits en Tunisie pour leur haut rendement (El Gazzah et Chalbi 1995).

Les pays du Maghreb se sont engagés à mettre en place des politiques de protection de leur environnement en particulier dans le domaine de la conservation et de l'utilisation des ressources génétiques des plantes. Les pays ont adopté le Plan Mondial d'Action sur les ressources phytogénétiques élaboré par la conférence et le programme international sur les ressources phytogénétiques de la FAO (1992). Dans chacun des pays, les questions de sécurité alimentaire sont prioritaires et les programmes de conservation ont été jusqu'ici essentiellement destinés à une gestion *ex situ* des ressources génétiques utiles aux programmes de sélection pour l'amélioration des principales cultures.

I.6. Besoin d'une plante modèle des légumineuses

La découverte de l'existence d'une forte similitude dans l'organisation des génomes (conservation synténique) chez des plantes appartenant à une même famille botanique, suggère qu'à l'avenir les progrès réalisés dans l'étude du génome d'une espèce devraient pouvoir être utiles pour d'autres espèces proches (Gale et Devos 1998)

Mais la distance phylogénétique existante entre familles botaniques rend indispensable l'étude d'espèces modèles au sein de chaque famille botanique possédant des espèces importantes pour l'agriculture. C'est le cas pour les céréales pour lesquelles le riz a été choisi comme espèce modèle (Shimamoto et Kyojuka 2002). De même, l'espèce *Arabidopsis thaliana* a été choisi comme plante modèle pour les crucifères (Jackson *et al.* 2000).

La plupart des légumineuses sont difficiles à étudier parce qu'elles ont un grand génome. Prenons l'exemple du génome du pois (5 000 Mb (Choi *et al.* 2004b)), il est 30 % plus grand que celui d'un être humain. Deux espèces de légumineuse, *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* (Barker *et al.* 1990; Handberg et Stougaard 1992), ont un génome relativement petit (450-500 Mb (Udvardi 2002)) et sont devenues des plantes modèles populaires. Tous les deux ont des temps de génération courts et produisent de nombreuses petites graines. Ces plantes sont autogames et peuvent être régénérées à partir d'une culture de cellules.

Ces deux espèces sont diploïdes, alors que d'autres légumineuses, cultivées ou non, peuvent être tétraploïdes (*Medicago sativa*, *Lotus corniculatus*), les rendant plus complexes à analyser.

Une comparaison entre ces deux plantes montre qu'elles diffèrent par exemple au niveau du type de nodules. *M. truncatula*, comme la plupart des légumineuses des régions tempérées, forme des nodules indéterminés ce qui la différencie de *L. japonicus* qui présente à l'inverse un type de nodule déterminé. Par ailleurs leurs partenaires symbiotiques sont

relativement éloignés du point de vue taxonomique puisqu'elles appartiennent à deux genres différents. En effet, *L. japonicus* est nodulée par *Mesorhizobium loti*, alors que *M. truncatula* est nodulée par *Sinorhizobium meliloti* dont le séquençage de son génome est terminé (Capela *et al.* 2001).

II. La plante modèle : *M. truncatula*

Dans l'objectif d'avoir un système génétique simple pour les légumineuses, *Medicago truncatula* a été choisie comme espèce modèle par de nombreux laboratoires. Au contraire de la majorité des légumineuses, *M. truncatula* est bien accessible aux outils moléculaires et aux analyses génétiques. Elle est donc adaptée à l'étude des mécanismes biologiques des grandes fonctions spécifiques aux légumineuses.

II.1. Intérêt biologique

C'est une plante annuelle herbacée, ramifiée au port souvent rampant de 15 à 80 cm de long. Elle porte des feuilles trifoliolées. Ses petites fleurs jaunes de 5 à 8 mm donnent après autofécondation des gousses cylindriques très dures, en forme de vrilles renfermant 4 à 6 graines. Les spires jointives de la gousse portent des épines recourbées perpendiculaires au plan des spires. Les graines de cette plante ont une durée de vie importante supérieure à 40 ans, et une dormance qui peut être levée facilement (Lesins et Lesins 1979). Selon ces mêmes auteurs, *M. truncatula* a un cycle de vie court qui varie de 2 à 3 mois. C'est une espèce prolifique puisque chaque plante produit 500 à 1000 graines. Elle peut être également multipliée aisément par bouturage. Cette espèce possède un habitat variable. Elle prédomine au niveau des stations sèches, des sols lourds, marneux ou argileux. Comme toutes les légumineuses sa principale caractéristique biologique est la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique.

Récemment, l'intérêt fut focalisé sur *M. truncatula* comme système pour examiner la grande richesse de production de métabolites secondaires par les légumineuses (Gepts *et al.* 2005) et la résistance aux maladies (Frugoli et Harris 2001).

Cette plante est aussi largement étudiée pour analyser le déterminisme des symbioses endomycorhiziennes lui permettant de prélever le phosphore du sol (Journet *et al.* 2001).

II.2. Intérêt agronomique

La plupart des espèces annuelles de *Medicago* sont originaires du bassin méditerranéen (Prosperi *et al.* 1993). Elles possèdent un intérêt agronomique majeur pour la production fourragère en zone sèche et pour la suppression ou la diminution de l'épandage d'engrais azotés. Leur intérêt est étroitement lié à leur capacité à se ressemer naturellement d'une année à une autre. Cette propriété peut aboutir à une installation pérenne adaptée aux aléas climatiques des zones méditerranéennes diminuant ainsi le phénomène d'érosion des

sols. Par ailleurs, de nombreuses espèces et sous-espèces de *Medicago* présentent aussi des caractères d'intérêt agronomique, qu'il serait souhaitable d'introduire dans la luzerne cultivée, tels que la tolérance au pâturage (capacité d'enracinement et de repousse), la résistance à la sécheresse, à la salinité et aux maladies.

II.3. Intérêt génétique

M. truncatula présente plusieurs avantages qui la prédisposent aux études génétiques. C'est une plante annuelle, diploïde ($2n=16$), autogame, et elle possède un génome de faible taille de 5×10^8 pb, soit environ 4 x celui d'*Arabidopsis* (Blondon *et al.* 1994). C'est également une plante apte à la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* (Chabaud *et al.* 2003) et à la régénération par embryogenèse somatique (Thomas *et al.* 1992; Chabaud *et al.* 1996). Elle forme de petites graines permettant leur culture dans des tubes à essais. Le partenaire bactérien de cette plante modèle est le plus étudié parmi les bactéries rhizobiales et le séquençage du génome de la souche de référence de *S. meliloti* 1021 a été achevé (Capela *et al.* 2001). La séquence de ce génome est disponible sur le site: <http://sequence.toulouse.inra.fr/meliloti.html>.

M. truncatula a permis d'identifier un grand nombre de gènes reliés à la symbiose dont certains ont déjà été isolés, séquencés et leur expression étudiée (Gamas *et al.* 1996; Ane *et al.* 2002; Amor *et al.* 2003; Lévy *et al.* 2004).

II.4. Synténie avec les légumineuses

La synténie est une conservation de l'ordre des gènes (ou de marqueurs) entre espèces (Schmidt 2000). On distingue la Macrosynténie et la Microsynténie.

La Macrosynténie est la conservation de grandes régions chromosomiques entre espèces proches.

La Microsynténie correspond à la conservation de petits blocs, les chromosomes ont été fortement réarrangés (Espèces éloignées).

Dans une étude récente, la macrosynténie entre les couples impliquant *M. truncatula*, *L. japonicus* et 4 autres espèces a été examinée en détail (Choi *et al.* 2004a). Les auteurs ont noté le haut niveau de macrosynténie entre *M. truncatula* et le pois, malgré les différences entre ces deux espèces. En effet le pois possède un génome beaucoup plus large (10 fois) et 7 chromosomes au lieu de 8 chez *M. truncatula*.

L'ensemble des comparaisons a permis de créer des chromosomes virtuels représentant les chromosomes des légumineuses étudiées ancrés par rapport à ceux de *M. truncatula*. Les

dernières années ont vu un progrès énorme dans l'étude de la génomique des légumineuses (Zhu *et al.* 2005; Young et Shoemaker 2006), grâce au développement des ressources génétiques et génomiques pour deux légumineuses modèles, *M. truncatula* et *L. japonicus*, ainsi que chez le soja en raison de son importance économique considérable.

II.5. Les Ressources naturelles chez *M. truncatula*

Les Medicago annuelles, dont *M. truncatula*, ont fait l'objet de nombreuses collections dans le monde en étant une composante principale dans les systèmes de Ley-farming.

Un total de 5700 populations naturelles de *M. truncatula* existe dans les collections mondiales (Tableau 4). On remarque que la Tunisie est le premier pays, d'où proviennent 17% des ressources collectées. De nos jours, On peut citer 4 centres principaux qui gèrent les ressources génétiques de *M. truncatula*.

Australian Medicago Genetic Resource Centre (AMGRC)

La collection la plus importante des Medicago se trouve en Australie (Adélaïde), dans le centre australien de ressources génétiques sur la luzerne (The Australian Medicago Genetic Resources Centre (AMGRC)). Le but de cette collection était surtout l'évaluation de génotypes provenant de la région méditerranéenne pour l'amélioration des pâturages. Cette collection compte de nos jours 22 234 accessions réparties sur 34 espèces de Medicago dont 20 997 espèces annuelles et provenant de 64 pays différents (Skinner *et al.* 1999).

Institut National de la recherche Agronomique (INRA), France, Biological Resource Center “*Medicago truncatula*”

URL: <http://www.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/accueil.php?menu=pageaccueil>

Au Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes de l'INRA, les luzernes pérennes et annuelles (dont *Medicago truncatula*) font l'objet de recherche pour les légumineuses fourragères.

L'INRA gère un ensemble d'échantillons de ressources génétiques appartenant aux luzernes pérennes et annuelles. Il s'agit d'anciennes variétés et de populations naturelles, qu'elles soient cultivées ou sauvages, et collectées au travers de prospections en France, en Europe et sur le pourtour Méditerranéen. La gestion de cette collection se fait dans le cadre d'une stratégie nationale coordonnée par le Bureau des Ressources Génétiques (BRG).

Tableau 4: Distribution des populations de *M. truncatula* collectées dans différents pays et composant les collections mondiales existantes

(Source: *Medicago truncatula* handbook, version Novembre 2006)

URL: http://www.noble.org/MedicagoHandbook/pdf/WildAccessions_Populations.pdf

COUNTRY	<i>M. truncatula</i>
Algeria	755
Tunisia	951
Morocco	909
Libya	413
Egypt	2
Jordan	38
Israel	296
Iran	3
Syria	3
Turkey	50
Cyprus	424
Malta	6
Greece	355
Italy	292
France	142
Spain	226
Portugal	110
Canary & Madeira	13
Turkmenistan et Azerbijan	3
Russia	1
Eastern Europe	7
Ethiopia	1
America	3
Australia	612
South Africa	17
Unknown	68
TOTAL	5700

Elle implique des partenaires publics et privés et s'appuie sur la Banque de Ressources Génétiques gérée par le Groupement d'Etudes et de Contrôle des Variétés et des Semences (GEVES).

Dans les années 80, l'INRA a mené des collectes de la plante *M. truncatula* dans 12 pays autour de la méditerranée. Au total 142 populations sont établies, et une accession correspond à une population et pas à une lignée. Pour chaque population, les données concernant les gousses, la description du site, les caractéristiques du sol et les données climatiques sont décrites.

Agricultural Research Service (ARS), United States Department of Agriculture (USDA)

Ce centre possède 323 accessions de *M. truncatula*, collectées ou bien données, depuis les années 50. Cette collection provient de 22 pays différents.

Les informations requises pour l'ensemble de ces accessions sont publiées sur le web, sur le site Germplasm Resources Information Network (GRIN) (<http://www.ars-grin.gov/npgs/>).

Laboratoire Interactions Légumineuses Microorganismes (LILM), Centre de Biotechnologie, Technopole de Borj-Cédria (CBBC), Tunisia

Au sein de ce laboratoire, 14 populations naturelles de *M. truncatula* ont été collectées et 184 lignées pures ont été retenues.

Cette collection est exploitée en collaboration avec le professeur Thierry Huguet (ENSAT, France), et plusieurs lignées contrastantes sont identifiées pour des caractères d'intérêt agronomique. Plusieurs équipes de recherches utilisent ces couples de lignées contrastantes, ainsi que les populations de lignées recombinantes (RIL) issues des croisements de ces lignées.

II.6. Outils génétiques et génomiques disponibles

M. truncatula, avec un petit génome approximativement de 500 Mbp, a été largement acceptée comme plante modèle pour des aspects multiples de la génétique de légumineuse et de génomique (Cook 1999).

Plusieurs projets à grande échelle sur la génomique de *M. truncatula* ont été lancés par la communauté internationale et des outils essentiels sont développés pour la génomique structurale et fonctionnelle suite au développement des ressources bioinformatiques (Frugoli et Harris 2001).

L'analyse génétique d'un organisme exige la mise en œuvre de méthodes et techniques diverses qui vont permettre d'ordonner les gènes, de les localiser sur le génome et enfin de les cloner. La création de cartes génétiques et génomiques est donc indispensable. En outre, l'analyse comparative de ces cartes d'organismes différents permet d'étudier l'évolution de leurs génomes (Zhu *et al.* 2005).

Nous allons dire quelques mots sur les différents outils indispensables pour l'analyse des génomes.

II.6.1. Microsatellites

Parmi les marqueurs possibles disponibles, les microsatellites sont généralement utilisés pour de nombreux projets génétiques en raison de leur grande reproductibilité et de la facilité d'identifier des allèles.

Les microsatellites sont des séquences d'ADN répétées en tandem dont l'unité de répétitions varie d'une à six pb. Dans la littérature, on les appelle aussi: simple sequence repeats (SSR), short tandem repeats (STR), ou variable number tandem repeats (VNTR).

Les principales contraintes des SSRs, en tant que marqueurs moléculaires, sont l'effort et le coût exigé pour leur développement. Pour cette raison leur utilisation a été limitée à quelques espèces importantes sur le plan agricole.

La recherche des SSRs a été récemment centrée sur les EST (Expressed Sequence Tag) - SSRs, qui sont relativement peu coûteux comparés au développement de SSRs génomiques (Gupta *et al.* 2003) puisqu'ils sont identifiés dans des séquences nucléotidiques. Ces marqueurs sont plus transmissibles aux genres étroitement liés puisqu'ils sont ancrés dans des régions conservées transcrites (Decroocq *et al.* 2003).

II.6.2. Microarrays et analyse du transcriptome

Chez *M. truncatula*, environ 190.000 ESTs (May et Dixon 2004; Young *et al.* 2005) (www.medicago.org/MtDB2/ et www.tigr.org/tdb/tgi/plant.shtml) avec les microarray et les puces à ADN correspondantes, ont été produites. Les tissus sources de ces ESTs incluent les tissus de base des tiges et des racines, ainsi que des tissus activés, lors de symbiose rhizobiales et mycorrhiziennes et lors des résistances aux maladies ou les poils absorbants racinaires (Covitz *et al.* 1998; Cook 1999).

L'assemblage (clustering) des EST permet de connaître la séquence complète de l'ADNc. On peut donc choisir parmi l'ensemble des gènes représentés le meilleur clone ADNc pour mettre sur le micro-réseau (microarray).

Un consortium NSF travaille à la construction d'une collection non redondante et universelle d'ADNc comportant au départ 6 000 gènes et qui représentera à terme tous les gènes transcrits de *M. truncatula* (estimés à 20-30 000) et sera accessible à la communauté sous la forme de clones individuels et de microarrays.

II.6.3. Collections de variants naturels et de mutants

Une collection représentative de la variabilité génétique naturelle, ainsi qu'une collection de mutants induits chez *M. truncatula*, représentent un pilier important et stratégique pour les actions d'analyse génomique, de validation de gènes candidats, et d'innovation végétale. Pour Mtr, la collection de lignées est gérée à l'INRA de Montpellier et celle de mutants est gérée à l'INRA de Dijon (Unité de Recherches en Génétique et Ecophysiologie des Légumineuses à Graines).

Plusieurs programmes de mutagenèse par des agents physico-chimiques classiques ont été réalisés: par rayons γ (Sagan *et al.* 1995), par l'EMS (Penmetsa et Cook 2000). Ils ont fourni le matériel nécessaire pour des criblages à grande échelle sur divers phénotypes, et en premier lieu pour des mutants affectés dans les interactions symbiotiques fixatrices d'azote et/ou mycorhizienne.

II.6.4. Mutagenèse insertionnelle

La mutagenèse insertionnelle permet de créer des mutants en insérant au hasard, dans le génome, un segment d'ADN repérable (ADN-T ou transposons). Lorsque celui-ci s'intègre dans un gène, il en altère la fonction et provoque la modification du caractère correspondant donc une mutation. Le gène muté est localisé grâce à l'élément inséré, et sa fonction est identifiée grâce au caractère affecté. Cette stratégie a déjà fait preuve de son efficacité chez *A. thaliana* pour la génétique directe ou inverse (Parinov et Sundaresan 2000). Elle a permis de construire plusieurs collections de plus de 50 000 lignées d'insertion d'ADN-T (Bent 2000).

Chez *M. truncatula*, des Systèmes knock-out impliquant ADN-T et Tnt1 (retrotransposon du tabac) (d'Erfurth *et al.* 2003), et gene Tilling (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) sont en cours de développement. A l'INRA de Dijon, un projet de TILLING chez *M. truncatula* a été financé par le projet FP6 "Grain Legumes".

II.6.5. Cartes génétiques, physique et cytogénétique

Les cartes génétiques reposent sur l'évaluation de la distance relative séparant des caractères héréditaires ou marqueurs génétiques. La distance génétique entre deux gènes se

définit par la fréquence d'apparition d'événements de recombinaisons entre ces gènes d'une génération à l'autre. Cette fréquence de recombinaison constitue l'unité de mesure des cartes génétiques, 1% de recombinaison correspondant approximativement à une distance de 1 *centi-Morgan*.

Des cartes génétiques comprenant plusieurs centaines de marqueurs ont été établies par différents laboratoires (T. Huguot, INRA-CNRS Toulouse, D. Cook, Univ. de Davis, USA).

L'établissement d'une carte physique a principalement pour but de faciliter l'établissement de la séquence finale du génome. Deux banques génomiques, de 6 et 23 équivalents génome, construites dans un vecteur de type BAC (D. Cook), assurent une bonne couverture de l'ensemble du génome, et vont permettre la réalisation d'une carte physique.

L'hybridation moléculaire *in situ* sur métaphases colorées (FISH : Fluorescence In Situ Hybridization) permet de localiser et d'ordonner directement des sondes correspondant à des gènes, des marqueurs génétiques, etc. Il est ainsi possible d'établir des cartes cytogénétiques dont la résolution maximale est environ une à trois Mb.

II.6.6. Séquençage et Annotation du génome

L'annotation de génome est le processus par lequel la séquence d'ADN est analysé et l'information est ajoutée aux régions spécifiques pour décrire des dispositifs d'intérêt biologique, le plus important sont les gènes codant pour des protéines. Il y a deux composants distincts à l'annotation de génome: prédiction des structures de gène et description de la fonction putative des gènes. Un ensemble uniforme d'annotations du génome de *M. truncatula* a été produit par coordination internationale en profitant de l'expérience acquise avec d'autres plantes (*Arabidopsis* et le riz).

Pour la plante modèle *M. truncatula*, on estime qu'il a été séquencé 2000 BAC d'environ 300 Mpb en janvier 2007 (Young, N.: www.sgn.cornell.edu). On prévoit que 90% du génome exprimé sera séquencé fin 2008.

II.7. Les programmes internationaux

Le choix d'une Légumineuse- modèle a permis le développement de programmes ambitieux de génomique des deux côtés de l'Atlantique.

- La fondation NSF (National Science Foundation) finance plusieurs projets importants (<http://www.medicago.org>): (1) de génomique structurale avec la construction d'une carte physique par Doug Cook à l'Université de Californie à Davis, (2) de transcriptomique

impliquant l'Université du Minnesota à Saint-Paul (Kate VandenBosch) et le TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/mtgi/>) et (3) un programme de génomique comparative *M. truncatula*, luzerne et soja (Nevin Young à Saint-Paul et Doug Cook à Davis).

- La Noble Foundation (Ardmore, USA) (<http://www.noble.org/medicago/index.htm>) développe également un programme important d'études des transcriptome, protéome et métabolome, avec un intérêt particulier pour la symbiose endomycorhizienne et la synthèse de métabolites secondaires comme les isoflavonoïdes, qui sont des composés d'un grand intérêt médical. Par ailleurs cette fondation finance le séquençage massif du génome de *M. truncatula* par le Advanced Center of Genome Technology de l'Université d'Oklahoma, dirigé par Bruce Roe (<http://www.genome.ou.edu/>) (Young *et al.* 2005).
- Programme de séquençage du génome de *M. truncatula*: Le programme de séquençage du génome entier de *M. truncatula* a été initié en 2002 par l'université d'Oklahoma avec le soutien de Samuel Roberts Noble Foundation. Par la suite ce projet a été fortement appuyé par U.S. National Science Foundation et le programme European Union 6th Framework. Pour information, voir les sites: www.medicago.org/genome; www.genome.ou.edu; www.tigr.org/tdb/e2k1/mta1/ et mips.gsf.de/proj/plant/jsf/medi/index.jsp. La fin de ce programme est prévue pour la fin de l'année 2008.

II.8. Ressources bioinformatiques pour *Medicago truncatula*

- The Center for *Medicago* Genomics Research: www.noble.org/medicago/index.html
- The Consensus Legume Database: www.legumes.org
- *Medicago* genome project at the University of Oklahoma: www.genome.ou.edu/medicago.html
- The Legume Information System: www.comparative-legumes.org
- Toulouse, C.N.R.S.-I.N.R.A: <http://medicago.toulouse.inra.fr/Mt/EST/>
- The *Medicago truncatula* Gene Index: www.tigr.org/tdb/tgi/mtgi/
- *Medicago* Bioinformatics at the University of California – Davis: <http://medicago.plantpath.ucdavis.edu/>

Il est établi que *M. truncatula* peut être utilisée pour des approches multidisciplinaires reliant des domaines très divers. A long terme, un impact des recherches intégrant les informations génétiques et fonctionnelles est attendu pour étendre les connaissances appliquées à la recherche agronomique des légumineuses économiquement importantes. Ces connaissances permettront une meilleure caractérisation et identification des gènes et caractères impliqués dans des résistances aux maladies et liés à une amélioration de la productivité des cultures sous différentes contraintes environnementales.

B. Objectifs du travail

L'objectif de ce travail était d'initier une approche génétique, physiologique et moléculaire de la diversité des populations naturelles autochtones de *M. truncatula*. Ce travail a débuté par une prospection du territoire national et une localisation des populations de *M. truncatula* réalisée par Aouani ME et Abdelly C. en 1999. Cette prospection a été réalisée avec l'objectif d'avoir des populations représentatives de tous les étages éco-climatiques de la Tunisie.

Dans le contexte du présent travail, le matériel biologique a été d'abord caractérisé du point de vue de leur structure génétique en utilisant des marqueurs moléculaires neutres, puis du point de vue de leur tolérance au stress salin. C'est pourquoi ce manuscrit est divisé en 3 chapitres reflétant la progression dans l'approche: Diversité des Ressources génétiques vers Gènes soutenant cette diversité naturelle.

C. Contexte du travail

Les travaux de cette thèse ont été initiés dans le cadre du projet de coopération Franco-tunisien CMCU (2000-2002): « Identification des mécanismes développés par la symbiose *Rhizobium*-légumineuses pour une interaction optimale sous contraintes environnementales: modèle *Medicago truncatula*-*Rhizobium* associés ». L'objectif majeur du projet était d'analyser la diversité des populations naturelles autochtones en Tunisie de *M. truncatula* et des populations rhizobiennes natives associées. Le matériel caractérisé devait être exploité pour l'étude du déterminisme de cette symbiose et pour l'identification de marqueurs impliqués dans la tolérance à la salinité. Les contraintes environnementales de la Tunisie sont communes aux pays du bassin Méditerranéen caractérisés par l'alternance d'une période humide et froide avec une période sèche et chaude.

Chapitre 1

Diversité génétique des lignées de *M. truncatula*

Chez les végétaux, il existe non seulement une abondante diversité des espèces, sauvages ou cultivées, mais également de très nombreuses variantes entre les individus au sein d'une même espèce (variabilité génétique). C'est cette diversité génétique (aussi appelée Ressources Génétiques) qui constitue la matière première du sélectionneur pour créer de nouvelles variétés. Ces ressources génétiques représentent un patrimoine qu'il est nécessaire de préserver et de mieux connaître afin de mieux l'utiliser. Ainsi, la collecte, la caractérisation et la conservation de ces ressources sont des activités indispensables à la création des variétés de demain.

I. Synthèse bibliographique: Diversité naturelle des plantes, intérêts et utilisations

I.1. Biodiversité et variations naturelles

La biodiversité est définie par convention comme étant "la variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie" (Extraits de la Convention sur la diversité biologique (PNUE, 5 juin 1992)); cela inclut la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes. La biodiversité couvre les trois niveaux d'organisation biologique: génétique, taxonomique et écologique. Elle comprend aussi les relations et interactions existant à l'intérieur et entre ces trois niveaux hiérarchiques.

La biodiversité est dynamique: la composition génétique des espèces change au cours du temps en réponse aux pressions de la sélection naturelle et humaine; la présence et l'abondance relative d'espèces dans les communautés écologiques sont modifiées sous l'effet de facteurs physiques et écologiques.

Dans l'agriculture, la diversité génétique est exploitée pour créer des variétés adaptées à différents environnements et conditions de croissance. L'aptitude de telle ou telle variété à résister à la sécheresse ou à l'inondation, à se développer sur un terrain pauvre ou riche, à résister à de nombreuses espèces d'insectes ravageurs ou maladies, à fournir des produits riches en protéines ou ayant de meilleures qualités gustatives, est un caractère transmis par les gènes. Ces ressources génétiques sont la matière première qu'emploient les sélectionneurs de plantes et les spécialistes de la biotechnologie pour produire de nouvelles variétés. Sans cette diversité, nous ne pourrions plus adapter les cultures à l'évolution constante des besoins et des conditions.

La diversité naturelle des plantes a fasciné l'humanité à travers l'histoire, principalement en raison de la variation énorme qui existe pour la morphologie ainsi que d'autres traits de développement. Les effets de forme physique d'une telle variation naturelle présente parmi des espèces (interspécifique) ont conduit à l'évolution de plantes par sélection naturelle, cette diversité de développement étant la base de la taxonomie et phylogénie (Cronk 2001).

En outre, une variation comparable liée au développement existe dans beaucoup d'espèces (intra spécifiques), reflétant probablement des adaptations à différents environnements naturels. Cette variation intra spécifique a été employée pour la domestication et l'amélioration génétique de plus de 100 espèces de plantes (Alonso-Blanco *et al.* 2005) en appliquant une sélection dirigée sur des aspects multiples liés au développement. De cette façon, des variétés adaptées à divers environnements agricoles et avec un rendement accru ont été produites chez beaucoup de plantes cultivées pour la nourriture humaine par exemple le blé dur.

Un défi important de biologie est de comprendre la base génétique et les mécanismes moléculaires de toute cette variation naturelle au niveau du nucléotide, de la protéine et de la cellule (Alonso-Blanco *et al.* 2005). Cette analyse a commencé tout récemment grâce à la disponibilité de séquences entières de génome, qui permettent le développement des outils génomiques visant l'identification des fonctions de gènes dans les espèces modèles comme *A. thaliana* et le riz.

I.2. La conservation des ressources génétiques: les collections

Dans l'effort de conserver la diversité génétique de plusieurs espèces de plantes, de nombreuses collections de génotypes ont été assemblées autour du monde. Pour une meilleure évaluation et utilisation de ces collections, il était nécessaire d'identifier un petit nombre d'individus ou une Core collection représentative de la variation génétique de la collection entière. D'après Brown (1989b; 1989a), une core collection de 10% d'accessions contient théoriquement 70% des allèles de la collection entière.

Ces cores collections sont établis par différentes méthodes de maximisation de diversité comme le groupement par la moyenne de la distance Euclidienne entre différents génotypes sur la base de différents caractères agronomiques (Skinner *et al.* 1999). Diwan *et al.* (1995) ont comparé plusieurs méthodes, pour une collection aux Etats Unis d'espèces annuelles de Medicago, dans l'objectif d'optimiser l'obtention de cores collections.

I.3. Diversité naturelle des légumineuses en Tunisie

La Tunisie est composée de différentes zones biogéographiques dont la diversité des biotopes du Nord au Sud représente une richesse encore aujourd'hui mal appréciée.

La constitution des collections de légumineuses par les sélectionneurs est pour l'instant liée aux objectifs des travaux d'amélioration. Cette action a intéressé plusieurs variétés des espèces suivantes: Pois chiche, Lentille, Luzerne, et Lupin. Ceci avait pour objectif d'améliorer les variétés locales par sélection généalogique simple en vue d'assurer l'homogénéité, la productivité et la réintégration de ces variétés locales améliorées dans le circuit de production.

Au niveau des espèces fourragères la Tunisie possède un patrimoine génétique riche et diversifié. La diversité génétique de certaines espèces fourragères en Tunisie a été très peu exploitée par les sélectionneurs et ceci peut être expliqué d'une part manque de moyens matériels et humains des institutions de recherche et d'autre part par l'absence d'organisme prive, coopératif ou étatique de multiplication pour les semences de ces espèces fourragères.

En conclusion, on peut dire que l'utilisation des ressources phytogénétiques locales dans les programmes de sélection et d'amélioration a permis à la Tunisie de disposer d'un matériel végétal adapté à ses conditions abiotiques et biotiques. Plusieurs génotypes ont été sélectionnés et développés sur le plan commercial aussi bien en Tunisie qu'à l'étranger. On peut citer les cultivars *Medicago truncatula* «BORUNG» (<http://www.pi.csiro.au/ahpc/legumes/pdf/borong.pdf>) et *Medicago sativa* «GABES» (Jebara *et al.* 2001).

Il faut signaler que le gouvernement tunisien qui accorde une attention particulière à la recherche scientifique et à la protection des ressources naturelles et de l'environnement ne manquera pas de poursuivre ses efforts pour consolider toutes les activités de conservation des ressources phytogénétiques.

I.4. Utilisation de la diversité naturelle pour l'amélioration de la tolérance au sel

Un grand nombre d'espèces ont été employées pour examiner la physiologie de réponse à la salinité, mais peu sont celles associées aux études génétiques ou moléculaires. Les espèces les plus étudiées en physiologie sont les halophytes (Bohnert et Sheveleva 1998), intéressant pour leur tolérance au sel.

Au centre des recherches, on retrouve l'intérêt du développement des techniques moléculaires et génétiques chez *Arabidopsis*. Bien qu'*Arabidopsis* soit un glycophyte typique, pas très tolérant au sel, la sensibilité au sel entre les accessions est variable. Du fait que le

séquençage du génome de cette plante est terminé, la comparaison entre les différents génotypes peut aboutir à la localisation de QTL liés à la tolérance au sel et l'identification de gènes majeurs si une large différence existe entre écotypes. Des études faites (Zhu 2000; 2001) sur cette espèce suggèrent qu'*Arabidopsis* peut contenir des versions de gènes importants qu'on pourrait trouver chez des espèces modèles d'halophytes, codant pour la résistance ou bien influençant la résistance au sel.

Objectifs :

Dans ce chapitre nous avons essayé d'estimer le niveau de diversité génétique existant au sein des populations naturelles de *M. truncatula* collectées en Tunisie. Pour cela, nous avons utilisé différentes méthodologies pour évaluer la diversité génétique et la comparer à l'échelle intra- et inter-populations. La structuration de la diversité génétique peut donner ainsi une indication sur le modèle d'évolution appliqué à la population dans ses conditions environnementales.

II. Méthodologies

II.1. Analyse de la diversité génétique

II.1.1. Caractérisation de la diversité naturelle

La prospection et la collecte ne consistent pas seulement à ramasser des plantes ou parties de plantes en attribuant à chacune une fiche de renseignements. Bien qu'il n'existe aucun procédé standard, cette activité doit tenir compte de quelques règles élémentaires et indispensables qu'il faut savoir respecter. L'échantillonnage en constitue la phase clé. Les méthodes varient selon le type de matériel collecté: graines, organes de propagation végétative (tubercules, bulbes, stolons, fruits...).

Les méthodes de collecte et les normes d'échantillonnage varient beaucoup selon l'espèce recherchée, sa fréquence, l'étendue de sa culture ou de son aire de répartition pour les plantes spontanées, ainsi que son mode de reproduction: allogame ou autogame.

L'analyse de la variabilité peut être abordée par un ensemble de techniques allant de l'observation macroscopique du phénotype jusqu'à l'analyse de l'ADN.

II.1.1.1. Marqueurs morphologiques

Dans les programmes de sélection des plantes, Les caractères morphologiques sont les premiers à être observés. Ces caractères intéressent diverses parties de la plante, par exemple

longueur des tiges, surface foliaire, initiation de la floraison (Cui *et al.* 2001; Gomez *et al.* 2004). Ces caractères sont utilisés de même pour estimer la variation intra- et inter-populations. Ils sont généralement limités en nombre de caractères relevés et directement influencée par l'environnement. Néanmoins, ils fournissent des informations utiles pour décrire et identifier le matériel biologique (Andersson *et al.* 2006).

II.1.1.2. Allozymes

Les marqueurs biochimiques dont les allozymes, ont été utilisés pour caractériser la diversité génétique de plusieurs plantes. Les allozymes sont des formes moléculaires distinctes d'une enzyme chez un même organisme et ayant la même activité catalytique. Leur origine est la mutation au niveau de l'acide aminé qui affecte la charge totale de la protéine sans affecter le site catalytique. Leur révélation se fait par séparation électrophorétique des protéines et puis une coloration histochimique des enzymes.

Des populations naturelles tunisiennes de *M. ciliaris* et *M. intertexta* ont été évaluées pour leur polymorphisme génétique à l'aide de 7 systèmes enzymatiques. Six locus polymorphes ont été distingués permettant une analyse du polymorphisme génétique existant entre ces deux espèces annuelles (Abdelkefi *et al.* 1997).

La diversité génétique d'espèces annuelles de pois chiche a été étudiée par Labadi *et al.* (1996) à l'aide de marqueurs enzymatiques. Également, ces marqueurs ont été utilisés en combinaison avec des marqueurs morphologiques pour comparer la structuration de la diversité génétique chez *M. sativa* (Jenczewski *et al.* 1999).

Les allozymes ont l'inconvénient d'être lourd et difficile à manipuler, de même qu'ils présentent une reproductibilité assez faible. Comme les marqueurs morphologiques, ils sont très sensibles à l'environnement

II.1.1.3. Marqueurs neutres

Pendant longtemps, les caractères morphologiques ont été les seuls outils disponibles pour retracer l'histoire des populations. Toutefois, ce type de marqueur ne rend souvent pas fidèlement compte de l'histoire des populations. En effet, il arrive fréquemment que les variations phénotypiques ne soient pas seulement liées à l'histoire évolutive des populations mais soient également déterminées par des facteurs tels que l'adaptation locale. Les marqueurs moléculaires, réputés neutres (n'agissant pas sur les caractères sélectionnés), s'affranchissent de ces facteurs confondants et peuvent permettre d'accéder à l'histoire des populations.

L'analyse de la diversité génétique neutre permet de comprendre la structuration spatiale de la diversité et de construire des hypothèses sur les différents événements liés à la domestication et à la diffusion de la plante (Nordborg *et al.* 2005).

Les outils moléculaires à eux seuls ou bien en combinaison avec d'autres approches biotechnologiques ont beaucoup facilité la conservation des ressources génétiques et leur utilisation. Les marqueurs moléculaires basés sur l'ADN (RFLP, RAPD, AFLP, SSRs, etc.) ont été beaucoup utilisés pour identifier, maintenir, caractériser et évaluer les ressources génétiques avec plusieurs espèces de plantes. Contrairement aux marqueurs traditionnels (morphologiques et biochimiques), les marqueurs moléculaires ne sont pas influencés par les fluctuations de l'environnement et sont indépendants de l'organe analysé et du stade de développement de la plante. Parmi ces marqueurs, les microsatellites sont les outils les plus polymorphes et informatifs.

Remarque: Même si les marqueurs phénotypiques et les microsatellites sont les outils les plus utilisés dans les études de diversité naturelles des plantes, il n'y a généralement peu ou pas de corrélation entre la diversité révélée par ces deux types de marqueurs (Vanhala *et al.* 2004). Bajracharya *et al.* (2006) ont montré que, chez des populations de riz au Népal se trouvant à hautes altitudes, il n'y a pas d'association entre caractères morphologiques et SSR analysés. Ceci pose une question fondamentale à laquelle nous essaierons de répondre plus loin dans ce chapitre en comparant les données morphologiques et moléculaires.

II.1.2. Paramètres d'analyse de la diversité

II.1.2.1. Hétérozygotie (H₀)

L'hétérozygotie moyenne est estimée à partir des fréquences alléliques de chaque population et des fréquences attendues des hétérozygotes en supposant chaque population à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Les taux d'hétérozygotie pourront ainsi être utilisés pour mesurer la différenciation entre population.

II.1.2.2. Déséquilibre de liaison (DL)

Le déséquilibre de liaison (DL) mesure l'association entre allèles présents en deux sites polymorphes. Il dépend de la distance physique entre ces deux sites mais aussi de l'histoire évolutive (goulots d'étranglements, expansion démographique, épisodes de sélection,) (Flint-Garcia *et al.* 2003; Rafalski et Morgante 2004) et du système de reproduction de la population considérée. Par exemple, de forts niveaux de DL sont attendus

au sein de populations autogames ou au sein de populations subdivisées. A grande échelle, (collection) les patrons de DL peuvent nous renseigner sur l'histoire évolutive et sélective de l'espèce. A l'échelle d'une population, les patrons de DL peuvent refléter une histoire plus récente. Le DL peut dépendre des caractéristiques génomiques de la zone étudiée (taux de recombinaison local, structure en introns/exons).

Connaître comment le DL décroît avec la distance physique qui sépare deux sites, dans différentes régions chromosomiques est important notamment pour établir des stratégies efficaces d'échantillonnage de la diversité (core collection), et pour prédire l'efficacité de méthodes de cartographie par association (DL mapping). Lorsqu'un fort DL existe à l'échelle du génome, on peut espérer capturer une diversité importante pour des gènes utiles en échantillonnant une richesse allélique maximale à des locus neutres (démarche core-collection, Bataillon *et al.* (1996)). A l'inverse, un DL limité à des sites physiquement proches (quelques kb) rend cette démarche peu efficace mais peut être utile pour cartographier à fine échelle des gènes d'intérêt (Remington 2001).

Chez les plantes, peu de données sont disponibles, notamment pour des espèces autogames (Nordborg et Tavaré 2002). Chez ces espèces, on s'attend notamment à ce que l'échelle d'étude (population naturelle, collection) modifie fortement les patrons de DL observés.

Dans les populations d'*Arabidopsis thaliana*, le déséquilibre de liaison au niveau des populations locales est bien plus fort qu'à l'échelle de l'ensemble des populations (Nordborg *et al.* 2002).

II.1.2.3. Indices de diversité

H_F (Hétérozygotie espérée): Chez les eucaryotes, les régions du génome peuvent avoir des taux de recombinaison méiotiques différents. L'Etude de ces variations du taux de recombinaison le long des chromosomes a pour objectif de comprendre leurs causes et aussi leurs conséquences sur la structure et l'évolution des génomes eucaryotes.

On démontre ainsi que la population observée, considérée dans son ensemble, n'est pas dans les proportions de la loi de Hardy-Weinberg. Il existe un "déficit relatif en hétérozygotes", par rapport à la valeur théorique $2\bar{x}_1\bar{x}_2$. Cette "réduction d'hétérozygotie" est appelée l'effet Wahlund. Elle ne s'observe que s'il existe une divergence des fréquences alléliques entre les sous-populations. Les taux d'hétérozygotie pourront ainsi être utilisés pour mesurer la différenciation entre populations.

Distance de Nei : Une distance génétique quantifie le degré de divergence génétique entre unités taxonomiques (populations, espèces, ...) prises deux à deux. Plusieurs mesures de distance génétique ont été proposées. La plus utilisée est actuellement celle de Nei (Nei 1978). Cette distance s'établit sur un ensemble de locus (>10) afin d'obtenir une meilleure estimation. Si la distance génétique D est par exemple égale à 0,57, cela signifie que 0,57 substitutions alléliques par locus (ou 57 substitutions pour 100 locus) sont survenues au cours de l'évolution séparées des deux populations. La variance de D dépend du nombre de locus analysés et de la taille de l'échantillon.

II.1.2.4. ACP et AFC

ACP: L'ACP a pour but de condenser et réduire des données quantitatives. Le pré-traitement doit être soit centré soit centré-réduit. Le programme calcule la matrice des covariances, la diagonalise, en extrait les valeurs et vecteurs propres.

Les vecteurs propres de la matrice définissent les axes factoriels. Les données du tableau réduit sont ensuite projetées sur ces axes. Les coefficients de corrélation étant toujours compris entre -1 et +1, le programme affiche le cercle de corrélation de rayon 1. La méthode s'applique lorsque les données sont quantitatives (ou qualitatives avec recodage)

AFC: L'AFC peut être considérée comme une ACP particulière dotée de la métrique du χ^2 qui ne dépend que du profil des colonnes du tableau. L'analyse permet, dans le plan des deux premiers axes factoriels, une représentation simultanée, souvent fort suggestive des ressemblances entre les colonnes ou les lignes du tableau et de la proximité entre lignes et colonnes.

Le logiciel utilisé calcule, comme en ACP, la matrice des covariances, la diagonalise et en extrait les valeurs et vecteurs propres. Ce qui est intéressant dans l'AFC, c'est que les données des colonnes (les descripteurs) et des lignes (les molécules) sont interchangeable, alors qu'en ACP on ne travaille que l'ensemble des colonnes. Elle permet de traiter des variables quantitatives et qualitatives (ce qui n'est pas le cas de l'ACP). Cette méthode est la meilleure façon de visualiser et d'interpréter les corrélations entre variables.

L'AFC a un autre avantage, c'est d'étudier la proximité entre les 2 nuages de points (colonnes et lignes):

- ❖ le nuage des colonnes (descripteurs) (allèles)
- ❖ le nuage des lignes (molécules) (lignées)

❖ et la superposition des 2 nuages ce qui nous permet de mieux comprendre les relations entre descripteurs et molécules (lignées et allèles).

Les éléments proches du centre correspondent à la moyenne, les éléments éloignés étant les plus caractéristiques. Le montant d'inertie (exprimé en %) de chaque facteur est visualisable sous forme d'histogramme. Si les 2 premiers axes ont pour valeurs propres cumulées un montant supérieur à 80%, une représentation en 2D en général suffit. Dans les autres cas, on choisit les axes factoriels en entrant leur numéro dans chaque boîte d'édition de la boîte de dialogue générale.

II.1.2.5. Test sur permutations

Des permutations permettent d'examiner des hypothèses et d'évaluer la précision à estimer quand les propriétés distributionnelles des tests statistiques ne sont pas connues (par exemple la mesure de la distance génétique), ou des évaluations des mesures d'incertitude (par exemple la normalité) ne sont pas rencontrées. L'attribution ou l'ordre des points de repères est permutée et le test statistique est recalculé pour chaque permutation. Habituellement 99 à 4 999 permutations sont évaluées. La valeur vraie de la statistique est comparée à la distribution des valeurs des données permutées. Si la valeur vraie est 95% plus grand que de la valeur permutée, alors l'hypothèse nulle est rejetée ($P = 0.05$).

II.1.2.6. Isolement par la distance (test de Mantel)

Le test de Mantel (Mantel 1967) est utilisé pour mesurer et tester la corrélation linéaire entre deux matrices de proximité. Il est souvent utilisé en écologie pour tester si les différences entre plusieurs sites, d'une part en termes d'abondance des espèces étudiées, d'autre part en termes de caractéristiques géophysiques, peuvent être reliées ou non.

En génétique des populations ce test est utilisé pour tester l'hypothèse d'isolement par distance en comparant une matrice des distances génétiques basées sur les données moléculaires des populations à une matrice de distances géographiques entre les sites d'origine correspondants (Timothy *et al.* 2000).

Il est recommandé pour les petits échantillons ($n < 20$) d'effectuer des permutations pour la signification du test. L'hypothèse nulle est que le rapport observé entre les deux matrices de distance pourrait avoir été obtenu par n'importe quel arrangement aléatoire dans l'espace des observations.

II.2. Corrélations de la diversité génétique avec les conditions écogéographiques

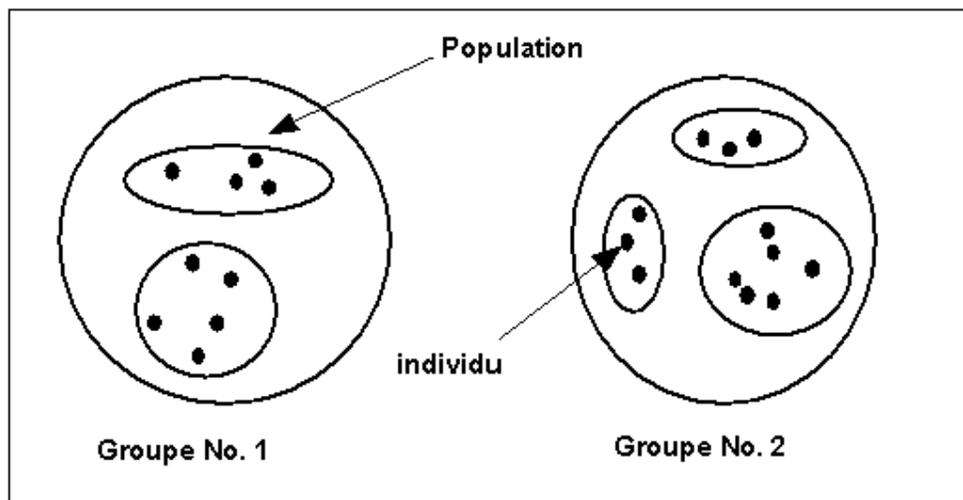
La relation entre milieu d'origine des cultivars sélectionnés et leur capacité d'adaptation au milieu de culture et d'exploitation doit être régulièrement confirmée (Prosperi *et al.* 1993). Pour tester les relations entre les deux paramètres on a utilisé le test AMOVA.

Principe du test AMOVA (Analysis of Molecular Variance)

Ce test permet d'estimer quelle proportion de la variabilité génétique de la population est due à:

- ❖ Les variations intergroupes
- ❖ Les variations inter-populations à l'intérieur des groupes
- ❖ Les variations inter-individus à l'intérieur des populations

Les groupes étant choisis selon la classification des caractères éco-géographiques.



Test d'une structure de population (AMOVA)

La significativité est testée en permutant :

- a. Les populations entre groupes
- b. Les individus entre populations mais à l'intérieur des groupes
- c. Les individus entre populations entre groupes.

II.3. Corrélation entre la diversité moléculaire et phénotypique

La question de base est: la variation moléculaire est-elle corrélée avec la variation génétique quantitative observée dans les populations biologiques ?

Les SSRs sont associés avec différents locus. Ils peuvent coder pour des éléments fonctionnels de protéines et servent comme éléments de transcription (Kashi *et al.* 1997). Ils présentent un haut niveau de mutations spontanées du nombre de répétitions, ce qui peut causer une variation quantitative dans la fonction des protéines et l'activité des gènes.

La valorisation des ressources génétiques passe par une accumulation de données préalables sur les bases génétiques de caractères agronomiques ciblés. Ainsi, plusieurs techniques de phénotypage rapide (ex chez *Arabidopsis*) sont développées pour étudier un grand nombre de génotypes avec des moyens réduits (Loudet *et al.* 2007).

III. Matériel & Méthodes

III.1. Constitution de la collection tunisienne de *M. truncatula*

Cette collection faite à l'INRST (Institut National de la Recherche Scientifique et Technique) a pour avantages le fait que les sites prospectés présentent différents climats et subissent des contraintes abiotiques diverses. Ainsi le matériel végétal collecté présente des adaptations à leur environnement d'origine. Les sites ont été choisis dans des milieux naturels sauvages encore éloignés des agglomérations urbaines, permettant ainsi, en cas de besoin, de retourner sur le terrain et de faire un nouvel échantillonnage. Dans cette thèse, nous n'avons travaillé que sur les 10 sites de la collection qui étaient disponibles à l'époque.

Les sites de collecte de *M. truncatula*

Dix sites (Figure 5, les photos des sites sont données dans l'annexe 2) où poussent des populations de *M. truncatula* ont été choisis sur l'ensemble du territoire national selon 4 critères retenus qui visent à obtenir une diversité maximale et à préserver la possibilité de revenir sur le site ultérieurement :

- ❖ l'emplacement des sites dans des zones non agricoles et non urbaines.
- ❖ L'abondance des gousses de *M. truncatula*.
- ❖ La possibilité de bien repérer le site par les indices inchangés (ex: poteaux d'électricité, borne de kilométrage).
- ❖ La diversité des situations éco-pédologiques.

III.1.1 Mode de collecte

La collecte des gousses a été effectuée au cours de la période Juillet-Août (1999) dans un espace de 3 hectares de façon à représenter la diversité du terrain prospecté et des plantes échantillonnées. Un seul lot de gousses a été choisi pour chaque site prospecté, sans distinguer les plantes qui étaient côte à côte de celles distantes, de même sans considérer les subdivisions des sites (ex: séparation par une route). On considère que le lot de graine de chaque site est représentatif du milieu d'origine.

Les populations de *M. truncatula* locales sont dénommées TN1, TN2 à TN10 (TN: pour signaler leur origine tunisienne).

III.1.2. Choix des sites de collecte

Des observations faites à des périodes différentes de l'année ont permis de définir le degré d'abondance des populations végétales en conditions naturelles et d'évaluer la contribution de la population dans la production du couvert végétal (Badri *et al.* 2003). Dix sites où poussent des populations de *M. truncatula* ont été retenus (Figure 5). Ils sont représentatifs de l'ensemble des étages bioclimatiques du territoire tunisien. Les sols de ces différentes localités ont été récoltés. Ils présentent des caractéristiques édaphiques variables à l'échelle physique et chimique (Tableau 5). La végétation d'accompagnement est notée, elle est diversifiée avec une présence de populations d'autres espèces de *Medicago* comme *M. polymorpha* et *M. laciniata*.

La vocation agricole des sols est variable: certains sont marginaux (Soliman, Enfidha et Deguache) et ne servent qu'au pâturage, d'autres sont des terrains sylvicoles (Jelma, Majel Bel Abbes et Amra), d'autres enfin sont situés à proximité de terres agricoles (El Kef, Rhayet, Bulla Regia et Thala).

III.1.3. Obtention des lignées

Pour chaque population, 10 à 16 gousses ont été choisies dans chacun des 10 sites prospectés, sur la base de leur taille, de la forme des épines et du sens d'enroulement, dans l'objectif de maximiser la diversité génétique présente tout en manipulant un petit nombre de plantes de chaque population. Pour chaque gousse, 1 graine a été sélectionnée, mise dans un pot individuel sur du terreau et cultivées dans une serre vitrée. On a procédé à un minimum de 2 cycles d'autofécondation successifs, permettant de diminuer le taux résiduel d'hétérozygotie

Figure 5 : Emplacement des sites de la collection tunisienne de *M. truncatula*.

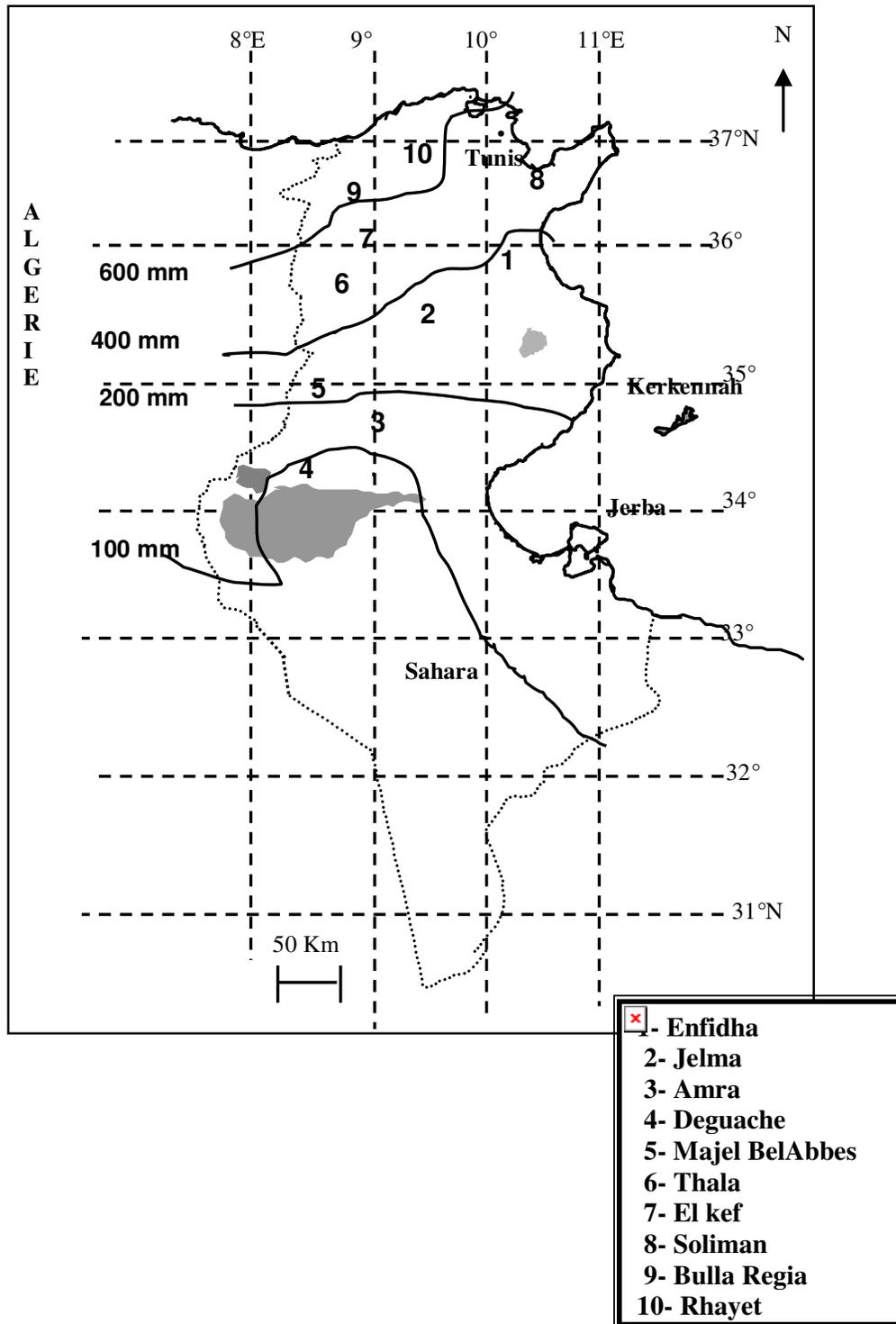


Tableau 5: Caractéristiques climatiques et pédologiques pour les sites de collecte des populations Tunisiennes de *M. truncatula*.

Pop	climat	texture	Altitude (m)	pH	Matière Organique (%)*	Salinité (g/l)*	Pluviométrie annuelle	Calcaire actif *	N Tot*	P ₂ O ₅ *	K ₂ O*
1	Semi aride <	Limono sableuse	2	7,60-7,98	0,51-1,50	8,65-27,6	300-400	18,9-5,0	0,77-1,6	28-49	110-542
2	Aride >	Limono sableuse	300	8,18-8,23	0,84-1,16	0,55-0,80	200-300	11,3-3,4	1,19-1,26	16-45	148-238
3	Aride <	Limono sableuse	400	8,28-8,32	0,59-0,65	0,50-0,45	100-200	5,7-5,6	0,63-0,76	16-37	213-173
4	Saharien >	Sablo limoneuse	25	7,99-8,36	0,17-0,27	4,95-14,00	<100	3,7-3,0	0,28-0,25	20-92	92-91
5	Aride >	Sablo limoneuse	500	8,40-8,49	0,37-0,41	0,45-0,45	200-300	1,9-2,5	0,49-0,46	11-13	116-112
6	Semi Aride >	Limono sableuse	800	8,10-8,29	0,19-2,50	0,65-0,55	300-400	16,2-14	2,73-1,54	36-72	166-128
7	Semi aride >	limoneuse	500	8,00-8,21	2,00-1,70	0,65-0,45	400-500	7,5-7,5	1,89-1,82	11-88	375-214
8	Semi aride >	Limon fin	2	8,10-8,26	1,69-1,50	4,40-2,70	500-700	11,9-8,1	1,37-1,82	10-59	339-319
9	Sub humide	limoneuse	200	7,83-8,10	0,23-2,20	0,95-0,55	500-700	11,2-7,7	3,35-2,38	96-110	837-339
10	Sub humide	Limon fin	400	7,56-8,00	1,70-2,60	0,80-1,00	500-700	6,7-7,7	1,70-2,31	23-23	190-191
normal					1,00-1,50	<1,5		2,1-5,0	1,00-1,20	25-50	100-200

* Pour le pH, la matière organique, la salinité, le calcaire actif (%), l’N total (%), P₂O₅ (assimilable en ppm) et K₂O (assimilable en ppm), La valeur de gauche correspond à une mesure de fin d’été et la valeur de droite à celle du printemps.

Pour **la salinité** l’ensemble des sols donne des valeurs proches pour les deux analyses, sauf ceux correspondants aux zones de sebkha. Les différences correspondraient à une différence réelle due à une différence de migration de sel au moment du prélèvement ou aussi à des prélèvements dans des endroits différents. Il est à signaler qu’il est bien établi que dans les sebkhas une grande variabilité de la salinité existe entre les endroits.

L’équivalent de salinité (g/l) avec la concentration en sel : 58.4 g/l = 1M, 0.06 g/l = 1 mM.

Données de pluviométrie fournies par l’Institut **National de Météorologie**, Tunis (Tunisie)

Analyses faite par le laboratoire d’analyse de Beni Khalled, CRDA, Nabeul (Tunisie)

et de disposer d'un matériel végétal homogène. On dispose donc dans cette collection d'un total de 136 lignées. La nomenclature de ces lignées indique le numéro de population signalant la région d'origine comme TN1 pour Enfidha (Figure 5) suivi par le numéro de la lignée, ex : TN1.11.

Huit lignées de *M. truncatula* ont été incorporées dans les expériences comme référence :

- La lignée Jemalong est la principale lignée de référence adoptée par les divers laboratoires travaillant sur *M. truncatula*.
- Deux lignées Algériennes: DZA45.5 et DZA315.16 (J.M. Prospéri, INRA Montpellier)
- Deux lignées Françaises: F83005.5 et F83005.9 (J.M. Prospéri, INRA Montpellier)
- Une lignée, A20, qui est à priori d'origine Marocaine
- Deux lignées d'origine inconnue: A48 et R108

III.2. Floraison

Deux expériences indépendantes ont été réalisées pour relever les dates de floraison des populations de *M. truncatula*. Pour chaque lignée, a été étudiée une seule plante. Ces cultures ont été réalisées dans des serres vitrées en Tunisie et en France, toutes les deux au mois d'octobre en deux années successives 2001 et 2002. Les germinations ont subi une vernalisation de deux semaines avant le semis.

III.5. Les marqueurs microsatellites

Le choix des marqueurs

Plusieurs critères ont guidé le choix des marqueurs, étant donné notre limitation par le nombre élevé de lignées :

- La répartition des marqueurs sur les 8 groupes de liaison de *M. truncatula*
- La localisation du marqueur dans une séquence exprimée ou non exprimée du génome
- La variation du motif répété du microsatellite: di et tri nucléotidique
- Le polymorphisme pour les lignées de référence
- La bonne résolution sur les gels d'Agarose

IV. Caractérisation morphologique de lignées de *M. truncatula*

IV.1. Les caractères relevés

Un ensemble de caractères morphologiques ont été notés tout au long du cycle végétatif des plantes (Tableau 6). Les caractères notés étaient déjà connus pour être polymorphes chez cette espèce d'après Lesins et Lesins (1979).

Les caractères connus pour être les plus variables portent sur la morphologie (marques foliaires (Figure 6), forme de la gousse), des caractères agronomiques (le port (Figure 7), la vigueur, la précocité, la production de semences, la tolérance aux maladies en conditions naturelles).

Les paramètres quantitatifs, Flor (en France), Ao, PfP et Gs sont montrés pour les dix populations dans le Tableau 7. Ces valeurs correspondent à la valeur moyenne calculée pour l'ensemble des lignées de la population.

IV.2. La floraison

Les populations se comportent différemment entre les deux environnements, ce qui peut être attribué à la différence de luminosité entre les deux conditions. Il est remarquable que la durée moyenne de mise à fleur soit beaucoup plus courte en France qu'en Tunisie. On remarque également que pour une population donnée, l'intervalle de floraison est plus étendu dans les conditions de culture en France par rapport à celle en Tunisie.

Dans les deux cas, on constate une variabilité inter populations pour les dates de floraison (Figure 8) ; variation plus marquée pour les conditions tunisiennes. On peut dégager que les populations du sud: Jelma, Amra, Deguache et M.B.Abbes sont plus précoces en moyenne, par rapport aux autres populations du nord. Et ceci, est probablement dû aux conditions environnementales du Sud qui ont sélectionnées des plantes ayant un cycle végétatif raccourci pour échapper aux périodes très dures de hausse rapide des températures et de sécheresse.

Tableau 6: Caractères morphologiques relevés pour la collection tunisienne de *M. truncatula*

<i>notation</i>	<i>Caractère</i>	<i>Valeurs</i>
AO	Longueur de l'axe orthotrope	Valeurs numériques en cm
AP	Axe principal allongé ou non	1 = non ; 2 = oui
CF	Niveau de crantage des feuilles	1 = faible ; 2 = moyen ; 3 = fort
FLOR	Age de floraison	Valeurs numériques en jours
FN	Niveau de floraison	Valeurs numériques
GE	Enroulement des gousses	1 = dextre ; 2 = senestre
GS	Nombre de tours de spires des gousses	Valeurs numériques
IF	Nombre de fleurs par inflorescence	Valeurs numériques
MF	Présence ou non de marques foliaires	1 = absents ; 2 = présents
PFP	Longueur du pédoncule floral par rapport au pétiole	Pourcentage
PP	Port de la plante	1 = compact ; 2 = érigé
RL	Niveaux de ramifications latérales	Valeurs numériques
VP	Vigueur de la plante	1 = faible ; 2 = forte

Figure 6 : Polymorphisme des feuilles (forme, couleur, tâches foliaires, et crantage) pour 4 populations tunisiennes de *M. truncatula* : Enfidha (vert), Jelma (rose), Amra (bleu), et Majel Bel Abbes (jaune).

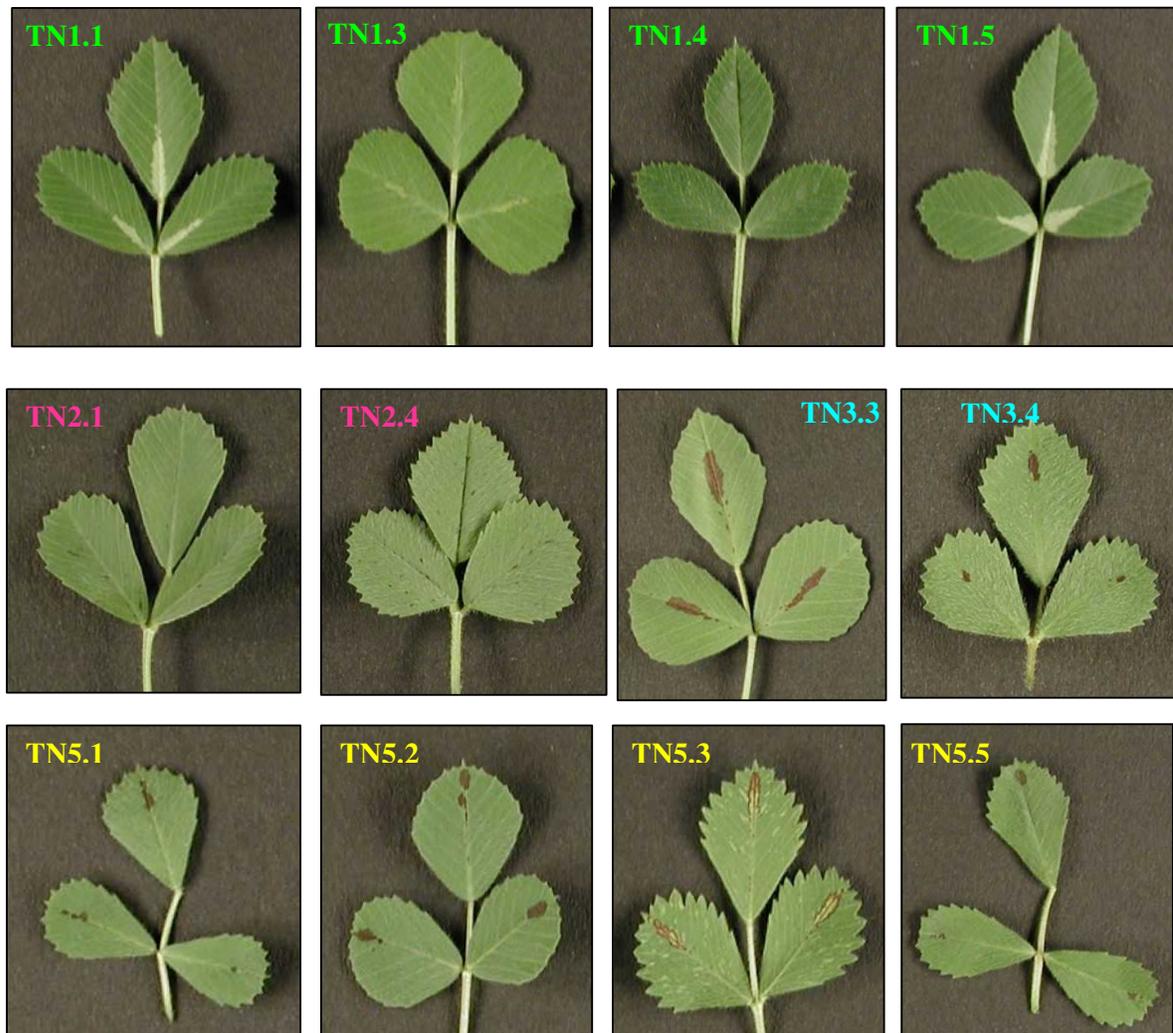


Figure 7 : Polymorphisme du port des plantes: érigé pour la majorité des populations (exemple Jelma) et rampant, caractéristique de la population de Thala.

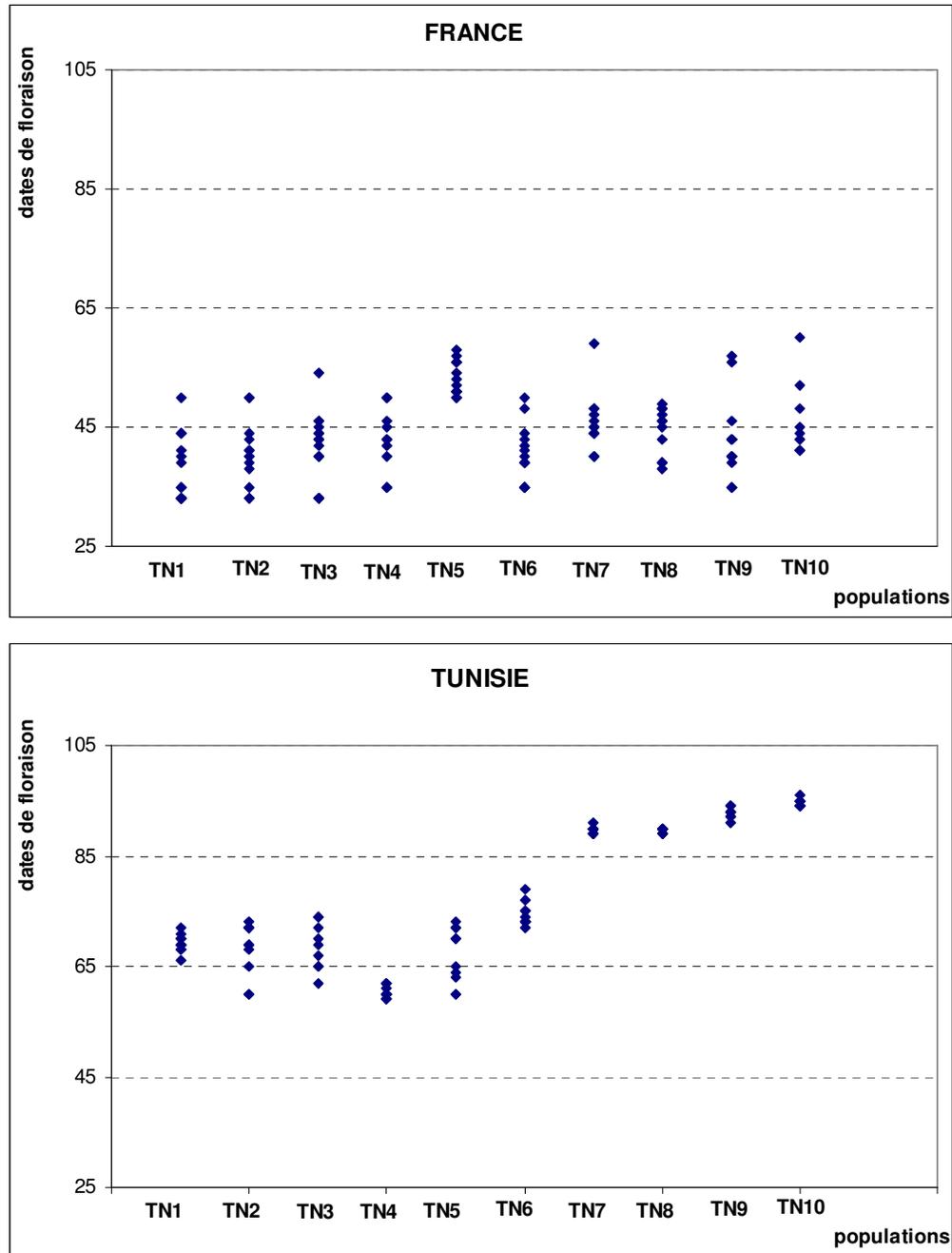


Tableau 7: Données quantitatives phénotypiques des dix populations de *M. truncatula* pour 4 caractères: floraison notée en France (*Flor*), longueur de l'axe orthotrope (*Ao*), longueur du pédoncule floral par rapport au pétiole (*PfP*) et le nombre de tours de spires des gousses (*Gs*).

Population	Flor		Ao		PfP		Gs	
	moyenne	E.type	moyenne	E.type	moyenne	E.type	moyenne	E.type
1	40,36	4,77	73,00	10,56	91,43	12,92	3,86	0,53
2	41,23	4,25	48,08	12,00	85,83	13,79	3,67	0,49
3	38,21	4,08	65,86	13,35	141,43	56,14	3,14	0,86
4	37,50	5,78	32,78	8,01	96,67	44,44	3,00	0,00
5	43,50	6,42	67,33	19,88	129,17	45,82	3,08	0,51
6	52,79	2,89	20,43	19,29	93,85	18,95	3,46	0,52
7	45,83	4,90	53,09	9,91	84,55	16,95	3,56	0,53
8	42,18	5,71	47,67	9,87	86,67	29,58	4,00	0,00
9	48,00	12,61	57,08	14,22	84,62	27,27	4,00	0,00
10	45,80	6,09	66,50	13,31	81,25	8,35	3,17	0,41

E.type : Ecart Type

Figure 8 : Date de floraison pour les 10 populations de *M. truncatula* en deux conditions environnementales différentes en France et en Tunisie.



IV.3. Effet des caractères relevés sur la diversité

Les données quantitatives relevées (Tableau 4) ont permis, pour l'ensemble des lignées et pour les populations correspondantes, de faire une analyse factorielle en composantes principales ACP. Cette analyse permet de décrire et représenter les ressemblances entre les lignées par rapport à l'ensemble des variables ainsi que d'établir des corrélations entre les variables.

L'ensemble des données morphologiques, a permis de ressortir 3 facteurs avec une variance cumulée de 52 %. Les deux facteurs principaux 1 et 2 contribuent respectivement à 25 et 14 % de l'inertie totale. Le poids factoriel permet d'attribuer les variables liées à chaque facteur (Figure 9). Le facteur 1 le plus important est affecté par le port de la plante et la présence d'un axe orthotrope (AP) et son allongement (AO). Le facteur 2 est déterminé majoritairement par le nombre de tours des spires. Ces facteurs constituent les facteurs majeurs différenciant les populations étudiées.

Le paramètre AO s'oppose à FLOR (Age de floraison) selon l'axe 1, expliquant que l'allongement de la tige orthotrope retarde la floraison des plantes. Le caractère GS (nombre de tours de spires des gousses) s'oppose à PFP (Longueur du pédoncule floral par rapport au pétiole) selon l'axe 2, mais on ne sait pas comment expliquer cette opposition.

IV.4. Groupement des populations

L'ACP (Figure 10) se basant sur les caractères morphologiques, montre un regroupement des populations autour d'un centre d'inertie qui dans notre cas est la population d'El Kef et de Rhayet. Ces deux populations sont les plus proches de l'origine des deux axes. Cela veut dire qu'elles ont les caractères les plus communs avec l'ensemble des populations.

Les populations de M.B.Abbes et Amra forment un groupe qui se caractérise par un allongement orthotrope, un crantage fort des feuilles et un petit nombre de tours de spires.

La lignée TN5.13 de M.B.Abbes se distingue des autres individus de la population selon l'axe 1, axe fortement influencé par le paramètre PFP. En effet ce caractère est, selon Lesins et Lesins (1979), déterminant dans la différenciation entre espèces de *Medicago*. Il est donc probable que cet individu appartienne à une espèce autre que *M. truncatula*.

Les populations de Soliman et Enfidha forment un groupe qui s'oppose à Majel Bel Abbes et Amra par l'axe 2, montrant que les différences sont dus au nombre de tours de spires. Ainsi les deux populations Soliman et Enfidha forment des gousses de taille importante avec un maximum de graines.

Figure 9 : Poids factoriel: Influence des caractères morphologiques (voir notations au tableau I.1) sur les deux facteurs principaux de l'ACP, Fact1 et 2.

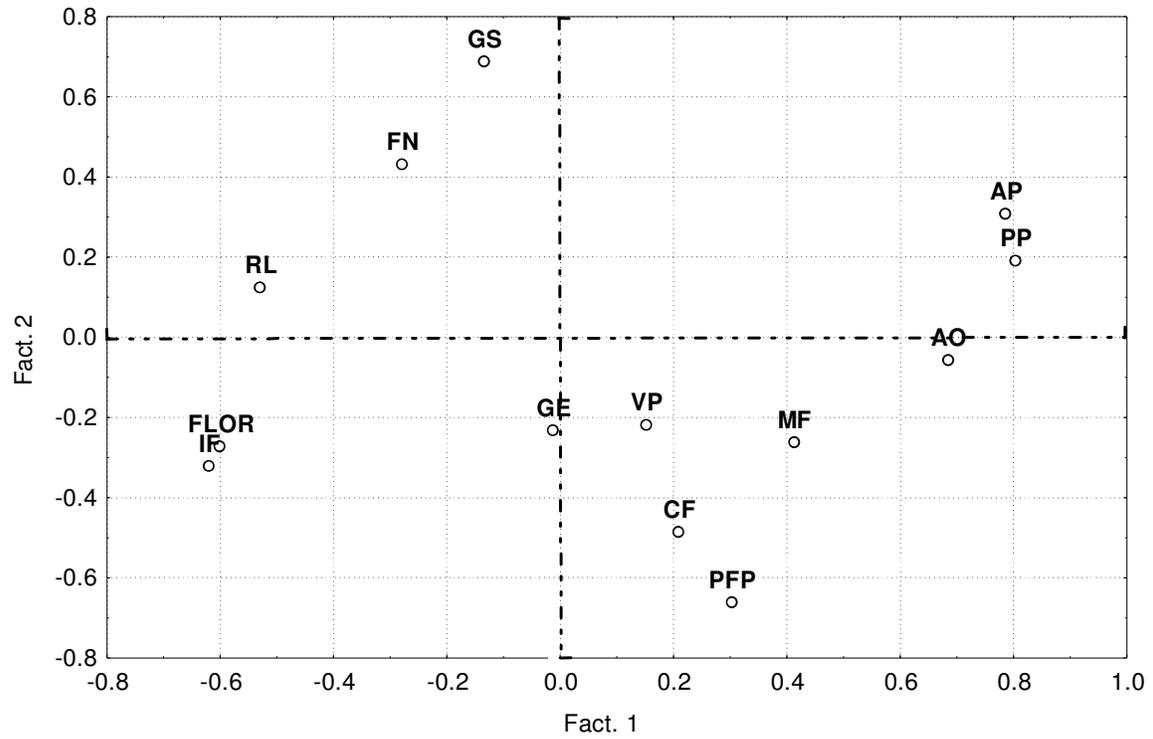
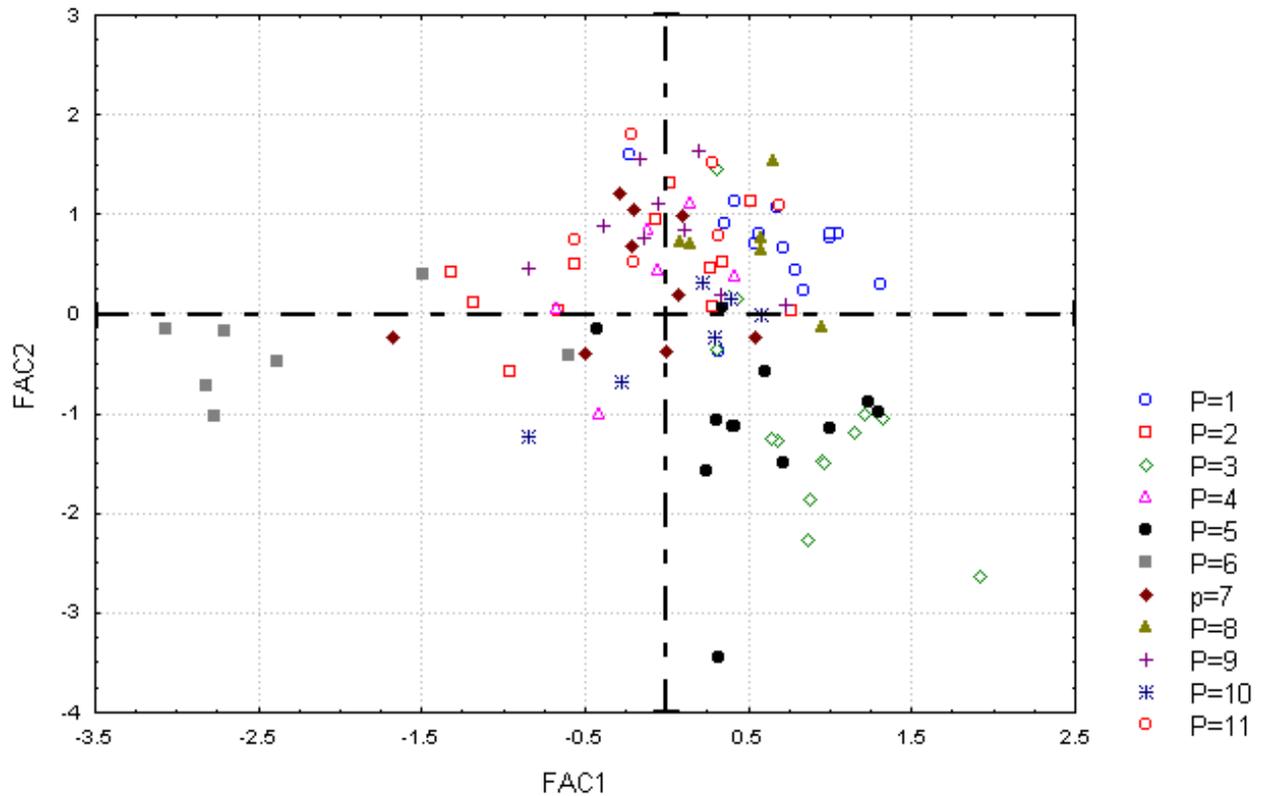


Figure 10 : Répartition des populations tunisiennes de *M. truncatula* sur le plan bidimensionnel de l'analyse en composantes principales (ACP).



Les chiffres représentent des lignées des populations correspondantes (voir Figure 1). La projection correspondante aux différentes populations est représentée par les TN suivis par les numéros des populations. Les lignées de références sont aussi représentées.

Légende :

P = abréviation de population

1= Enfidha, 2= Jelma, 3= Amra, 4= Deguache, 5= Majel Bel Abbas, 6= Thala, 7= El Kef, 8= Soliman, 9= Bulla Regia, 10= Rhayet, 11= Lignées de référence.

Les lignées des populations Jelma, Deguache, El Kef, Rhayet et Bulla Regia chevauchent entre elles. Elles ne se différencient pas selon l'axe 1, et très peu par l'axe 2.

Les lignées de référence:

Selon les caractères morphologiques, 7 lignées de référence ont été étudiées: Jemalong, DZA315.16, F83005.5, F83005.9, A20, A48 et R108. Elles se positionnent toutes selon l'ACP (Figure 10) avec les populations du Nord. Ces lignées ne semblent pas avoir les caractéristiques morphologiques des populations se trouvant au sud de la dorsale Tunisienne. Dans l'annexe 4, on montre les différentes valeurs des caractères morphologiques relevés pour ces lignées. Les deux lignées Françaises, F83005.5, F83005.9 semblent similaires. Même pour la floraison, il n'existe qu'un décalage de 5 jours entre les deux. La même constatation est valable aussi pour les deux lignées A48 et R108.

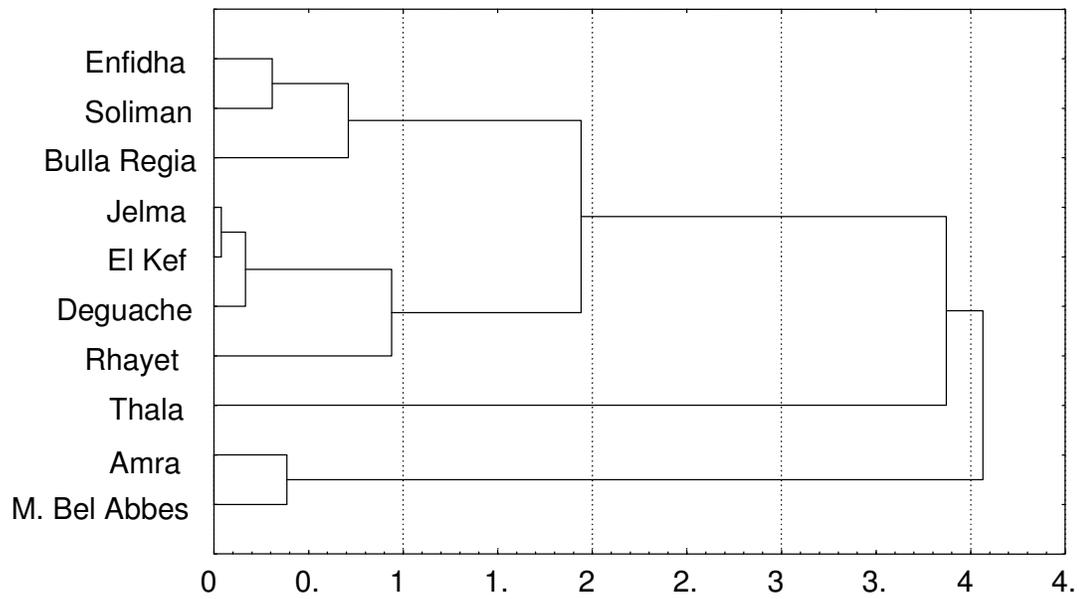
La lignée A20 a la caractéristique d'être précoce pour la floraison et d'avoir l'axe orthotrope (AO) le plus développé.

La lignée Algérienne DZA315.16 est remarquable par son bas niveau de ramifications latérales (RI). En effet, elle commence à étendre ses tiges latéralement allonger son axe orthotrope par la suite.

La population de Thala est très fortement distinguée par l'axe 1, vu son port de plante plagiotrope la différenciant fortement des autres populations. Sachant que cette population se trouve la plus haute en altitude (600 m), ceci pourrait être l'explication de l'inhibition de la croissance orthotrope des plantes.

A partir des données morphologiques, on a réalisé un arbre phylogénétique basé sur les distances Euclidiennes et représenté par une distance d'agrégation (Figure 11). Cette représentation permet de distinguer des groupes de populations. A une distance d'agrégation égale à 1, on distingue trois paires de populations formant 3 groupes Enfidha / Jelma, El Kef / Bulla Regia, et Amra / Majel Bel Abbas. Le reste des populations sont représenté individuellement. Les populations de Thala et Deguache se distinguent fortement des autres. Cette différenciation entre les populations selon les caractères morphologiques pourrait être expliquée par les conditions environnementales correspondantes aux sites d'origine. En effet ce regroupement de populations correspond à des sites voisins, et celles individualisés correspondent à Thala la population la plus éloignée à l'ouest et Deguache la plus au sud.

Figure 11 : Distances d'agrégation (méthode de Ward) entre les populations naturelles de *M. truncatula* basées sur les distances euclidiennes pour les caractères morphologiques.



IV.5. Corrélations entre caractères morphologiques

On a comparé les différentes paires de caractères morphologiques en faisant une matrice de corrélation (Tableau 8). Une corrélation positive entre le nombre de tours de spires et le port des plantes, montrant que les plantes ayant un développement plagiotrope forment des gousses avec un nombre faible de tours de spires. De même une corrélation positive entre les dates de floraison et le nombre de tours de spires révèle que les plantes ayant une floraison tardive forment des gousses avec plus de tours de spires.

IV.6. Corrélations morphologie / environnement

Les sites de la collecte appartiennent à différentes conditions écologiques. L'ensemble des paramètres physico-chimiques (Tableau 5), a été inclus pour une analyse globale permettant de classer les sites étudiés. Une ACP (Figure 10) a permis de dégager deux grands groupes de populations selon le facteur 1 (représentant 44,6% de l'inertie totale). Les populations du Nord forment un groupe et celles du sud (Jelma, Majel Bel Abbes, Deguache et Amra) un autre groupe.

Ce facteur 1 est majoritairement établi (Tableau 9) à partir de la pluviométrie, la teneur en matière organique et en azote total. Ceci est alors lié à une bonne fertilité des sols. En effet, une corrélation entre les différents paramètres physico-chimiques (Tableau 10) a dégagé une interdépendance entre ces 3 paramètres dont dépend le groupement des populations.

Les données morphologiques ont été comparées aux valeurs d'altitude, salinité et pluviométrie correspondantes aux sites d'origine des populations de *M. truncatula* (Tableau 11). A partir de ces résultats on a pu faire plusieurs constatations sur la relation existant entre la morphologie de *M. truncatula* et les conditions environnementales. L'augmentation de l'altitude, ayant une tendance à réduire l'axe orthotrope et à retarder la floraison de la plante.

Ce facteur contribue à la précocité de floraison et la diminution du nombre de fleurs produites par la plante. Le cycle végétatif est alors raccourci, en fonction du degré de salinité des sols. En effet la salinité des sols, même dans les sebkhas, est très variable en fonction de la saison. Cette variabilité est liée directement à l'abondance de la pluie qui permet la dilution de la quantité de sel dans le sol.

Il ressort de ces résultats que la présence des taches foliaires est négativement corrélée avec la pluviométrie, montrant que dans les régions sèches, les plantes présentent des marques foliaires de couleur blanche et rouge. Autrement dit, l'abondance de tâches foliaires reflète un environnement bien ensoleillé.

Tableau 8 : Coefficients de corrélation entre les différents caractères morphologiques.

	PP	VP	MF	CF	AP	RL	FLOR	IF	FN	GS	GE	PFP	AO
PP	1.00	0.08	0.19	0.10	0,54**	-0.50	-0.32**	-0.33**	-0.04	-0.13	-0.08	-0.02	0.57**
VP		1.00	-0.06	0.09	-0.03	-0.30	0.06	-0.20*	-0.19	-0.04	0.03	0.09	0.01
MF			1.00	0.25**	0.09	-0.10	-0.02	-0.19	-0.26**	-0.25**	-0.12	0.20	0.31**
CF				1.00	0.11	0.01	0.09	0.06	-0.10	-0.2077*	0.01	0.31**	0.11
AP					1.00	-0.18	-0.41**	-0.45**	0.02	0.01	-0.05	0.09	0.62**
RL						1.00	0.12	0.29**	0.22*	0.24*	-0.00	-0.03	-0.33**
FLOR							1.00	0.42**	0.18	0.11	0.12	-0.17	-0.26**
IF								1.00	0.13	-0.10	0.09	-0.03	-0.30*
FN									1.00	0.18	0.01	-0.28	-0.11
GS										1.00	0.01	-0.31**	-0.12
GE											1.00	0.21*	0.00
PFP												1.00	0.38**
AO													1.00

Tableau 9 : Poids factoriel des différents caractères physico-chimiques des sols.

	Facteur 1	Facteur 2
Altitude	0.01	0.88*
pH	-0.68	0.52
M_organique	0.81*	0.23
Salinité	-0.10	-0.92*
Pluviométrie	0.91*	0.08
Calcaire	0.68	-0.05
N_total	0.95*	0.23
P2O5	0.31	0.02
K2O	0.77*	-0.26

* $P \leq 0.05$

Tableau 10: Corrélations entre les paramètres climatiques et pédologiques des sols d'origine des populations naturelles de *M. truncatula*

	Altitude	pH	M_organique	Salinité	Pluviométrie	Calcaire	N_total	P2O5	K2O
Altitude	1	0.33	0.20	-0.65*	-0.03	0.15	0.22	0.01	-0.34
pH		1	-0.57	-0.46	-0.54	-0.44	-0.52	0.01	-0.46
M_organique			1	-0.27	0.84**	0.49	0.75**	-0.15	0.35
Salinité				1	-0.22	0.18	-0.32	-0.1	0.04
Pluviométrie					1	0.46	0.83**	0.19	0.67*
Calcaire						1	0.65*	0.07	0.38
N_total							1	0.43	0.71*
P2O5								1	0.58
K2O									1

P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01

Tableau 11: Coefficients de corrélation entre les données morphologiques et les données environnementales : altitude, salinité et pluviométrie.

	Altitude	Salinité	Pluviométrie
PP	-0.49**	0.15	-0.04
VP	-0.14	0.10	0.05
MF	0.07	0.00	-0.27**
CF	0.17	-0.21*	-0.27**
AP	-0.37**	0.20*	0.05
RL	0.27**	-0.08	-0.19
FLOR	0.48**	-0.25**	0.35**
IF	0.55**	-0.51**	-0.04
FN	0.01	0.03	0.19
GS	-0.21*	0.22*	0.37**
GE	0.27	-0.18	-0.06
PFP	0.21*	-0.19	-0.31**
AO	-0.26**	0.19	0.06

* P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01

V. Diversité génétique des lignées de *M. truncatula* révélée par microsatellites

V.1. Introduction à l'article

L'article présenté dans cette partie décrit la diversité génétique d'une collection de 136 lignées de *M. truncatula* provenant de la collection tunisienne de l'INRST (Institut National de la Recherche Technique et Technologique, Hammam Lif, Tunisie) en utilisant un set de 18 microsatellites (ou SSR). Ces marqueurs ont été choisis car ils sont répartis sur les 8 groupes de liaison et représentent des portions exprimées et non exprimés du génome. On a essayé dans cet article de répondre à de multiples questions concernant la structure de la diversité dans ces populations et les corrélations qui peuvent exister avec l'environnement d'origine.

Questions à la base de l'article:

Est ce que les marqueurs microsatellites utilisés permettent de mettre en évidence une diversité génétique intra et inter populations?

Est ce que les populations tunisiennes de *M. truncatula* présentent une structuration spatiale?

Y a-t-il une corrélation entre la diversité génétique et les conditions éco-géographiques des sites?

V.2. Article

The use of neutral and non-neutral SSRs to analyse the genetic structure of a Tunisian collection of *Medicago truncatula* lines and to reveal associations with eco-environmental variables

F. Lazrek · V. Roussel · J. Ronfort · G. Cardinet ·
F. Chardon · M. E. Aouani · T. Huguet

Received: 16 November 2007 / Accepted: 11 June 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract In this study, we investigated the genetic diversity of a collection of 136 *Medicago truncatula* lines from 10 Tunisian natural populations collected in well-defined locations and in various ecological conditions of soil, salinity and water availability. The genetic diversity was evaluated using a set of 18 microsatellites (SSRs), representing the 8 chromosomes of *M. truncatula*. A neutrality test showed that 7 SSRs were non-neutral with

evidence of balancing selection. The 11 neutral SSRs revealed a geographical pooling with the Tunisian Dorsale axis restricting migration of alleles. The 7 non-neutral alleles demonstrate a correlation with rainfall, altitude and salinity environmental variables suggesting that these SSRs are linked to genes involved in water use efficiency, resistance to salinity or adaptation to altitude, and that there is local adaptation of *M. truncatula* to these variables. This demonstrates that the choice of so-called neutral markers should be carefully evaluated in population genetic studies. This study illustrates the genetic diversity occurring in natural Tunisian populations of *M. truncatula* and describes the first collection of this species dedicated to natural variation involved in adaptation to the environment.

F. Lazrek and V. Roussel contributed equally to this work.

F. Lazrek · G. Cardinet · F. Chardon · T. Huguet
Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM),
CNRS-INRA, BP27, 31326 Castanet Tolosan Cedex, France

F. Lazrek · M. E. Aouani
Laboratoire Interactions Légumineuses Microorganismes,
Centre de Biotechnologie de Borj-Cedria, BP901, 2050
Hammam-Lif, Tunisia

V. Roussel · T. Huguet (✉)
Laboratoire Symbioses et Pathologies des Plantes (SP2),
INP-ENSAT, BP32607, 31326 Castanet Tolosan Cedex, France
e-mail: thierry.huguet@ensat.fr

J. Ronfort
UMR Diversité et Génomes des Plantes Cultivées. Station de
Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA, Domaine de
Melgueil, 34130 Mauguio, France

Present Address:
G. Cardinet
UREF – INRA Bordeaux (Unité de Recherche sur les Espèces
Fruitières), BP 81, 71 Avenue Edouard Bourlaux,
33883 Villenave d'Ornon, France

Present Address:
F. Chardon
Unité de la Nutrition Azotée des Plantes, INRA,
Route de St Cyr, 78026 Versailles, France

Keywords Biodiversity · Genetics · *Medicago truncatula* · Collections · Genotypes · Neutral SSRs · Nonneutral SSRs · Natural populations

Introduction

Due to their high protein content, legumes contribute significantly to human and animal diets. In addition, legumes have the unique capacity to fix atmospheric nitrogen and improve soil fertility in symbiosis with soil bacteria collectively known as “rhizobia”; consequently they do not need costly and polluting chemical nitrogen fertilizers (Drinkwater et al. 1998).

In the Mediterranean basin, native legumes play a central role in the enhancement of natural spaces since they can be fed to animals while simultaneously protecting the soil, stabilizing dunes and representing a source of medicinal products. However, climatic variability, e.g. erratic rainfalls, drought and unseasonable cold weather,

together with soil degradation and desertification, are severe limitations for agriculture. There is a clear need to develop new management strategies, technological innovation (e.g. irrigation) and genetic enhancement of varieties adapted to climatic constraints.

In North Africa, most of the forage from rangelands is of poor quality. These rangelands represent a considerable percentage of total soil surfaces, for instance, they comprise 30% in Tunisia. These soils are highly degraded and are mainly located in semi-arid and arid regions. The *Medicago* genus comprises forage species of good quality and is ubiquitous in the Mediterranean basin. One of these species, *M. truncatula* is widely used as a model plant for legume genetics and genomics (May and Dixon 2004), by virtue of being an annual, diploid and autogamous legume with a moderate genome size (~500 MB/1C). *M. truncatula* is found in a variety of edaphic and bioclimatic conditions in Tunisia, suggesting that genotypes adapted to local biotic and abiotic stresses could be identified in natural populations and integrated into breeding programs.

In order to identify these genotypes, a basic knowledge of the extent of the variation present in natural populations is necessary. Molecular markers, such as microsatellite markers, hereby referred to as SSRs (Simple Sequence Repeats), are highly polymorphic, abundant and randomly distributed in the genome making them markers of choice for diversity analyses, genetic mapping and association studies (Roder et al. 1998, Donini et al. 2000, Gao et al. 2003, Roussel et al. 2004). These SSRs are expected to be neutral, that is not linked to genes involved in adaptation to environmental variation.

The genetic diversity of *M. truncatula* has already been characterized using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) molecular markers. Bonnin et al. (2001), comparing RAPD and SSRs markers, concluded that SSRs revealed a higher diversity level in populations of *M. truncatula*. SSRs show a very high degree of polymorphism in plants and are routinely used for genetic diversity studies in cereals as well as in *A. thaliana*. Diwan et al. (1997) and Baquerizo-Audiot et al. (2001) first reported the development of a small number of SSRs in, respectively, *M. sativa* and *M. truncatula* for genetic mapping and genetic resources analyses. They showed that SSRs markers can cross-amplify within the *Medicago* genus. More recently, large numbers of *M. truncatula* ESTs (Expressed Sequence Tags) and genome sequencing data has provided access to a non-limiting source of SSRs. Using a set of 616 SSRs, Eujayl et al. (2004) demonstrated that SSR markers developed from *M. truncatula* ESTs are valuable genetic markers across the *Medicago* genus. Recently, Ellwood et al. (2006) and Ronfort et al. (2006) used a set of microsatellite markers to survey the genetic diversity of *M. truncatula* accessions collected from various regions of the Mediterranean basin.

In this study, we use 18 SSR markers to evaluate the molecular variability in a Tunisian collection of 136 *M. truncatula* lines from 10 natural populations representing most of the edaphic and bioclimatic conditions of Tunisia. This collection is unique since it is the first thoroughly characterized collection of *M. truncatula* where each location corresponds to a well-defined eco-geographical niche. A neutrality test showed that about 40% of the SSRs were non-neutral. The 11 neutral markers were used to study patterns of gene flow in the 10 populations, and we detected population structure linked to the presence of the Tunisian Dorsale which creates different environmental conditions: humid in the north of this barrier and dry in the south, high altitude when the populations are located in the Dorsale and low altitude for the other populations. Furthermore, the 7 non-neutral markers were used to show how genetic diversity is correlated with environmental and/or geographic variables on both sides of the Tunisian Dorsale.

Materials and methods

Description of the Tunisian collection

The *Medicago truncatula* collection (Laboratoire Interactions Légumineuses Microorganismes, Centre de Biotechnologie, Technopole de Borj-Cédria, B.P. 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisia) originate from pods collected from 10 sites representative of the Tunisian diversity in eco-geographical profiles (Fig. 1). The major characteristics (altitude, salinity, annual rainfall) of each site are detailed in Table 1. These sites cover several bioclimatic areas from Saharan to sub-humid. Three sites are saline: the Enfidha and Soliman sites are coastal salty fields (sebkhas) while the Deguache site is localized around the largest Chott in Tunisia: Chott El Jerid which covers approximately 5,000 km². A Chott is a lake which stays dry through the hot season, but holds water in the winter. Moreover, rainfall in the Deguache site is very low (~50 mm). Within each site, 30–100 *M. truncatula* pods were randomly collected in a radius of 500 m in 1999. Of these, ten to sixteen pods were chosen per site based on pod shape, number of turns, back bones, size, and coiling. A single seed per pod was used to produce the collection of *M. truncatula* lines; each plant was then selfed twice in order to lower residual heterozygosity. Plants were grown and multiplied in a greenhouse.

SSRs genotyping

A total of 18 SSRs were used for this study. As shown in Table 2, 11 SSRs were identified in EST databases, 3 from BAC (Bacterial Artificial Chromosome) genomic sequences, and 4 from a microsatellite-enriched genomic library.

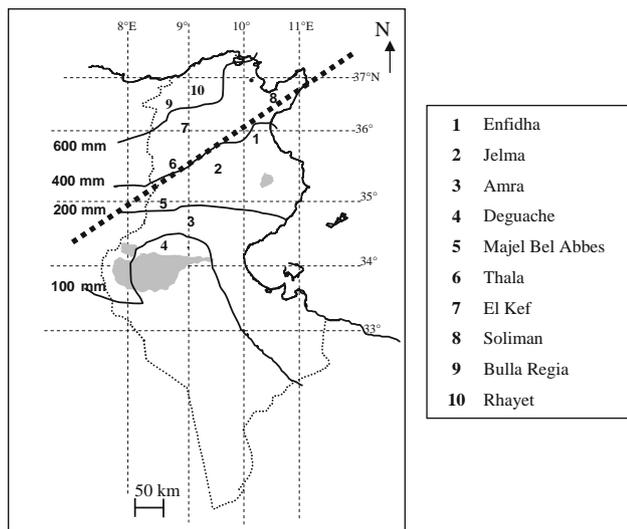


Fig. 1 Geographic location of the 10 populations of *M. truncatula* collected in Tunisia. The dashed line shows the location of the Tunisian Dorsale mountain range

Table 1 Bioclimatic characteristics of the collection sites of *M. truncatula* populations in Tunisia

Population	Altitude (m)	Salinity ^a (g/l)	Annual rainfall ^b (mm)
1 Enfidha	2	8.65	350
2 Jelma	300	0.55	250
3 Amra	400	0.50	150
4 Deguache	25	4.95	50
5 Majel Bel Abbas	500	0.45	250
6 Thala	800	0.65	350
7 El Kef	500	0.65	450
8 Soliman	2	4.40	600
9 Bulla Regia	200	0.95	600
10 Rhayet	400	0.80	600

^a Soil salinity was measured by «Laboratoire d'analyse de Beni Khaled», CRDA, Nabeul (Tunisia)

^b Annual rainfall data are from «Institut National de Météorologie», Tunis (Tunisia)

These SSRs represent a variety of microsatellite motifs, including di- and tri- repeats and are dispersed on the 8 linkage groups of *M. truncatula* with at least 2 per chromosome and one on each chromosome arm. Indeed, the choice of the markers was based on two genetic maps of *M. truncatula*, one based on a F2 population and the other a RIL population comprising more than 600 mainly SSR markers (T.Huguet, unpublished results).

Total genomic DNA was extracted from leaf tissue dried overnight at 65°C, according to the protocol described by Gherardi et al. (1998). PCR (Polymerase Chain Reaction) reaction mixtures contained 1X Taq polymerase buffer,

4 µl of dNTPs (1.25 mM each), 0.65 µl of MgCl₂ (1.5 mM), 50 ng of each primer, 25 ng of genomic DNA, and 1.25 unit of Taq polymerase (Q-BIOgene) in a final volume of 25 µl.

Amplification was carried out in a thermocycler (Eppendorf Mastercycler) with the following program: 4 min denaturation at 94°C, followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 30 s annealing at 55°C (except 50°C for MTIC 297 and MTIC 564) and 30 s extension at 72°C, and an additional last step of 6 min extension at 72°C. The amplification products were run on a 3.5% agarose gel in 0.5 × TBE buffer (45 mmol/l Tris, 45 mmol/l Boric Acid, 0.02 mmol/l EDTA pH8), stained with Ethidium Bromide, and visualized by illumination with ultraviolet light. A 1 Kb ladder (GIBCO-BRL) was used as size standard. Microsatellite allele sizes were measured on 4% non-denaturing polyacrylamide gels according to Brunel et al. (1999).

Information concerning the number of repeats of each SSR (Table 2) was obtained for the Jemalong reference line from the gene-space sequencing program of *M. truncatula* (Young et al. 2005; <http://www.medicago.org/genome>).

Population-genetic analyses

An Ewens-Watterson test on allele frequency distribution to detect deviations from a neutral equilibrium model was performed for each SSR using ARLEQUIN (Schneider et al. 2000). The probability of neutrality for each SSR was assessed using both the homozygosity test-statistic by Watterson (1977) and the exact test by Slatkin (1994, 1996). The null hypothesis corresponds to a neutral allele distribution, and is rejected if the test probability is $< \alpha/2$ or $> 1-\alpha/2$ (with α : significance level, here set to 0.05).

Other statistical analyses were conducted using the software Genetix version 4.04 (Belkhir et al. 1999). For each locus and each population, the genetic diversity was measured through the number of allele per locus (A), the percentage of polymorphic loci (P), the observed heterozygosity (H_O) and Nei's gene diversity index H_E which summarizes the level of diversity using both the number of alleles and allele frequencies. For each population, the number of multilocus genotypes obtained combining the genotypes observed for the neutral and non-neutral SSR loci was also computed. Linkage disequilibrium among loci was estimated within each population and for each pair of loci and tested using random permutations of monolocus genotypes among individuals within populations. The effect of the marker's origin was investigated by comparing the mean number of alleles for each pair of loci and mean gene diversity, between SSRs identified in EST databases and those obtained through SSR-enriched genomic library.

Table 2 Molecular and genetic informations about the 18 microsatellite loci used to analyse genetic diversity

SSR	LG	Origin	Motif	Primer sequences (5'-3')	An	H_E	Reference
MTIC563	1	C	[CAA]8	AATTCCTTCGGCATCAACAC TGCCGAAATTGTTAGTTTGG	2	0.16	This work
MTIC640	1	A	[GA]16	GGCCCAACCACAATTTTC CATAACTTCCAATAACTGCCA	6	0.42	Santoni (personal communication)
MTIC564	2	C	[GA]13	GCCGATGGTACTAATGTAGG AAATCTTGCTTGCTTCTCAG	10	0.48	Julier et al. (2003)
MTIC67	2	B	[AT]12	AGCAGCAAGAAGCACAAGGT CAATGTGCGTGCATTGTGTA	7	0.28	This work
MTIC128	3	B	[AC]9	GAGGTGGTCCTTCTTTGTCG GGGTTCACTGTTTCAGGGTTG	3	0.26	This work
MTIC535	3	B	[GGA]6	TTGGGAGGAGGGACTGAATA TCCCAAACCAGGTTCTTCAT	5	0.35	This work
MTIC559	4	B	[TTC]8	GGGTTTTTGATCCAGATCTT AGGTGGTCATACGAGCTC	6	0.33	Thoquet et al. (2002)
MTIC297	4	B	[TAC]5	CTAAGCTTTGGCCATGTATC TGAAATGAGTTTACTGAGG	7	0.51	This work
MTIC511	5	C	[TTG]11	ATAAACTCCCCGCAACCATC GCCTGGTGGAACTGAACCTA	3	0.25	Ane et al. (2002)
MTIC307	5	B	[TTG]6	ACTGCTAAGGCTGACTGATG GCAGTCATGTCCAATTCTCT	2	0.05	This work
MTIC268	6	B	[CAT]9	GAGGATTCATTCTTCTTCCA ATTGTTCCCTAGGTTGGGTTT	2	0.13	This work
MTIC243	6	B	[TGG]6	GGAGGAGGTTATAGGTTTGG TCAGTGCTCAGCATCTATGT	2	0.13	This work
MTIC126	6	B	[AC]8	CCCAGTTGCAGACTCTCTCA GAAGGGTTTACCGGAGGAAG	2	0.05	This work
MTIC503	7	A	[CT]16 [CA]7	CAATCACTGGAAGCAAGGT AGCCTGCTCATTGTATTGC	4	0.47	Santoni (personal communication)
MTIC1172	7	A	[TC]11, [AC]8	CCAACACAGTCACCTAACCAA GTTTCTCCATTGTTTCGTAGG	5	0.38	Baquerizo-Audiot et al. (2001)
MTIC770	7	A	[TC]9	ACTGTTCCGTCCTTTCATC TGAGTTCTTGTTTCTTGTTA	4	0.55	Baquerizo-Audiot et al. (2001)
MTIC80	8	B	[TC]8 + 12	TGTACATTTCAACAGACAAAGCA GCCAAGACTGTGTTTGGTTTC	4	0.48	This work
MTIC308	8	B	[TTC]6	CGAATGAGAGCAACCATTTA AATCCTGAATACCTCCGAGT	2	0.21	This work

LG: Linkage group; An: Number of alleles observed in the whole sample; Primer sequences (first line: left primer, second line: right primer), H_E : Mean Nei's Gene diversity (averaged over populations)

Origin: (A) genomic library, (B) EST, (C) BAC sequence

Correlations between pairwise genetic distances and pairwise geographic distances were analyzed through Mantel tests using Genetix version 4.04 (Belkhir et al. 1999). In order to detect population differentiation, we performed analysis of molecular variance (AMOVA), i.e. hierarchical analyses of variance separating the genetic diversity among populations and among individuals within populations. These analyses were performed using Arlequin version 2.000 (Schneider et al. 2000). Finally, in order

to examine the population structure, Nei's genetic distance was calculated for each possible pairs of populations for the whole set of SSRs, and the matrix obtained was used to perform cluster analysis using a UPGMA algorithm. A dendrogram was obtained using both PHYLIP 3.66 (Felsenstein 1989) and TREEVIEW (Page 1996).

Cluster analysis of populations was conducted using TESS software (François et al. 2006; Chen 2006). Runs were based on a burn-in period of 10,000 followed by

10,000 iterations. Five replicates were performed for K -values comprised between 1 and 10 (K = number of clusters) and all runs used the admixture model. Four values of spatial dependence parameter were considered (0, 0.5, 0.7 and 1).

A Factorial Correspondence Analysis (FCA) was used to visualize the genetic structure of the non-neutral SSRs set by projecting individuals into multidimensional space on the basis of allelic information, with each allele analyzed as an independent variable. FCA was performed using Genetix software (Belkhir et al. 1999).

The software GESTE (Foll and Gaggiotti 2006) was used to identify the environmental factors that determine the genetic structure of populations for non-neutral SSRs. This software calculates the posterior probabilities of models including environmental effects.

Results

SSR analysis and neutrality tests

All the 18 SSR markers were polymorphic, with the number of alleles per locus ranging from 2 to 10 (Table 2) and an average of 4.22 alleles per locus. The mean gene diversity (averaged over populations) was highly variable among loci, ranging from 0.05 to 0.55 (Table 2). Variation between loci for both the number of alleles and the mean

gene diversity were not clearly related to either the origin of the microsatellite loci, nor its repeat motif (Table 2). In order to evaluate the effect of the repeat motif, the mean number of alleles and the mean gene diversity (averaged over populations) were compared between di and tri-nucleotide SSR loci using a Mann-Whitney's U -test. We found a slight but not significant positive correlation between the mean gene diversity and the number of repeats composing the SSR marker ($r = 0.454$, $P > 0.05$, data not shown). This correlation was clearer for di-nucleotidic loci but still not significant ($r = 0.498$, $P > 0.05$, data not shown).

The results of the Ewens-Watterson two-tailed test for the 18 SSR are presented in Table 3 with a α -value of 0.05. The Ewens-Watterson neutrality test is based on the observed frequency spectrum of alleles in a population. The test statistic is the homozygosity under the observed versus the theoretical frequency spectra: if these values are significantly different, the neutral hypothesis is rejected. For small observed values (<0.025), the non-neutrality is due to a balancing selection, i.e. there are more intermediate frequency alleles present than expected, and higher observed values imply purifying selection, i.e. there are fewer intermediate frequency alleles than expected under neutral evolution. The Slatkin test gives the probability of being in neutral configuration. For significant and low P -values, balancing selection is involved in the non-neutral distribution. The results suggest that 7 of the 18 SSRs are

Table 3 Ewens-Watterson test of allele frequency distribution

SSR	Observed F -value	Expected F -value	Watterson F , P -value	Slatkin's exact P -value
<i>Non-neutral SSRs</i>				
MTIC503	0.171	0.436	0.000	0.000
MTIC511	0.201	0.487	0.001	0.001
MTIC297	0.258	0.547	0.008	0.004
MTIC564	0.311	0.622	0.014	0.009
MTIC535	0.315	0.622	0.017	0.012
MTIC559	0.324	0.622	0.023	0.012
MTIC770	0.366	0.717	0.016	0.016
<i>Neutral SSRs</i>				
MTIC243	0.171	0.328	0.056	0.018
MTIC126	0.301	0.441	0.193	0.030
MTIC640	0.276	0.492	0.061	0.035
MTIC268	0.596	0.836	0.156	0.156
MTIC128	0.608	0.837	0.165	0.165
MTIC308	0.645	0.837	0.201	0.201
MTIC80	0.646	0.835	0.204	0.204
MTIC1172	0.687	0.836	0.233	0.233
MTIC67	0.446	0.545	0.348	0.237
MTIC307	0.827	0.838	0.369	0.369
MTIC563	0.497	0.717	0.158	0.519

SSRs are ranked according to their probability of being neutral from lower to higher probability

under balancing selection (Table 3), and 11 SSRs can be considered neutral. No correlation could be found between the neutrality of SSRs and either their chromosomal location or their genomic origin.

Consequently, we treated neutral and non-neutral SSRs separately; the 11 neutral SSRs give informations about demographic processes because their allele frequency distribution can be explained only by mutation and genetic drift, while the 7 non-neutral SSRs give information about the effect of eco-geographical factors on genetic diversity and distribution of allele frequencies.

Neutral SSRs

Microsatellite diversity

The proportion of polymorphic loci varied from 45% to 82% with a mean number of alleles per locus around 2 for the whole set of populations (see Table 4 for details). Despite moderate to large within-population gene diversity ($0.11 < H_E < 0.33$, averaged over loci), we noticed a considerable frequency (more than 50%) of fixed alleles in 6 populations (Deguache, El Kef, Jelma, Majel Bel Abbes, Rhayet and Soliman). Over the whole set of populations, population El Kef was clearly the least diverse, showing

the lowest number of alleles per locus, the lowest mean H_E , and the largest percentage of fixed alleles. For the populations analysed, we found only a limited extent of linkage disequilibrium (less than 5%), but none in Bulla Regia, Deguache, El Kef, Jelma and Majel Bel Abbes populations. The highest proportion of loci in linkage disequilibrium was observed in the Thala population, with 18.18% of markers pairs showing highly significant linkage disequilibrium (** $P < 0.001$). In accordance with this result, the number of multilocus genotypes observed per population was large with an average of 9.6 multilocus genotypes per population.

Population structure

Factorial Correspondence Analysis (Fig. 4), where the first two axes explain 22.67% of the variability (12.57% for first axis and 10.10% for the second axis), shows geographical structuring of the genetic diversity in these populations. We can separate two groups according to population location, but, in this FCA, the Enfidha population is not located in either of the two groups, and Thala is located between these two groups.

AMOVA (Table 7) reveals that 53.65% of the molecular variation is explained by differences between populations.

Table 4 Detailed characterization of the microsatellite diversity revealed in the ten populations of *M. truncatula* using microsatellite loci (software Genetix version 4.04, Belkhir et al. 1999)

	Enfidha	Jelma	Amra	Degueche	Majel Bel Abbes	Thala	El Kef	Soliman	Bulla Regia	Rhayet	Average
<i>Neutral SSRs</i>											
<i>n</i>	14	14	14	10	15	16	14	13	13	13	13.6
<i>M</i>	11	8	12	5	11	10	8	9	12	10	9.6
<i>A</i>	2.00	1.55	2.09	1.64	1.73	2.18	1.45	1.91	2.09	1.64	1.83
H_0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
H_E	0.33	0.15	0.31	0.21	0.13	0.30	0.11	0.22	0.28	0.16	0.22
<i>P</i>	0.73	0.45	0.82	0.55	0.64	0.73	0.36	0.55	0.55	0.45	0.58
LD%	1.82	0.00	3.64	0.00	0.00	18.18	0.00	3.64	0.00	1.82	2.91
FA%	49.09	81.82	41.82	72.73	69.09	49.09	89.09	74.55	72.73	81.82	68.18
<i>Non-neutral SSRs</i>											
<i>n</i>	14	14	14	10	15	16	14	13	13	13	13.6
<i>M</i>	12	10	10	7	13	11	13	11	12	12	11.1
<i>A</i>	2.86	1.71	2.86	2.14	2.71	3.14	3.14	2.57	3.14	2.86	2.71
H_0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
H_E	0.51	0.29	0.40	0.31	0.45	0.50	0.50	0.40	0.52	0.43	0.43
<i>P</i>	1.00	0.71	1.00	0.71	1.00	1.00	0.86	0.86	0.86	0.86	0.89
LD%	14.29	0.00	4.76	4.76	4.76	33.33	4.76	0.00	14.29	14.29	9.52
FA%	0.00	52.38	4.76	52.38	0.00	0.00	28.57	28.57	28.57	28.57	22.38

n: sample size; *M*: number of multilocus genotypes obtained combining the SSR loci; *A*: mean number of alleles (averaged over loci); H_0 : Mean observed heterozygosity; H_E : Nei's gene diversity averaged over loci; *P*: proportion of polymorphic loci (at 95%); LD%: percentage of pairs of loci in linkage disequilibrium; FA%: percentage of fixed alleles

Table 5 Matrix of Nei's distance between populations, calculated with neutral SSRs

	Enfidha	Jelma	Amra	Deguache	Majel Bel Abbas	Thala	El Kef	Soliman	Bulla Regia	Rhayet
Enfidha	0.000	0.660	0.712	0.511	0.742	0.712	0.466	0.808	0.802	0.6200
Jelma	0.660	0.000	0.358	0.393	0.423	0.372	0.732	0.530	0.426	0.8080
Amra	0.712	0.358	0.000	0.396	0.265	0.535	0.696	0.456	0.398	0.5680
Deguache	0.511	0.393	0.396	0.000	0.130	0.332	0.436	0.327	0.170	0.4140
Majel Bel Abbas	0.742	0.423	0.265	0.130	0.000	0.323	0.642	0.463	0.253	0.5740
Thala	0.712	0.372	0.535	0.332	0.323	0.000	0.323	0.270	0.187	0.4380
El Kef	0.466	0.732	0.696	0.436	0.642	0.323	0.000	0.144	0.255	0.5470
Soliman	0.808	0.530	0.456	0.327	0.463	0.270	0.144	0.000	0.095	0.4130
Bulla Regia	0.802	0.426	0.398	0.170	0.253	0.187	0.255	0.095	0.000	0.2470
Rhayet	0.620	0.808	0.568	0.414	0.574	0.438	0.547	0.413	0.247	0.000

A Mantel test was performed to test isolation by distance for the ten populations. The results were not significant ($R = 0.25$ and $P = 0.11$, data not shown).

Genetic distances between pairs of populations, computed according to Nei (1978), show high variability, ranging from 0.095 (between Bulla Regia and Soliman) to 0.808 (between Enfidha and Soliman). The UPGMA tree obtained using the pairwise genetic distance matrix (Table 5) is represented in Fig. 2 and shows that two main groups of populations can be distinguished. One includes the five populations collected in the south of Tunisia (Amra, Deguache, Enfidha, Jelma, and Majel Bel Abbas). The second group is composed of five populations

collected in the north (Bulla Regia, El Kef, Rhayet, Soliman and Thala).

The cluster analysis with TESS software allows testing different levels of spatial dependence and different values of K (Table 6). The best model was obtained for $K = 7$ and a spatial dependence of 0.7 (Fig. 3). This best model was the one which yields high likelihood and also the best assignment probabilities. For example, with a spatial dependence equal to 0, the assignment probabilities were very bad. For this configuration, the clustered populations are Deguache and Majel Bel Abbas, El Kef and Soliman, Bulla Regia and Rhayet. These clusters are not exactly the same as in the best model, but the separation between the northern and southern populations is conserved.

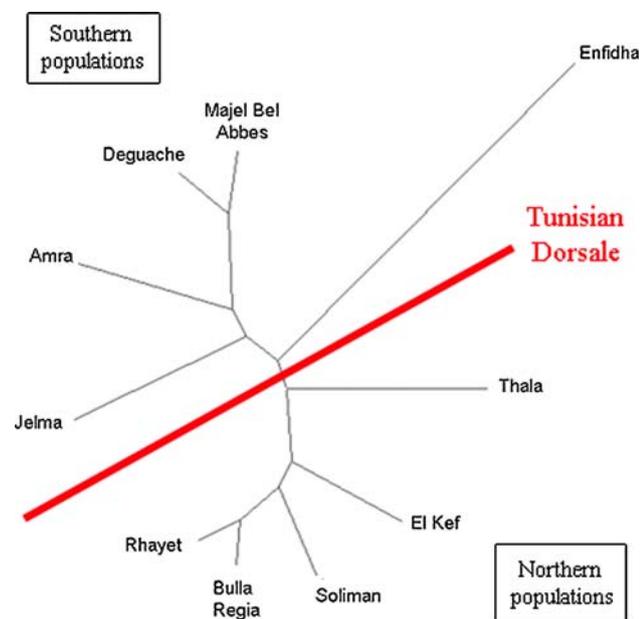


Fig. 2 UPGMA tree, based on neutral SSRs, built using the pairwise Nei's genetic distance matrix between *M. truncatula* populations

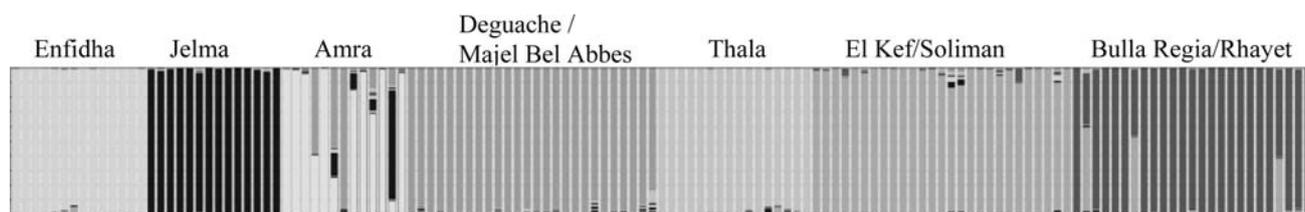
Non neutral SSRs

Microsatellite diversity

For the 7 studied SSR, the proportion of polymorphic loci is higher than those obtained with neutral SSRs: from 71% to 100% with a mean number of alleles per locus of 2.71 (Table 4). The gene diversity is also higher with an average value of 0.43 ($0.29 < H_E < 0.52$), and the frequency of the fixed alleles is lower (only two populations with a frequency higher than 50%: Deguache and Jelma). The most diverse populations according to their H_E values are Bulla Regia, El Kef, Enfidha and Thala. The number of multilocus genotypes observed per population was large with an average of 11.1 multilocus genotypes per populations. For this set of SSRs, higher levels of linkage disequilibrium are observed than for the neutral SSRs: more than 10% for 4 populations (Bulla Regia, Enfidha, Rhayet and Thala). The highest proportion of loci in linkage disequilibrium was observed in the Thala population, with 33% of markers pairs showing highly significant linkage disequilibrium.

Table 6 Table of likelihoods for TESS runs: 5 replicates and 4 values of spatial dependence

	K-Value								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Spatial dependence value									
0	-1697	-1469	-1195	-1114	-1029	-1001	-1007	-1070	-1161
	-1698	-1473	-1199	-1118	-1030	-997	-1001	-1071	-1153
	-1695	-1474	-1199	-1113	-1028	-996	-1003	-1084	-1159
	-1696	-1478	-1194	-1116	-1023	-998	-1006	-1074	-1154
	-1694	-1471	-1190	-1115	-1031	-993	-1008	-1081	-1160
0.5	-2166	-1926	-1816	-1744	-1557	-1387	-1403	-1366	-1278
	-2078	-1937	-1806	-1740	-1575	-1459	-1373	-1396	-1278
	-2177	-1965	-1793	-1765	-1576	-1486	-1372	-1364	-1273
	-2125	-1963	-1774	-1768	-1531	-1419	-1373	-1391	-1274
	-2125	-1962	-1764	-1770	-1543	-1418	-1351	-1369	-1210
0.7	-2179	-2038	-1868	-1698	-1512	-1411	-1445	-1463	-1514
	-2173	-1998	-1852	-1709	-1501	-1448	-1436	-1511	-1508
	-2179	-2008	-1869	-1717	-1574	-1399	-1463	-1499	-1527
	-2132	-2008	-1867	-1711	-1593	-1441	-1425	-1498	-1528
	-2179	-2002	-1872	-1735	-1559	-1405	-1481	-1514	-1506
1	-2181	-2021	-1907	-1885	-1685	-1602	-1637	-1498	-1436
	-2183	-1981	-1966	-1889	-1666	-1533	-1641	-1536	-1458
	-2180	-2026	-1834	-1897	-1677	-1555	-1643	-1486	-1471
	-2080	-1995	-1761	-1850	-1638	-1502	-1630	-1482	-1501
	-2122	-1995	-1847	-1888	-1644	-1546	-1659	-1492	-1460

**Fig. 3** Cluster analysis of Tunisian population structure using TESS software. Vertical lines correspond to individuals, and colors indicate their membership in genetic clusters

Population structure

Factorial Correspondence Analysis (Fig. 4) represents 18.20% of the total variability (9.81% for axis 1 and 8.39% for axis 2), the third axis represents 7.95% of the variability. For each population, there is a limited spread of the individuals: all of them stay close to the other ones of the same population. There is also differentiation of northern and southern populations: the northern populations are positively correlated to axis 1 and 2 and are located in the upper right of the FCA, and the southern ones negatively correlated to these axes and are located in the lower left of the FCA. The Thala population seems to have a particular location in this figure, because it presents a high spread and a position clearly independent of southern and northern

groups. Another AMOVA separating the northern and southern populations reveals significant differentiation between these two groups (Table 7).

To discover whether eco-environmental factors influence population genetic structure, the software GESTE was used to study the 7 non-neutral SSRs and the 3 factors (altitude, salinity, rainfall). This method tests the influence of different factors on the genetic structure of these populations. For this analysis, 3 models were tested that include different variables: (a) constant, (b) the studied factor, and (c) constant and the studied factor. The results are included in Table 8, where we separate the probability of no environmental effect (model a) and the probability of an influence of the environmental effect (model b + model c). As expected, we found higher probabilities for

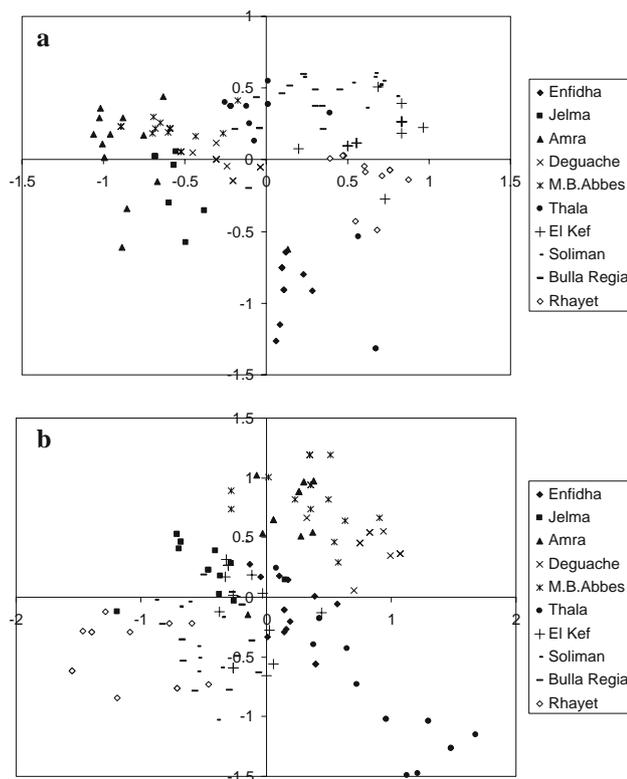


Fig. 4 Association among 136 lines of *M. truncatula* distributed in 10 populations, revealed by Factorial Correspondence Analysis (FCA) estimated from neutral (a) and non-neutral (b) SSR data

environmental factors to correlate with the genetic structure of non-neutral loci: 71% for rainfall, 59% for altitude, and 55% for salinity, contrasted with 33–35% probabilities for these factors to correlate with neutral SSRs.

Discussion

The creation of a collection of genetically diverse natural lines is crucial for plant breeding (Flowers 2004, Zhang et al. 2004). With the objective of obtaining forage legume lines adapted to the requirements of Tunisian agriculture,

we examined 136 *M. truncatula* lines collected from 10 natural Tunisian populations. The rationale for the choice of these sites was to cover (1) a range of altitudes from sea level (Enfidha and Soliman) up to 800 m high (Thala), (2) a range of rainfalls from sub-humid (500–700 mm, Bulla Regia, Rhayet) to Saharan superior (50 mm, Deguache), and (3) a range of salinity: from non saline soils up to salinized littoral fields “Sebkha” (Enfidha and Soliman). It is noteworthy that the Deguache site is characterized by both high salt and low rainfall.

Genetic diversity of *M. truncatula* lines

Genotyping 10 populations using 18 SSR loci revealed a large genetic diversity both at the population level and across the whole collection. The use of markers distributed across the genetic map and representative of both the expressed and the non-expressed part of the genome, limits differences in mode of evolution which could bias the evaluation of the genetic diversity. As shown in Table 2, no evident link was observed between the repeated motif of SSRs, their genetic location and their polymorphism. Only a slight relationship was detected for dinucleotidic loci between the polymorphism (as measured using Nei’s gene diversity) and the number of motif repeats of the SSR loci.

In our sample of 18 SSRs, 7 of them are non-neutral according to the Ewens-Watterson test. This high value can be explained by the sampling strategy which consist in optimizing the effect of eco-environmental variables with a choice of populations which grow in specific conditions. With a random strategy, the number of neutral SSRs would probably have been lower. We usually consider SSRs as neutral markers because they are supposed to be located in non-coding regions of the genome. However, in maize, Vigouroux et al. (2002, 2005) have shown that SSRs can be affected by selection and, consequently, that some SSRs can be non-neutral when they are in linkage disequilibrium with selected genes. Vigouroux et al. (2005) demonstrate the non-neutrality of SSRs located near QTLs for domestication traits, showing that this was the case of 5% of their

Table 7 Analysis of molecular variance (AMOVA) for neutral and non-neutral SSRs

	Source	df	Variance component	Variation accounted for (%)
Neutral SSRs	Between populations	9	1.31 ^a	53.65
	Within populations	262	1.13 ^a	46.35
	Total	271	2.44	100.00
Non-neutral SSRs	Between populations	9	0.99 ^a	44.79
	Within populations	262	1.22 ^a	55.21
	Total	271	2.21	100.00

The significance of the test after 1000 permutations is indicated by:

^a For significant test at 1% and NS for non-significant one

Table 8 Influence of 3 eco-environmental variables on neutral and non-neutral SSRs allelic distribution

	Rainfall	Altitude	Salinity
Neutral SSRs			
Probability of environmental effect	35	33	33
Probability of absence of environmental effect	65	67	67
Non-neutral SSRs			
Probability of environmental effect	71	59	55
Probability of absence of environmental effect	29	41	45

studied SSRs. In our study, the eco-environmental conditions were chosen to maximize genetic diversity, which could explain why the percentage of non-neutral SSRs is higher.

The *M. truncatula* neutral SSRs show a lower genetic diversity and a higher number of fixed alleles than non-neutral SSRs. This can be explained by the “origin” of the diversity and the distribution: in the case of neutral SSRs, diversity comes only from mutations, genetic drift, and migration, but in the case of non-neutral SSRs, selection imposed by environmental factors has also influenced their diversity. This could explain why we have fewer fixed alleles in the case of non-neutral SSRs, because temporal variation of external factors creates fluctuating selection pressures that maintain variation within populations. This balancing selection causes alleles to be maintained longer than neutral alleles would and hence to maintain more variability.

Neutral markers and population structure

The Mantel tests between genetic and geographic distances were not significant, ruling out an isolation by distance model. Such a result was previously found in other selfing species. Namely, in *Arabidopsis thaliana*, there is no clear evidence for isolation by distance at the whole species level, although some slight signals of population structure can be found, probably due to the ancient events of colonization process (Timothy et al. 2000). In *M. truncatula*, an analysis of accessions originating from the whole Mediterranean basin similarly showed no signal of isolation by distance; rather, there is a low level of population structure likely related to different waves of colonization and shuffling by later long distance migration events (Ronfort et al. 2006).

Despite this lack of isolation by distance, genetic distances between pairs of populations according to the pairwise F_{ST} showed stratification into two main groups, a northern group and a southern group separated by the Tunisian Dorsale. The Tunisian Dorsale is a set of mountains following a South-West—North-East axis (Fig. 1) of moderate altitude (500–1400 m) which separate the arid southern regions from the more humid northern regions of Tunisia. The population genetic effect of this natural obstacle was

previously observed by Baatout et al. (1991), who showed that the Tunisian Dorsale separates two *Hedysarum* sub-populations. The population Thala seems to be genetically between the two groups (Fig. 4a) which could be explained by the location of this population on the Tunisian Dorsale. However, the fact that TESS separated the Thala accessions into a single cluster shows that this population is not a mixture between northern and southern populations, but rather a genetically distinct population. The results of the AMOVA (Table 7) conducted on these two groups validate this structure, as there is a significant difference between the northern and southern populations. This result is confirmed by the TESS analysis (Fig. 3): the best model has a spatial dependence of 0.7 which shows that there is an influence of the geographical location on the genetic structure. Effectively, this analysis shows that we have 7 different clusters, and we observe that only populations located in the same area (north or south of the Tunisian Dorsale) can cluster while there is no clustering between northern and southern populations. It is noteworthy that only the Amra population share alleles with Jelma and with the cluster Deguache/Majel Bel Abbes demonstrating a gene flow between these populations. This could be mediated by human-induced sheep displacement during the year that would allow migration between southern populations.

The observed population structure could be related to different genetic diversities or to the presence of different alleles in the groups. The genetic diversities were not significantly different, so the structure is probably due to different alleles. When studying diagnostic alleles (alleles which are found only in one or two populations), we observed that when a diagnostic allele is found in two populations, it is always in populations from the same area (north or south) and never in two populations from different groups (data not shown).

Thus, we demonstrate a reduction in gene flow across the Tunisian Dorsale mountain range as reflected in the population differentiation at neutral loci in *M. truncatula*.

Non-neutral markers and population structure

FCA of the 7 non-neutral SSRs shows a North/South structuring of the populations. However, the first two FCA

axes only capture a small part of the genetic variability, so we asked whether measured eco-environmental factors influence the non-neutral structuring of the populations. The variables rainfall, soil salinity and altitude were tested independently (Table 8). We observed contrasting results for neutral and non-neutral markers: the environmental factors have a low probability of influencing the neutral markers (between 33% and 35%), but a high probability of influencing the genetic structure of non-neutral markers (between 55% and 71%). This result can explain the North/South distribution observed with the FCA, which may be partially due to rainfall since in Tunisia water availability is related to a North-South axis. The small amount of variance accounted for by the first two FCA axes indicates that other environmental components may be involved in structuring these populations. Altitude is one of them, but it would be interesting to study the influence of other eco-environmental factors like cold weather, soil composition or pH.

In the case of the 10 Tunisian populations we have studied, the neutral and non-neutral SSRs contribute different information about genetic structure. In the two cases, we have a clear separation between Northern and Southern populations, with limited gene flow through the Tunisian Dorsale, but this structure is probably not linked to the same phenomenon. For the neutral markers, this structure is due to the presence of a natural obstacle to gene flow between two groups of populations. On the other hand, the structure observed with non-neutral markers is likely to be linked to local adaptation of *Medicago truncatula* to rainfall, altitude and salinity. These markers are probably linked to genes involved in adaptation, and thus may be helpful to search for candidate genes. We suggest that the choice of so-called neutral markers should be carefully evaluated in population genetics studies in order to separate neutral and non-neutral markers and estimate the contribution of each to genetic diversity.

Acknowledgments This research was supported in part by French-Tunisian cooperation (CMCU 00F0909, PICS 712) and by European Union (FP6 Integrated Project “Grain Legumes”). F.L. was recipient of a PED grant thesis by CNRS. F.C. was supported by a grant from the FP6 European Integrated Project “Grain Legumes”. The authors thank Dr. S. Santoni (INRA, Montpellier, France) for his generous gift of SSRs markers. We thank an anonymous reviewer for his/her precious advices to improve the manuscript. We thank M. Friesen (UC Davis, USA) for reading the manuscript before publication.

References

- Ane JM, Levy J, Thoquet P, Kulikova O, de Billy F, Penmetsa V et al (2002) Genetic and cytogenetic mapping of DMI1, DMI2, and DMI3 genes of *Medicago truncatula* involved in Nod factor transduction, nodulation, and mycorrhization. *Mol Plant Microbe Interact* 15:1108–1118. doi:[10.1094/MPMI.2002.15.11.1108](https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.11.1108)
- Baatout H, Marrakchi M, Combes D (1991) Genetic divergence and Allozyme variation within and among populations of *Hedysarum spinosissimum* subsp. Capitatum and subsp. Spinosissimum (Papilionaceae). *Taxon* 40(2):239. doi:[10.2307/1222978](https://doi.org/10.2307/1222978)
- Baquerizo-Audiot E, Desplanque B, Prospéri J-M, Santoni S (2001) Characterization of microsatellite loci in the diploid legume *Medicago truncatula* (barrel medic). *Mol Ecol Notes* 1:1–3. doi:[10.1046/j.1471-8278.2000.00001.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2000.00001.x)
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1999) GENETIX 4.04, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France
- Bonnin I, Ronfort J, Wozniak F, Olivieri I (2001) Spatial effects and rare outcrossing events in *Medicago truncatula* (Fabaceae). *Mol Ecol* 10:1371–1383. doi:[10.1046/j.1365-294X.2001.01278.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01278.x)
- Brunel D, Froger N, Pelletier G (1999) Development of amplified consensus genetic markers (ACGM) in *Brassica napus* from *Arabidopsis thaliana* sequences of known biological function. *Genome* 42:387–402. doi:[10.1139/gen-42-3-387](https://doi.org/10.1139/gen-42-3-387)
- Chen C (2006) TESS reference manual. Grenoble: Institut d’Informatique et Mathématiques Appliquées de Grenoble. <http://timc.imag.fr/Olivier.Francois/tess.html>
- Diwan N, Bhagwat AA, Bauchan GR, Cregan PB (1997) Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome* 40:887–895. doi:[10.1139/g97-115](https://doi.org/10.1139/g97-115)
- Donini P, Law JR, Koebner RM, Reeves JC, Cooke RJ (2000) Temporal trends in the diversity of UK wheat. *Theor Appl Genet* 100:918. doi:[10.1007/s001220051370](https://doi.org/10.1007/s001220051370)
- Drinkwater LE, Wagoner P, Sarrantonio M (1998) Legume-based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses. *Nature* 396:262. doi:[10.1038/24376](https://doi.org/10.1038/24376)
- Ellwood SR, D’ Souza NK, Kamphuis LG, Burgess TI, Nair RM, Oliver RP (2006) SSR analysis of the *Medicago truncatula* SARDI core collection reveals substantial diversity and unusual genotype dispersal throughout the Mediterranean basin. *Theor Appl Genet* 112:977–983. doi:[10.1007/s00122-005-0202-1](https://doi.org/10.1007/s00122-005-0202-1)
- Eujayl I, Sledge MK, Wang L, May GD, Chekhovskiy JC, Zwonitzer JC, Mian MA (2004) *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *Theor Appl Genet* 108:414–422. doi:[10.1007/s00122-003-1450-6](https://doi.org/10.1007/s00122-003-1450-6)
- Felsenstein J (1989) PHYLIP—phylogeny inference package (Version 3.2). *Cladistics* 5:164–166
- Flowers TJ (2004) Improving crop salt tolerance. *J Exp Bot* 55:307–319. doi:[10.1093/jxb/erh003](https://doi.org/10.1093/jxb/erh003)
- Foll M, Gaggiotti O (2006) Identifying the environmental factors that determine the genetic structure of populations. *Genetics* 174:875–891. doi:[10.1534/genetics.106.059451](https://doi.org/10.1534/genetics.106.059451)
- François O, Ancelet S, Guillot G (2006) Bayesian clustering using hidden Markov random fields in spatial population genetics. *Genetics* 174:805–816. doi:[10.1534/genetics.106.059923](https://doi.org/10.1534/genetics.106.059923)
- Gao L, Schaal BA, Jia J, Dong Y (2003) Assessment of population genetic structure in common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. Using microsatellite and allozyme markers. *Theor Appl Genet* 106:173
- Gherardi M, Mangin B, Goffinet B, Bonnet D, Huguet T (1998) A method to measure genetic distance between allogamous populations of alfalfa (*Medicago sativa*) using RAPD molecular markers. *Theor Appl Genet* 96:406–412. doi:[10.1007/s001220050756](https://doi.org/10.1007/s001220050756)
- Julier B, Flajoulot S, Barre P, Cardinet G, Santoni S, Huguet T et al (2003) Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biol* 3:9. doi:[10.1186/1471-2229-3-9](https://doi.org/10.1186/1471-2229-3-9)
- May GD, Dixon RA (2004) *Medicago truncatula*. *Curr Biol* 14:R180–R181. doi:[10.1016/j.cub.2004.02.013](https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.013)

- Nei TM (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583–590
- Page RD (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12:357–358. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P et al (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007
- Ronfort J, Bataillon T, Santoni S, Delalande M, David J, Prosperi JM (2006) Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collections for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol* 6:28. doi:10.1186/1471-2229-6-28
- Roussel V, Koenig J, Beckert M, Balfourier F (2004) Molecular diversity in French bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programmes. *Theor Appl Genet* 108:920. doi:10.1007/s00122-003-1502-y
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin: a software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland
- Slatkin M (1994) An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. *Genet Res* 64:71–74
- Slatkin M (1996) A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. *Genet Res* 68:259–260
- Thoquet P, Gherardi M, Journet EP, Kereszt A, Ane JM, Prosperi JM et al (2002) The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biol* 2:1. doi:10.1186/1471-2229-2-1
- Timothy FS, Bernhard H, Thomas M-O (2000) Genetic isolation by distance in *Arabidopsis thaliana*: biogeography and postglacial colonization of Europe. *Mol Ecol Notes* 9:2109–2118
- Vigouroux Y, McMullen M, Hittinger CT, Houchins K, Schulz L, Kresovich S et al (2002) Identifying genes of agronomic importance in maize by screening microsatellites for evidence of selection during domestication. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9650–9655. doi:10.1073/pnas.112324299
- Vigouroux Y, Mitchell S, Matsuoka Y, Hamblin M, Kresovich S, Smith JSC et al (2005) An analysis of genetic diversity across the maize genome using microsatellites. *Genetics* 169:1617–1630. doi:10.1534/genetics.104.032086
- Watterson GA (1977) Heterosis or neutrality? *Genetics* 85:789–814
- Young ND, Cannon SB, Sato S, Kim D, Cook DR, Town CD et al (2005) Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 137:1174–1181. doi:10.1104/pp.104.057034
- Zhang JZ, Creelman RA, Zhu JK (2004) From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol* 135:615–621. doi:10.1104/pp.104.040295

V.3. Informations complémentaires et conclusions à l'article

A l'heure actuelle, les microsatellites représentent les outils moléculaires pertinents pour l'analyse de la diversité génétiques des populations naturelles de *M. truncatula*. Ces marqueurs nous ont permis d'identifier un très haut niveau de diversité dans cette collection tunisienne étudiée (exemple de polymorphisme sur gel d'agarose: Figure 12).

Disposant d'une mesure de l'hétérozygotie pour les populations étudiées, il s'agit de savoir quelle information supplémentaire sera apportée par une interprétation de cette mesure à travers un modèle démographique.

Dans cet article, plusieurs paramètres (distance de Nei, déséquilibre de liaison, et test de Mantel) ont permis de discuter cette question.

Cette diversité moléculaire est structurée selon un axe Nord-Sud (Figure 13), de même selon la pluviométrie annuelle. Néanmoins, le test de Mantel a permis de déduire qu'il n'existe pas de séparation par la distance pour l'ensemble des populations. Ceci nous permet de déduire que ces populations n'ont pas subi une évolution séparée et qu'elles peuvent avoir des échanges alléliques entre elles. Certains modes de transfert de graines peuvent être envisagés, par exemple le commerce des moutons élevés au sud et vendus au nord dans les marchés des villes ou bien le transport par les oiseaux.

Il s'avère que la pluviométrie serait la seule variable environnementale qui influencerait la diversité génétique.

Il apparaît de même, que la dorsale tunisienne (voir Annexe 1) joue un rôle principal dans la distinction des populations du Nord par rapport à celle du Sud. Elle semble être une barrière à l'échange allélique entre ces deux lots de populations. Ce rôle de barrière est directement relié à l'influence de cette chaîne de montagnes dans le climat au Sud.

En raison de la diversité allélique notée à l'intérieur (Annexe 3, Figure 14) et entre ces populations de *M. truncatula*, la Tunisie est considéré comme un centre de diversité de cette espèce. Ceci nous incite à préserver ce haut niveau de diversité *in situ*, si possible, et au moins le garder et l'entretenir dans des collections.

Il faut bien noter que les lignées tunisiennes de cette collection ont subi une ou deux autofécondations afin d'obtenir des lignées fixées génétiquement. Cette fixation génétique a probablement causé une perte de polymorphisme. En effet chez les espèces autogames, la diversité génétique à l'intérieur des populations est réduite d'un facteur de $(2-S)/2$, où S est le taux d'autofécondation. Après une autofécondation, le taux d'hétérozygotie est réduit de

Figure 12: Un exemple de polymorphisme détecté pour trois population de *M. truncatula* et la lignée de référence J6 (Jemalong) avec le microsatellite MTIC 564.

Le marqueur de taille utilisé est le 1kb (GIBCO-BRL)

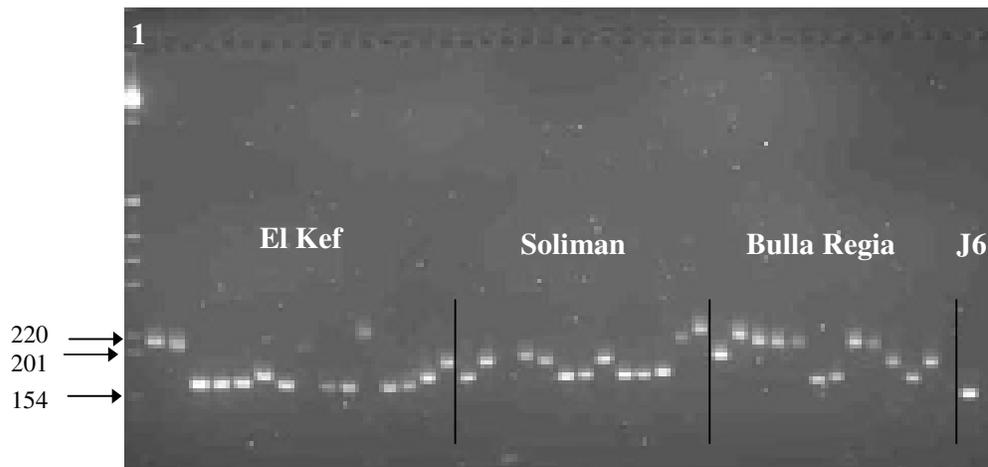


Figure 13 : Association entre les 136 individus de la collection tunisienne de *M. truncatula* selon une AFC basée sur 18 SSR. Chaque axe (1 et 2) représente respectivement 9.68 et 7.85 % de la diversité des microsatellites.

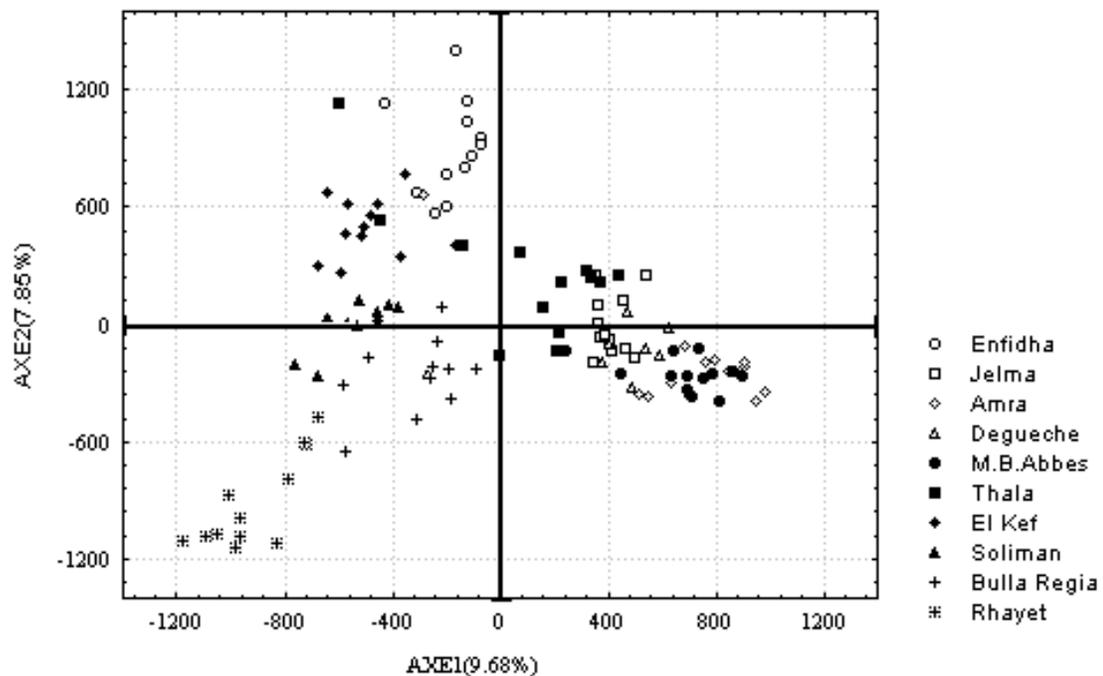
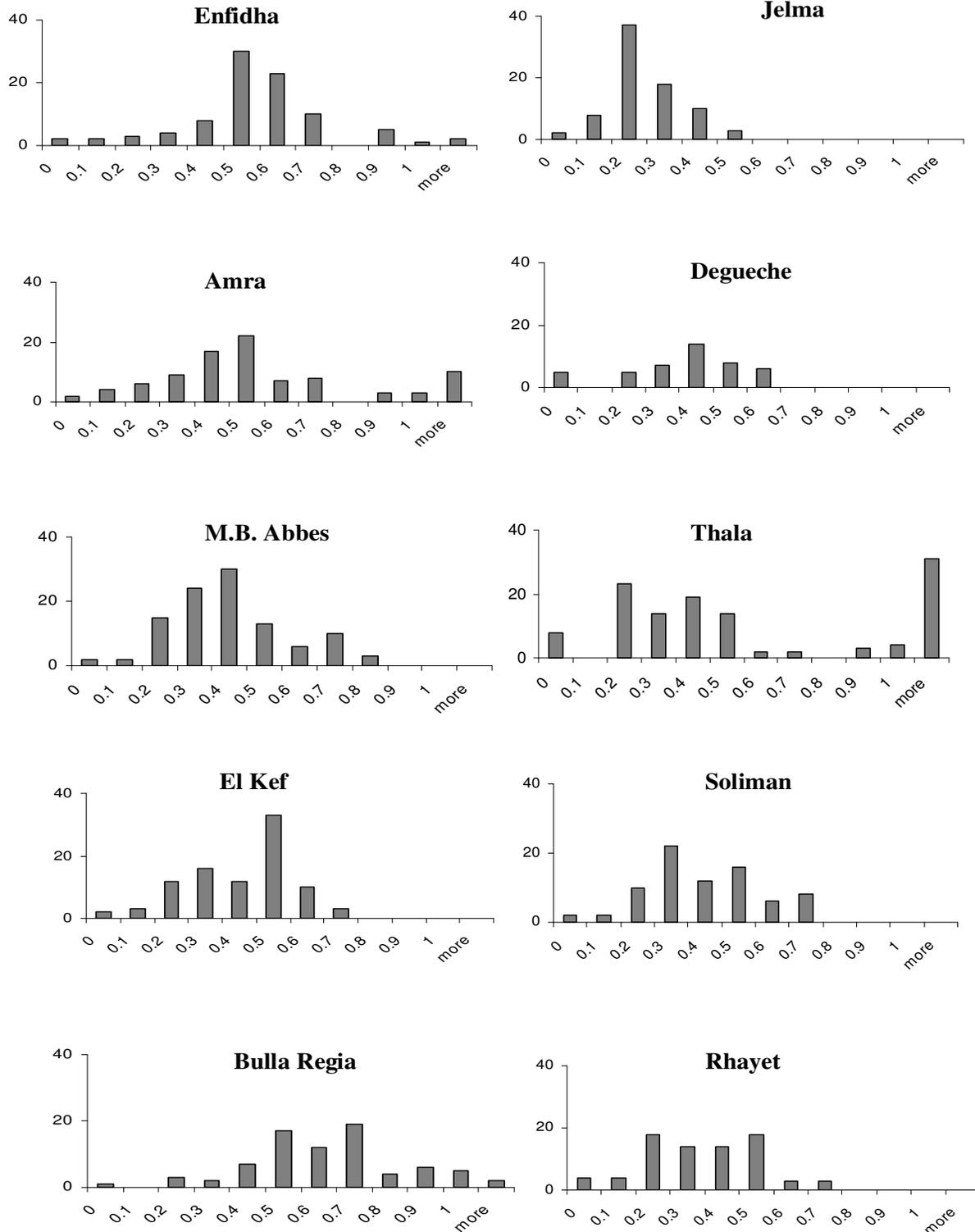


Figure 14: Répartition de la fréquence des distances génétiques entre les individus de chaque population de *M. truncatula*



moitié par rapport à une allogamie. Etant donné que les sites de collecte sont bien délimités et préservés (en les choisissant loin des zones urbaines), un retour sur terrain serait possible pour estimer cette diversité sur un autre lot de graines.

VI. Corrélations

VI.1. Corrélation diversité génétique / Motif microsatellite

Une faible corrélation non significative est retrouvée entre la moyenne de la diversité génétique et le nombre d'unités de répétition du marqueur microsatellite. Dans la figure (Figure 15), on montre la corrélation entre la diversité génétique et le motif répété du marqueur microsatellite.

En moyenne, la diversité des marqueurs à motif di-nucléotidique est plus grande que celle des tri-nucléotidiques. Mais on n'a pas pu observer de différence statistiquement significative

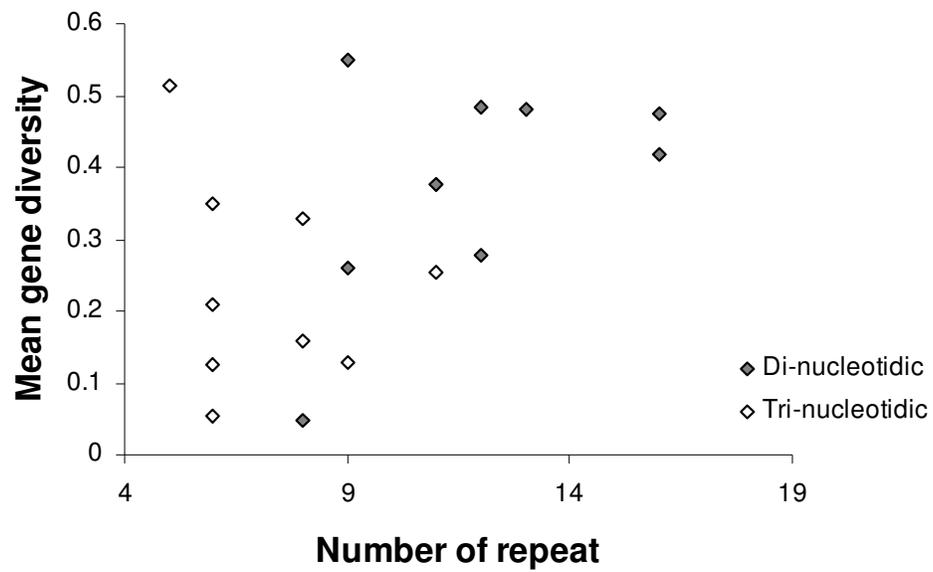
VI.2. Corrélations phénotype/génotype

La comparaison de l'association entre populations selon les caractères phénotypiques (Figure 11) et selon les marqueurs moléculaires (Figure 16), montre une association différente des populations selon les caractères mesurés. Une exception pour le couple de populations M.B. Abbas et Amra, qui s'associe selon les deux arbres. Ces deux populations, très proches géographiquement, présentent alors des similitudes pour les deux types de caractères.

VI.3. Corrélations paramètres génétiques et éco-géographiques

Une comparaison de la diversité génétique avec l'emplacement des sites, l'altitude, et la salinité, correspondant aux populations a été réalisé par un test de Mantel. Les résultats ne montrent pas de corrélations existantes entre ces paramètres. Cependant une AMOVA réalisé dans l'article inclus précédemment, montre une structuration génétique des populations pouvant être expliquée par la pluviométrie.

Figure 15 : Relation entre le nombre de répétition du motif microsatellite (di et tri nucléotidiques sont représentés séparément) et la moyenne de la diversité génétique des populations de la collection tunisienne de *M. truncatula*. (Figure réalisée par Joelle Ronfort utilisant Mann-Whitney's U-tests)



VII. Discussion et conclusions générales

L'identification du polymorphisme des caractères morphologiques chez les populations naturelles de plantes représente la première étape qui permet de disséquer l'origine génétique importante de ce polymorphisme. Cette variation intra-spécifique naturelle représente une ressource génétique pour l'étude de l'adaptation et l'évolution de caractères liés à la croissance des divers plantes, Exemple: Arabidopsis (Alonso-Blanco *et al.* 2005).

Dans ce chapitre on a présenté une prospection de la diversité génétique existante dans la collection réalisée de *M. truncatula*. Ceci a été fait à l'aide de marqueurs morphologiques et moléculaires.

On note que pour cette collection, la diversité génétique a été maximisée par un premier choix des gousses. C'est pour cette raison que l'utilisation des outils de la génétique de populations et d'analyse de la structure de populations de cette collection devrait être considérée avec prudence.

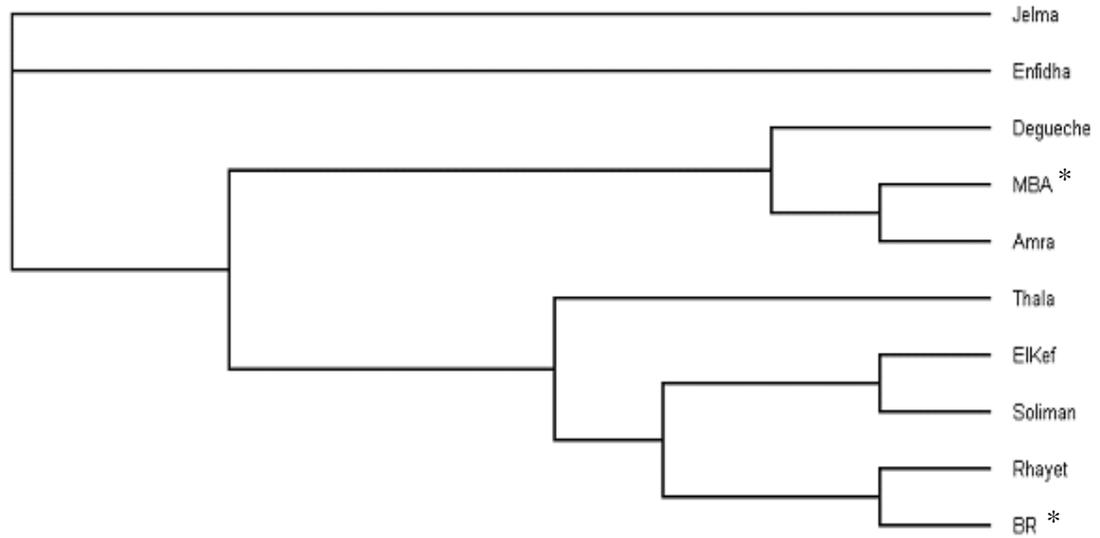
Corrélations entre le Phénotype et l'environnement

La précocité de floraison des populations de *M. truncatula* est variable entre les populations et selon les conditions environnementales de la culture. En effet il a été démontré que les facteurs, génotype des plantes, température et photopériode influent les caractères de floraison des plantes comme cela a été montré chez le pois chiche (Berger *et al.* 2006; Soltani *et al.* 2006) et le riz (Ouk *et al.* 2006).

Selon notre étude, la floraison de *M. truncatula* est soumise à l'effet altitude, salinité et pluviométrie. Le manque d'eau dans les sites du sud tunisiens, entraîne une floraison précoce des populations par rapport à celles se trouvant en présence de ressources hydriques suffisantes. Cette floraison précoce représente une forme d'échappement aux conditions défavorables, comme ça été montré chez des populations de pois chiche en Inde (Berger *et al.* 2006). Chez Arabidopsis, il a été aussi noté l'influence des conditions environnementales sur la floraison (Mouradov *et al.* 2002). En effet, dans des milieux présentant des conditions environnementales stressantes pour les plantes, la floraison est accélérée à cause de la présence d'antioxydants qui catalyse la synthèse d'hormones comme les gibbérellines. Barth *et al.* (2006) ont montré que l'acide ascorbique induit la floraison chez arabidopsis.

Une étude sur les populations naturelles de *M. truncatula* en Algérie (Si ziani et Abdelguerfi 1995), a permis d'évaluer la corrélation entre le temps de floraison, altitude et pluviométrie

Figure 16: Arbre phylogénétique Neighbor-Joining construit avec les données de la matrice des distances génétiques de Nei des 10 populations de *M. truncatula*.



* : MBA, Majel Bel Abbas; BR, Bulla Regia

annuelle des sites de la collection. Dans les zones sub-humides, la corrélation entre l'altitude et le temps de floraison est non significative alors qu'elle est hautement significative avec la pluviométrie. En zone semi-aride seule la pluviométrie semble déterminer la précocité.

Ce caractère adaptatif permet donc la survie des populations de *M. truncatula* dans les zones défavorables à leur croissance en restreignant leur développement aux courtes périodes pluvieuses de l'année.

Les lignées fleurissant tardivement, ont déjà bien développé leurs parties végétatives et permettent par la suite un meilleur remplissage des graines. Cette même observation a été notée chez le pois chiche (Soltani *et al.* 2006).

Pour notre collection, une analyse par étage climatique pourrait ainsi ressortir d'autres conclusions. De même il serait intéressant d'associer en plus de l'altitude, d'autres facteurs comme la température, la répartition annuelle de la pluviométrie, la latitude, la longitude... pour mieux distinguer les populations selon leur provenance.

Corrélations entre le génotype et l'environnement

La corrélation génotype / environnement a été abordé dans l'article et on a essayé de comprendre la structuration de la diversité génétique en fonction des différents facteurs climatiques. Il se révèle que la pluviométrie, assez différentes entre les sites, est un facteur qui explique en partie la structuration de la diversité génétique.

Corrélations entre le phénotype et le génotype

L'analyse de la variation naturelle chez *M. truncatula* et les espèces cultivées fournit une connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la domestication et l'adaptation des plantes par des modifications liées au développement.

Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de corrélations entre les caractères phénotypiques et la diversité moléculaire pour cette collection de *M. truncatula*. Néanmoins, le nombre de caractères utilisés est très faible en comparant aux autres travaux comme avec le blé (Vanhala *et al.* 2004).

De même, on remarque une distribution selon un gradient Nord / Sud de la diversité moléculaire ainsi que de la floraison. Ceci nous laisse penser que des données phénotypiques plus affinées permettront de déceler probablement une corrélation entre phénotype et génotype.

Au cours de cette étude, différents niveaux de diversité ont été identifiés à l'échelle intra et inter populations. Cette diversité est structurée selon un axe Nord / Sud déterminé par

la séparation faite par la chaîne de montagne la dorsale Tunisienne, en relation avec les caractéristiques éco-géographiques de leurs sites d'origine. On dispose alors d'une collection fournissant des ressources génétiques diversifiées adaptées aux conditions environnementales locales. Cette collection servira à l'analyse du comportement de *M. truncatula* sous stress salin et hydrique.

Chapitre 2

***Diversité de la réponse au sel
des lignées de *M. truncatula****

La collection que j'ai analysée comprend 136 lignées réparties sur 10 sites ayant différentes caractéristiques pédologiques et climatiques. Pour l'analyse de la diversité de réponse au sel, à cause de la lourdeur des expériences, on a fait le choix de prendre un nombre représentatif de lignées d'origine sol salin et de les comparer à des lignées d'origine sur sol non salin.

En premier lieu on a analysé la réponse des lignées en présence d'une source d'azote minéral et dans un second temps, on a étudié leur réponse au sel en condition de symbiose fixatrice d'azote.

Par ailleurs, on a cherché à déterminer l'implication de la souche de rhizobium dans la tolérance de l'association symbiotique en utilisant diverses souches provenant de sols salins et non salins.

Dans une autre partie on a utilisé des graines provenant de la collecte initiale sur terrain de gousses appartenant aux 10 populations. Ceci avait pour objectif d'avoir une idée sur la diversité de réponse au sel en fonction des caractéristiques climatiques du site d'origine.

I. Synthèse Bibliographique: Tolérance au sel des légumineuses

La tolérance au sel a été beaucoup étudiée chez les halophytes (des végétaux adaptés aux milieux hypersalés ou par extension aux milieux à pression osmotique importante), pour comprendre les mécanismes développés pour leur adaptation (Munns 2002).

Cependant les succès notés pour la production de variétés de plantes cultivées tolérantes au sel se sont avérés très limités. Seuls 25 cultivars tolérants à la salinité appartenant à 12 espèces ont été enregistrées (Flowers et Yeo 1995). On peut citer l'exemple d'un cultivar pour la luzerne (Al-Doss et Smith 1998) et un pour le Soja (Owen *et al.* 1994). Flowers et Yeo (1995) en ont conclu que la complexité du processus étudié et l'absence d'une urgence environnementale imminente sont les causes du manque d'intérêt accordé à la création de variétés adaptées .

I.1. Problème de la salinité des sols

Plusieurs contraintes environnementales sont limitantes pour la croissance et le développement des légumineuses. La salinité et la sécheresse sont considérés comme deux facteurs majeurs influant l'agriculture dans les zones arides et semi arides. Approximativement 40 % des surfaces sur terre sont caractérisés par la présence d'un problème potentiel de salinité (Zahran 1997). Les sols salins sont caractérisés par un niveau toxique des chlorures et sulfates de sodium, la conductivité électrique des solutions de sols

saturés en sel est supérieure à 4 dS/m, l'équivalent de 40 mM NaCl (Shirokova *et al.* 2000). Les régions du bassin méditerranéen sont fortement touchées par ce fléau. La Tunisie possède de vastes zones salées (chott et sebkha) et d'importantes quantités d'eaux de qualité très médiocres (Mezni *et al.* 2002).

D'un autre part, essayer de lutter contre la sécheresse par l'irrigation, rajoute aux sols une contrainte de salinisation dite secondaire. Dans ce contexte, améliorer la tolérance des plantes à la sécheresse et la salinité constitue une proposition attractive pour les agriculteurs.

De nos jours, la pression devient plus forte pour chercher à combattre et trouver une solution à la salinité des sols pour les plantes cultivées. Cette urgence suggère que des méthodes efficaces soient requises pour améliorer la tolérance au sel pour de nombreuses variétés de plantes cultivées.

De nombreuses techniques puissantes se sont développées pour altérer des gènes et leur expression dans des plantes. Mais ces techniques n'ont pas été utilisées pour l'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques. En effet cette tolérance montre généralement une héritabilité quantitative.

I.2. Effet de la salinité sur les plantes

La salinité affecte différents mécanismes physiologiques et la nécessité de survivre dans un environnement salin nécessite de multiples mécanismes d'adaptation pour les plantes (Yeo et Flowers 1986). L'évolution de ces mécanismes adaptatifs implique un ensemble complexe de paramètres parmi lesquels beaucoup ne sont pas encore connus.

Cette question est la question de départ que se pose un améliorateur des plantes: Comment déterminer les facteurs limitants ou bien les éléments des mécanismes qui font balancer les plantes vers une résistance ou une tolérance ?

Une approche comparative entre des plantes sensibles et résistantes doit être adoptée pour les détecter. Mais il est important que cette différence de comportements soit reliée à une différence de tolérance et pas à d'autres différences entre plantes comparées.

En littérature, des comparaisons entre espèces et au sein de la même espèce ont été faites avec une comparaison physiologique. Par exemple, le cas du maïs (Maiti *et al.* 1996) et le riz (Yeo *et al.* 1990).

Cependant, la compréhension des différences de mécanismes physiologiques est loin d'aboutir à une explication génétique, vu que les liens entre les gènes et la physiologie restent inaccessibles chez les plantes. Il est nécessaire donc de découvrir les bases génétiques reliées aux différences phénotypiques liées à la tolérance au sel.

I.2.1. Les mécanismes touchés par la salinité

La majorité des changements physiologiques notés chez les plantes soumises à un stress salin est une réponse à des composantes osmotiques. Néanmoins, en présence d'une osmorégulation, les plantes traitées par le sel sont confrontées au problème d'accumulation d'ions toxiques dans leurs tissus, ce qui est considéré comme un élément clé limitant la croissance des plantes en milieu salin (Munns *et al.* 1995).

L'inhibition de la croissance foliaire chez les plantes sensibles est la première réponse à l'excès de sel dans le milieu. Chez les graminées soumises à court terme à une salinité, une inhibition de la croissance foliaire résulte d'une réponse aux composantes osmotiques du stress salin à travers l'ABA (Munns et Termaat 1986). En conséquence à la diminution de la surface foliaire, l'assimilation du carbone photosynthétique est sévèrement réduite. En effet, les composantes stomatiques et non stomatiques reliées aux cycles du CO₂ sont affectés par les sels. Le contrôle des stomates a été attribué surtout à l'ABA (Sibole *et al.* 2003).

I.2.2. Les stratégies d'adaptation

Les mécanismes de tolérance au sel chez les plantes peuvent être groupés en 1) une homéostasie cellulaire regroupant homéostasie ionique et ajustement osmotique (Zhu 2003), 2) un contrôle et une réparation des dommages causés par le stress ou détoxication, 3) une régulation de la croissance.

I.2.2.1. Homéostasie cellulaire

L'homéostasie ionique au niveau des cellules est atteinte sous stress salin par les stratégies suivantes: 1) exclusion des ions Na⁺ des cellules par les canaux ioniques: anti-port Na⁺/H⁺, ou bien par la limitation d'entrée des ions Na⁺, 2) compartimentation de Na⁺ dans des vacuoles intracellulaire pour un ajustement osmotique, 3) la sécrétion de Na⁺. Ainsi la régulation du transport ionique joue un rôle fondamental pour la tolérance au sel chez les plantes.

L'analyse génétique d'un mutant d'*Arabidopsis SOS* (Salt Overly Sensitive) a permis l'identification des mécanismes (the SOS pathway) qui régulent l'homéostasie cellulaire et la tolérance au sel (Zhu 2002).

I.2.2.2. Séquestration du sodium dans des vacuoles

La compartimentation de Na⁺ dans des vacuoles est une stratégie très importante chez les plantes permettant de maintenir ces ions à une faible concentration dans le cytoplasme et conserver un faible potentiel osmotique cellulaire. L'exclusion de l'excès de sodium du

cytoplasme nécessite la synthèse d'osmolytes compatibles avec la réduction du potentiel osmotique; ce dernier est essentiel pour pouvoir prélever de l'eau dans des conditions de stress salin. Ce processus est coûteux en énergie pour la plante.

Des plantes transgéniques de tomate et de *Brassica napus*, sur-exprimant le gène AtNHX1 codant pour anti-port Na^+/H^+ , accumulent du sodium dans leur feuilles mais pas dans les fruits ou les graines. Ces plantes se sont montrées extrêmement tolérantes au stress salin et conservent dans ces conditions des bonnes qualités de fruit chez la tomate et d'huile chez *Brassica napus* (Zhang et Blumwald 2001; Zhang *et al.* 2001).

1.2.2.3. Prélèvement de K^+

Dans les conditions optimales, les plantes maintiennent un haut ratio cytosolique K^+/Na^+ . Le stress salin entraîne la diminution de ce ratio, du fait que les ions Na^+ sont en concurrence avec les ions K^+ , ce qui est défavorable pour les processus biochimiques cellulaires. De même, une forte concentration de potassium augmente le potentiel osmotique qui entraîne une entrée d'eau à partir du milieu extérieur (Claussen *et al.* 1997). Le prélèvement de K^+ est essentiel pour la turgescence cellulaire et le déroulement des processus biochimiques sous stress salin.

Le niveau de transcription des gènes codant pour les transporteurs de K^+ reflète probablement une différence de capacité de la plante à prélever le K^+ sous stress salin. Par exemple chez *Arabidopsis*, le stress salin augmente le niveau de transcription du gène AtKC1 correspondant à un transporteur de K^+ (Pilot *et al.* 2003).

1.2.2.4. Biosynthèse d'osmoprotectants

Les gènes impliqués dans la synthèse d'osmoprotectants sont surexprimés sous stress salin (Zhu 2002). Les osmoprotectants compatibles pour différents solutés sous stress salin protègent les plantes par ajustement osmotique ce qui maintient la turgescence cellulaire, par détoxification des espèces réactives d'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species), et par stabilisation de la structure (quaternaire) des protéines. Chez des plantes transgéniques, il a été prouvé que l'accumulation de mannitol (Shen *et al.* 1997), glycine bêtaïne (Prasad *et al.* 2000), et proline (Zhu *et al.* 1998) améliorent leur tolérance au stress salin.

1.2.2.5. Synthèse de protéines induites par le sel

Chez les plantes supérieures, le stress osmotique induit différentes protéines dans les tissus végétatifs. Ces protéines sont nommées LEA : late-embryogenesis-abundant. Chez *M.*

sativa, le gène *Alfin1* code pour une famille de facteurs de transcription et leur expression est corrélée avec la tolérance au sel (Winicov et Bastola 1999). In vitro *Alfin* se lie au promoteur du gène *MsPRP2*, qui code pour une protéine racinaire du cytosquelette induite par le sel.

1.2.2.6. Synthèse d'antioxydants

Les plantes produisent des espèces d'oxygène actif nommés ROS (radicaux superoxyde (O_2^-), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et radicaux hydroxyl (OH)) en réponse à un stress salin (Hernandez *et al.* 2001). Les ROS causent d'importants dommages dans des lipides membranaires, des protéine et acides nucléiques. La détoxification des ROS constitue un élément clé de défense des plantes contre les stress abiotiques dont le stress salin. Les enzymes responsables de cette détoxification nommées antioxydants incluent la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, et des enzymes du cycle ascorbate-glutathion.

1.2.2.7. Régulation de croissance

Maintenir une croissance racinaire constitue un caractère adaptatif dans un environnement de faible disponibilité en eau tel que le milieu salin. L'allongement racinaire peut être dû à une augmentation d'activité des enzymes impliquées dans la construction du cytosquelette: par exemple la xyloglucan endotransglycosylase (Wu *et al.* 1994). L'autre cause peut être l'accumulation de proline (Ober et Sharp 1994). Ces deux actions sont régulés par l'acide abscissique (ABA), qui est induit par le stress salin (Jia *et al.* 2002)). Ainsi chez le maïs, l'élongation racinaire est inhibée par la présence d'un inhibiteur de biosynthèse d'ABA. Mais elle peut être restaurée par un traitement des racines avec un inhibiteur de synthèse d'éthylène. Ces données suggèrent que l'élongation racinaire par l'intermédiaire de l'ABA doit être causé par une inhibition de biosynthèse d'éthylène (Spollen *et al.* 2000).

Chez *Arabidopsis*, les régulations de la division cellulaire et de l'élongation cellulaire sous stress salin sont effectuées par l'intermédiaire de l'ABA (Wang *et al.* 1993). Cependant le mécanisme exact de cette régulation est encore mal connu.

1.2.3. Limites de la physiologie

La tolérance au sel est un caractère complexe, qui fait intervenir de nombreux mécanismes chez les plantes. Plusieurs auteurs ont suggéré que la tolérance au sel ne peut être obtenue que par une pyramidisation de différents caractères, et chacun des caractères isolés ne confère pas une tolérance au sel (Yeo *et al.* 1990; Flowers 2004). Cependant, chez *Arabidopsis* (Apse *et*

al. 1999) et la tomate (Zhang et Blumwald 2001), la surexpression d'un seul gène codant pour un antiport Na^+/H^+ a montré une amélioration de la tolérance au sel.

I.3. Les légumineuses et la salinité

I.3.1. Le niveau de tolérance des légumineuses

La réponse des légumineuses au sel varie énormément. Zahran (1991) a reporté la variabilité de tolérance au sel des espèces cultivées qui vont de sensibles (ex haricot, pois chiche et le pois) à modérément tolérantes à la salinité (ex : soja).

I.3.2. Effet du sel sur la symbiose fixatrice d'azote

L'amélioration de la productivité des légumineuses dans les zones salines nécessite l'installation d'une symbiose tolérante. Cette approche implique une amélioration génétique des deux partenaires de la symbiose. En condition de symbiose, la situation est plus complexe puisqu'elle implique deux partenaires très différents. Les rhizobium ont une gamme de tolérance au sel beaucoup plus élevée que celle de sa plante hôte (Zahran 2001), certains sont inhibés par une concentration de 100 mM, alors que d'autres comme *S. meliloti* sont tolérants jusqu'à 300–700 mM NaCl (Mohammad *et al.* 1991; Muller et Pereira 1995).

La salinité affecte l'initiation, le développement et le fonctionnement des nodules, de même que la capacité photosynthétique des feuilles. Il s'avère que la FSN (Fixation Symbiotique de l'Azote) est plus affectée par le sel que la croissance des plantes (Rao *et al.* 2002). Généralement l'activité des nodules est plus touchée par le sel que la nodulation, mais l'étape la plus sensible à la présence du sel est le processus infectieux (Payakapong *et al.* 2006).

Mais il ne faut pas oublier que la tolérance au sel chez les légumineuses dépend à la fois des 2 partenaires (Laranjo *et al.* 2002). Cependant quelques légumineuses comme *Lens culinaris* forment une symbiose efficace tolérante au sel avec une sélection de souches de *Rhizobium* spp. isolée à partir de la lentille (Rai et Singh 2000).

L'exploration de la diversité de réponse au sel, permettrait non seulement d'identifier des lignées tolérantes mais aussi de déterminer les caractères utilisables pour une amélioration génétique de la tolérance au sel.

En symbiose, la tolérance de la plante hôte constitue un facteur déterminant de la tolérance au sel (Soussi *et al.* 1998).

II. Matériel & Méthodes

II.1. Système de culture

Le choix était de faire une culture *in vitro* dans des tubes en verre et sur un milieu de culture Fahraeus (Vincent 1970). Le volume du milieu de culture est de 20 ml, contenant ou non 3mM de KNO₃ selon les conditions à tester et additionné de l'Agar à une concentration de 15 g/l. Les graines sont désinfectées en surface par action de l'acide sulfurique et l'hypochlorite de sodium (Tirichine *et al.* 2000).

Les tubes sont placés dans une chambre climatisée pendant 8 semaines. Dans cette chambre de culture, nous travaillons en jours longs, soit 16 heures de jour et 8 heures de nuit. La température de jour est de 21°C. L'hygrométrie n'est pas contrôlée: elle reste stable à 90% la nuit et descend jusqu'à 65% le jour. Les tubes sont fermés avec des bouchons en éponge permettant une aération suffisante des plantules.

II.2. Inoculation des plantes

Les bactéries sorties de la conservation sur glycérol, sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu YEM (Vincent 1970) gélosé. Cette préparation est incubée pendant 48 heures dans une chambre de culture à 37°C et à l'obscurité. Un inoculum se fera par la suite avec le milieu YEM liquide par introduction d'une colonie de Rhizobium. Celui ci est incubé pendant 48 heures dans la chambre de culture. Cet inoculum est distribué par la suite par quantité de 300 microlitres dans les tubes contenant les plantules après 2 jours de leur mise en tube.

II.3. Matériel biologique

Cette partie a concerné 7 lignées de différentes origines:

* Des lignées de référence: Jemalong, DZA 45.5, DZA 315.16, F83005.5 (notée F83.5) et A20

* Des lignées originaires de sols salins: TN8.3, TN8.15, TN8.20 (Aydi *et al.* 2004), TN8.25, et TN1.11

* une lignée provenant de sol non salin : TN6.18 (Aydi *et al.* 2004)

Des souches bactériennes utilisées pour l'inoculation sont incubées dans un milieu YEMA pendant 48 h à 25°C. Ces souches sont de différentes origines :

* 2 souches de référence 2011 (Capela *et al.* 2001) et ABS7 (Bekki *et al.* 1987)

* 5 souches provenant de sols salins : 4 d'Enfidha (E2, E5, E6, E8) et une de Soliman (SII4) (Zribi *et al.* 2004)

* 2 souches tunisiennes d'origine sols non salins : El Kef (KIII8) et Bulla Régia (B8)

* 3 souches provenant d'une collection russe (O. Kurchak, communication personnelle) (AK36, AK57, AK107) et ces souches proviennent à notre connaissance de sols extrêmement salins.

II.4. Caractères relevés

Les conditions expérimentales ne permettent pas de relever les caractères liés à la croissance racinaire de *M. truncatula*. En effet le milieu additionné de l'Agar réduit la croissance racinaire, ainsi que la limitation de l'espace disponible dans le tube. La racine, au contact du fond du tube, s'enroule et forme une masse de racines enchevêtrées. Cependant, un dénombrement et un suivi d'apparition des nodules sont possibles. Pour la partie aérienne, les paramètres mesurés concernent la longueur des tiges et leur matière sèche après séchage pendant 48 heures à 65°C. On calcule un pourcentage des paramètres de croissance de la plante en présence de sel par rapport au témoin sans sel.

Le paramètre T50 qui correspond à la concentration de sel à partir de laquelle on a 50% d'inhibition de croissance. Il nous permet de comparer l'effet du sel sur les différentes lignées étudiées et sur les différents traits de croissance notés.

II.5. Analyses statistiques :

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel Statistica (version 5.1). Les modèles proposés pour l'analyse de variance sont analysés par une Procédure GLM (General Linear Model). La significativité de la différence des moyennes est testé par le test SNK (Student-Newman-Keuls test).

III. Tolérance au sel de différentes lignées de *M. truncatula*

Dans cette partie, nous analyserons séparément la croissance et la tolérance au sel de lignées de référence ou provenant des populations naturelles sous deux conditions d'alimentation, nitrate ou ammoniacale via la symbiose fixatrice d'azote. Dans un premier temps, nous avons évalué les capacités intrinsèques de croissance des lignées en absence d'alimentation azotée: cette donnée nous permettra de mieux estimer l'aptitude des lignées à utiliser l'azote, assimilé ou fixé, pour leur croissance.

Deux caractères seront pris en compte: l'allongement des tiges et la masse sèche aérienne (MSA).

Capacité de croissance intrinsèque des lignées :

Les plantes poussent en premier temps sur leurs réserves azotées contenues dans les graines. Les lignées naturelles ont des masses de graines variables et, en conséquence, ont une croissance influencée par ce paramètre. Il faut donc connaître l'effet de cette réserve afin d'estimer, entre autres, l'efficacité de la fixation de l'azote. La figure 17 représente la croissance de 10 lignées à partir de leurs réserves cotylédonaire. On constate que la lignée de référence A20 est la plus vigoureuse et produit le plus de matière sèche. La majorité des lignées ont une matière sèche comprise entre 8 et 12 mg/plante. Seule la lignée TN6.18 montre une faible croissance de 5 mg/plante, c'est une plante relativement faible en croissance.

Ce facteur de variabilité doit être pris en compte par la suite pour les réponses à différents ajouts d'azote ou de sources de stress dans les milieux de culture.

Pour cette raison certains paramètres, comme l'efficacité de fixation de l'azote (EFA) et l'efficacité d'assimilation de l'azote (EAA), tiennent compte de la valeur témoins (en absence de source d'azote) de chaque lignée.

Le caractère allongement n'est pas pris en compte puisque la carence azotée bloque l'allongement des tiges

III.1. Croissance sous alimentation en KNO₃

Une gamme de 7 concentrations de NaCl (0, 15, 30, 45, 60, 75 et 90 mM) a été appliquée à 7 lignées de référence de *M. truncatula* cultivées dans des tubes sur milieu Faraheus additionné de 3 mM de KNO₃.

Pour chaque caractère, nous analyserons d'abord la diversité en l'absence de stress puis l'impact de l'application du stress.

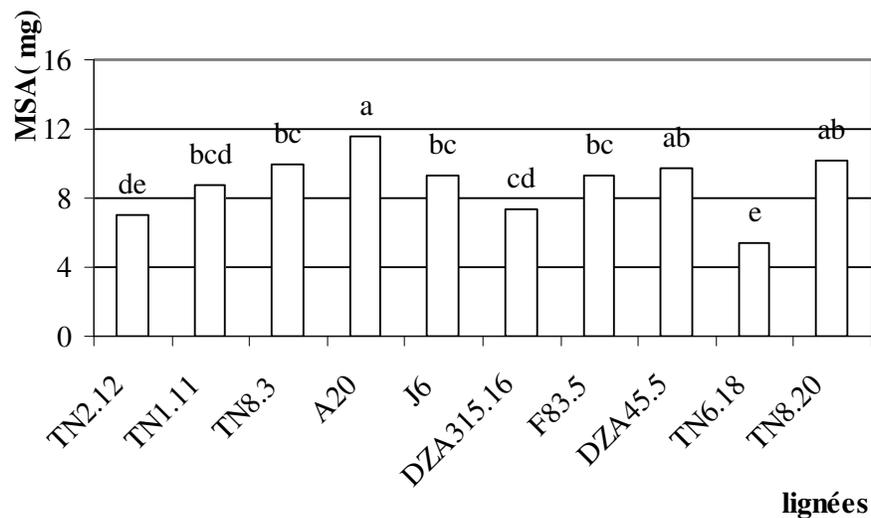
III.1.1. Matière sèche des parties aérienne

Comparaison entre lignées pour une concentration de sel déterminée:

Le Tableau 12 donne les valeurs absolues de MSA en fonction de la concentration en NaCl. Le Tableau 14 donne les valeurs d'efficacité d'assimilation de l'azote (EAA). Ce paramètre est représentatif de la capacité de la lignée à utiliser l'azote disponible dans le milieu de culture:

$$\text{EAA} = \frac{\text{MSA traitement}}{\text{MSA témoin sans azote}}$$

Figure 17: Matière sèche aériennes des lignées sans ajout d'une source d'azote dans le milieu de culture



La significativité des différences est testée par un test de Duncan (1%)

Tableau 12: Valeurs de la matière sèche aériennes des lignées sans ajout d'une source d'azote dans le milieu de culture

M: Moyenne; IC: Intervalle de Confiance au seuil de 5 %

Lignée	TN2.12	TN1.11	TN8.3	A20	J6	DZA315.16	F835.5	DZA45.5	TN6.18	TN8.20
M	6.98	8.79	9.93	11.60	9.29	7.36	9.30	9.73	5.37	10.21
IC	1.07	1.89	0.89	1.87	1.35	0.87	1.20	1.47	0.57	1.30

Diversité en absence de stress

On constate que la diversité est faible dans ces conditions puisque les 7 lignées appartiennent à seulement 2 classes de significativité avec une faible différence de masse (environ 6,5 mg).

Par contre, la prise en compte des réserves (EAA) révèle des différences importantes entre lignées puisque DZA315.16 augmente sa masse par un facteur 5 alors que A20 seulement d'un facteur 3.

Diversité de l'effet du stress

On constate une diversité de réponse au sel selon les lignées. Les lignées sont également regroupées en 2 classes mais avec une différence importante d'environ 14,5 mg à la concentration de 90mM. Seules les lignées DZA315.16, TN1.11 et TN8.3 conservent une croissance par rapport au contrôle à la concentration la plus sévère de 90 mM NaCl. Cela n'est pas surprenant pour les lignées tunisiennes qui proviennent de sols salins par contre le résultat de DZA315.16 est douteux car le point à 90mM semble faux.

Y a-t-il une Corrélation entre MSA des traitements et le contrôle sans sel ?

La corrélation entre le contrôle et les différents traitements est significative au seuil de 1%, et de signe positif. Cela signifie que pour les 6 concentrations de sel appliquées, le comportement des lignées est dépendant du contrôle sans sel.

Comparaison par lignée entre différentes concentrations de sel :

D'après la figure 18, la chute de la matière sèche aérienne devient significative à 60 mM sauf pour DZA45.5, laquelle est fortement touchée par rapport au témoin à partir de 45 mM.

La lignée TN1.11 est la seule qui garde, en moyenne, une MSA non influencée par la présence du sel. Néanmoins on note pour cette lignée une large variance entre les répétitions, ce qui donne un large intervalle de confiance.

On remarque pour la quasi-totalité des lignées, que des très faibles concentrations de sel comme 15 mM, entraînent une légère augmentation de MSA par rapport au témoin. Ceci reste à vérifier avec un nombre plus important de répétitions.

III.1.2. Longueurs des tiges

Diversité en absence de stress

D'après le Tableau 13, il est net qu'une importante diversité existe en ce qui concerne la longueur des tiges puisque les données sont réparties en 5 classes avec des longueurs allant 10,5 cm (F83.5) jusqu'à 16,5 cm (TN1.11). Nous verrons au chapitre 3 que cette diversité a été exploitée pour déterminer les bases génétiques de l'allongement des tiges en utilisant le couple Jemalong x F83.5.

Diversité de l'effet du stress

Il est remarquable de constater que l'allongement de la tige est affecté pour des concentrations en sel plus faibles que pour la MSA avec une diminution marquée pour toutes les lignées dès 30mM. A 90mM, seule la lignée TN1.11 s'allonge encore significativement. La figure 19 représente l'effet de la salinité sur l'allongement de la tige et met en évidence une nette diversité de réponse selon les lignées. Pour la majorité des lignées le 50% d'inhibition est obtenu à 30 mM de sel, seule la lignée TN1.11 est inhibée à 50% par la concentration de 60 mM. La forte tolérance de TN1.11 est probablement due seulement en partie au fait que cette lignée provient de la population Enfidha qui croit sur un sol salin puisque la lignée TN8.3, origine elle aussi d'un sol salin, est moins tolérante. La lignée A20 est particulièrement sensible à la salinité.

III.1.3. Efficacité d'utilisation de l'azote minéral

Ce paramètre est représentatif de la capacité de la lignée à utiliser l'azote disponible dans le milieu de culture (tableau 14).

EAA = MSA traitement / MSA témoin sans azote

En comparant les lignées pour chaque concentration de sel, on remarque une variabilité de comportement. Seule la lignée DZA315.16 utilise au mieux l'azote disponible pour l'ensemble des concentrations de sel. A 90 mM de NaCl, DZA 315.16 et TN1.11 utilisent l'azote efficacement. Pour J6, la concentration de 90 mM est très sévère et fait chuter l'EAA brutalement.

A partir de 60mM de sel, les deux lignées tunisiennes TN1.11 et TN8.3 commencent à se distinguer. TN 1.11 d'Enfidha est plus efficace pour l'assimilation de l'azote en présence de fortes concentrations de sel.

Tableau 13: Matière sèche aérienne (mg/plante) pour des lignées de *M. truncatula* cultivées en présence d'azote minéral et de différentes concentrations de sel.

		Concentration en sel													
		0		15		30		45		60		75		90	
Lignées	J6	33.92	ab	35.53	c	33.94	ab	32.84	a	26.15	a	26.5	a	13.6	b
	F835.5	32.34	b	30.44	d	28.81	bc	25.19	b	14.96	b	13.48	c	12.97	b
	A20	34.51	ab	40.94	a	29.17	bc	29.54	ab	22.93	a	20.63	abc	9.833	b
	DZA315.16	37.57	a	37.87	abc	32.81	abc	27.64	b	16.21	b	17.62	bc	20.79	a
	DZA45.5	34.99	ab	39.9	ab	32.5	abc	20.56	c	16.6	b	13.46	c	12.64	b
	TN1.11	30.98	b	41.48	a	27.25	c	33.82	a	25.23	a	24.18	ab	24.35	a
	TN8.3	35.34	ab	36.41	bc	35.98	a	33.52	a	22.44	a	20.36	abc	20.38	a

Les lettres représentent un test de significativité SNK (au seuil de 1%) comparant les lignées pour chaque concentration de sel.

Tableau 14: Longueur des tiges pour des lignées de *M. truncatula* cultivées en présence d'azote minéral et de différentes concentrations de sel.

		Concentration en sel													
		0		15		30		45		60		75		90	
Lignées	J6	15.39	ab	15.13	b	11.95	a	7.57	b	2.55	b	1.61	b	0.80	c
	F835.5	10.50	e	6.75	d	3.10	c	1.81	d	1.00	d	1.00	bc	0.50	c
	A20	12.95	cd	15.14	b	2.70	c	0.94	d	1.00	d	0.50	c	0.50	c
	DZA315.16	14.30	bc	13.35	b	9.39	ab	4.40	c	1.38	cd	1.20	b	1.19	b
	DZA45.5	14.25	bc	9.50	c	6.94	b	1.40	d	0.81	d	0.50	c	0.50	c
	TN1.11	16.55	a	17.50	a	9.50	ab	12.20	a	5.88	a	4.38	a	4.33	a
	TN8.3	11.72	de	10.19	c	8.80	ab	4.25	c	1.85	c	1.40	b	1.10	b

Les lettres représentent un test de significativité SNK (au seuil de 1%) comparant les lignées pour chaque concentration de sel.

Figure 18: Pourcentage d'inhibition de la matière sèche aérienne sous alimentation azotée pour chaque lignée étudiée à 15, 30, 45, 60, 75 et 90mM de sel.

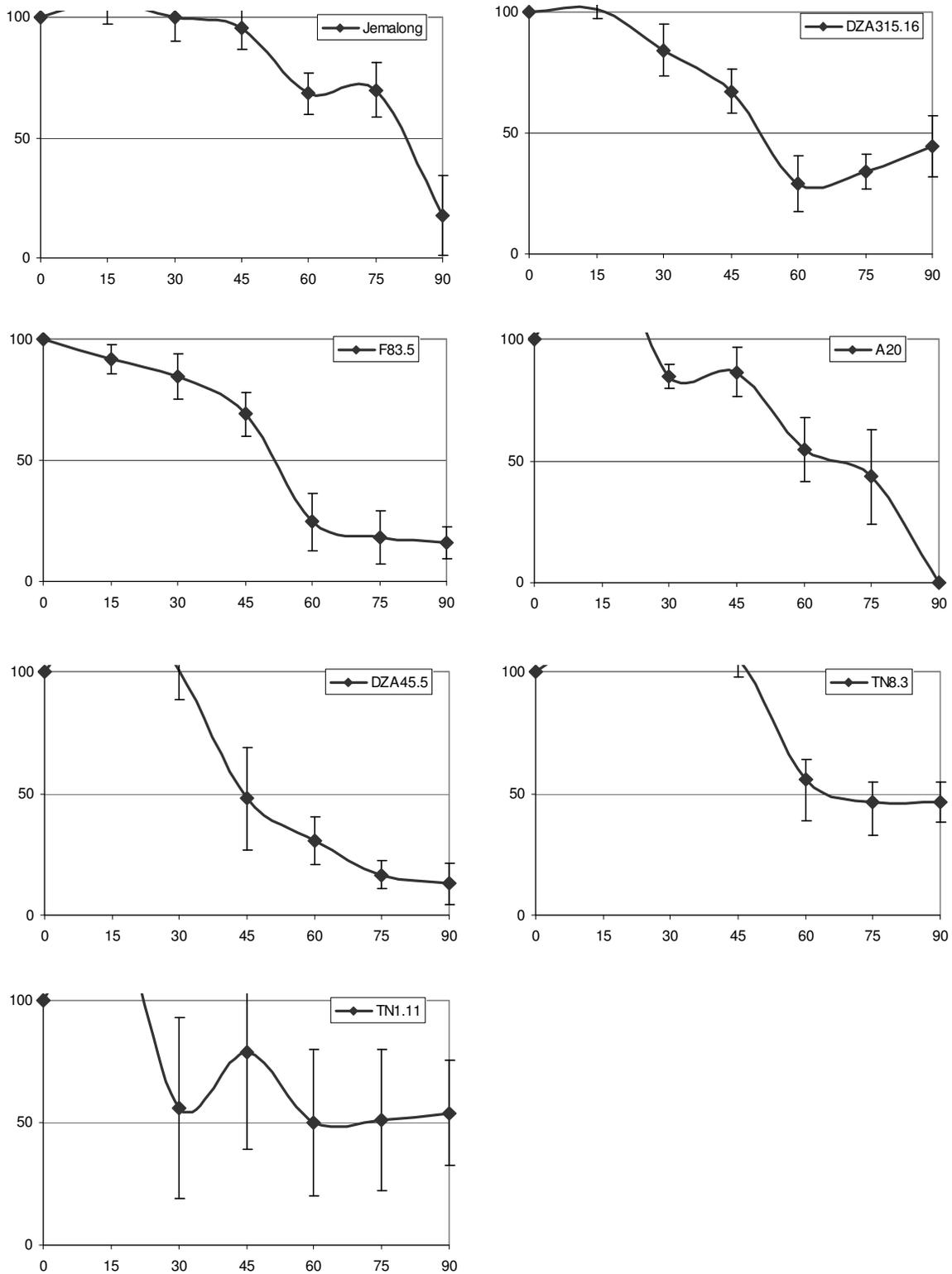


Figure 19 : Pourcentage d'inhibition de l'allongement des tiges sous alimentation azotée pour chaque lignée étudiée à 15, 30, 45, 60, 75 et 90 mM de sel.

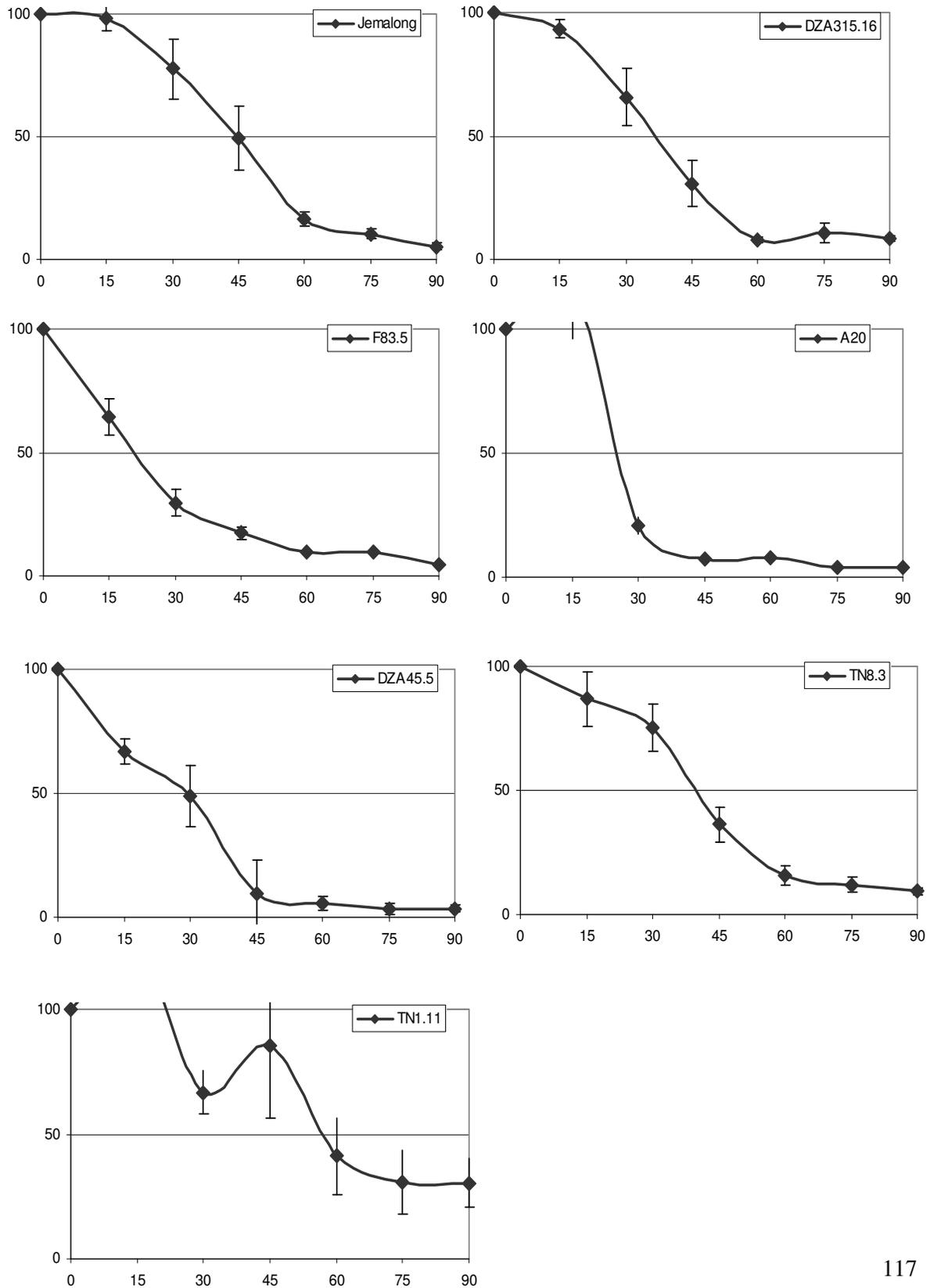


Tableau 15: EAA pour des lignées de *M. truncatula* en présence d'azote minéral et de différentes concentrations de sel.

		Concentration en sel							
		0	15	30	45	60	75	90	
Lignées	J6	3.65 b	3.82 cd	3.65 b	3.54 a	2.81 a	2.85 a	0.31 d	
	F835.5	3.48 b	3.27 e	3.10 b	2.71 b	1.61 b	1.45 c	1.39 c	
	A20	2.98 c	3.53 de	2.51 c	2.55 bc	1.98 b	1.78 bc	0.85 c	
	DZA315.16	5.10 a	5.15 a	4.46 a	3.76 a	2.20 ab	2.39 ab	2.76 a	
	DZA45.5	3.60 b	4.10 c	3.34 b	2.11 c	1.70 b	1.38 c	1.30 c	
	TN1.11	3.53 b	4.72 b	3.10 b	3.85 a	2.87 a	2.75 a	2.77 a	
	TN8.3	3.56 b	3.67 de	3.62 b	3.37 a	2.26 ab	2.05 bc	2.05 b	

Les lettres représentent un test de significativité SNK (au seuil de 1%) comparant les lignées pour chaque concentration de sel.

III.1.4. Comparaisons entre les paramètres analysés

Selon les expériences menées dans cette partie, il ressort que la concentration qui affecte les lignées de *M. truncatula* pour la MSA est de 60 mM de NaCl, mais par contre elle est de 45 pour le paramètre LT (Tableau 16).

Pour chaque paramètre, Le comportement des lignées en appliquant du sel va dans le même sens que le contrôle sans sel. Cela signifie que la réponse des lignées aux différentes concentrations de sel est dépendante de leur comportement en conditions contrôles.

Les paramètres MSA et LT sont corrélés positivement pour l'ensemble des lignées et pour les 6 concentrations de sel. Ce n'est qu'en absence de sel que la corrélation est non significative. L'analyse de variance montre qu'il y a un effet sel et un effet lignée significatifs (au seuil de 1%) pour les deux paramètres LT et EAA et seulement un effet sel significatif pour le paramètre MSA.

Le paramètre LT (longueur des tiges) est très vite influencé par le sel. On observe un raccourcissement des entre-nœuds à faibles concentrations de sel. Ce caractère n'est pas assez renseignant de l'effet du sel sur les lignées. La MSA est un bon caractère de discrimination entre les différents traitements et lignées.

L'EAA est relativement utile, mais à lui seul ne renseigne pas sur le rendement des cultures. En effet une plante peut multiplier plusieurs fois sa faible MSA initiale sans sel, mais en restant toujours de faible rendement.

Tableau 16: Concentrations de sel donnant 50% d'inhibition pour les différentes lignées et pour les paramètres: longueur des tiges et MSA sous alimentation azotée minérale.

	Longueur des tiges	MSA
J6	45	90
A20	30	60
DZA315.16	45	60
DZA45.5	45	45
F83.5	30	60
TN1.11	60	60
TN8.3	45	60

III.2. En symbiose

La situation est plus complexe que dans le cas de l'assimilation car dans le cas de la symbiose deux paramètres interagissent: d'une part l'efficacité de la fixation elle-même en fonction de la lignée végétale et de la souche bactérienne et d'autre part l'impact du stress sur cette fixation.

Plusieurs expériences ont été faites pour lesquelles, malheureusement, le nombre de lignées et de souches n'était pas identique à chaque fois ce qui nous empêche de faire une synthèse de toutes les conditions. Nous présenterons donc une série d'expériences.

III.2.1. Diversité symbiotique naturelle

La diversité symbiotique naturelle ne se réduit pas à la seule efficacité mais peut être décomposée en plusieurs niveaux: vitesse de nodulation, nombre des nodules, efficacité des nodules, morphologie des nodules...

En condition contrôle, la figure 20 représente la diversité de cinétique de nodulation de 9 lignées de référence inoculées avec la seule souche *Sinorhizobium meliloti* 2011. On constate que toutes les lignées ont nodulé à la date de 15 jours, mais présentent des cinétiques différentes. La plupart ont atteint un plateau de nodulation au bout de 30 jours tandis que Jemalong, TN8.20 et TN6.18 continuent la formation de nouveaux nodules. Jemalong produisant le plus grand nombre de nodules par plante (12).

III.2.2. Impact du sel sur la symbiose : exemple de la souche 2011

Dans cette partie un nombre total plus élevé de lignées a été étudié: 10 lignées dont 4 de référence et 6 locales. L'inoculation est faite avec la souche *Sinorhizobium meliloti* de référence 2011.

Effet du sel sur la nodulation:

La figure 21 montre que jusqu'à 15 mM de NaCl le nombre de nodules produit n'est pas très variable entre les différentes lignées analysées. Mais à partir de 30 mM de sel, une diversité de réponse de nodulation commence à ressortir entre les lignées. Généralement, pour ces lignées étudiées, la présence du sel dans le milieu de culture n'affecte pas de façon significative le nombre de nodules produit par plante avec seulement une tendance à l'augmentation du nombre de nodules jusqu'à 60 mM puis une diminution par la suite. Seules les lignées F83005.5 et TN6.18 semblent rapidement affectées par le sel et diminuent le nombre de nodules. La nodulation de la lignée TN6.18 est très sensible au sel, elle devient

Figure 20: Diversité naturelle de nodulation de différentes lignées de *M.truncatula* avec la souche 2011 en conditions contrôle.

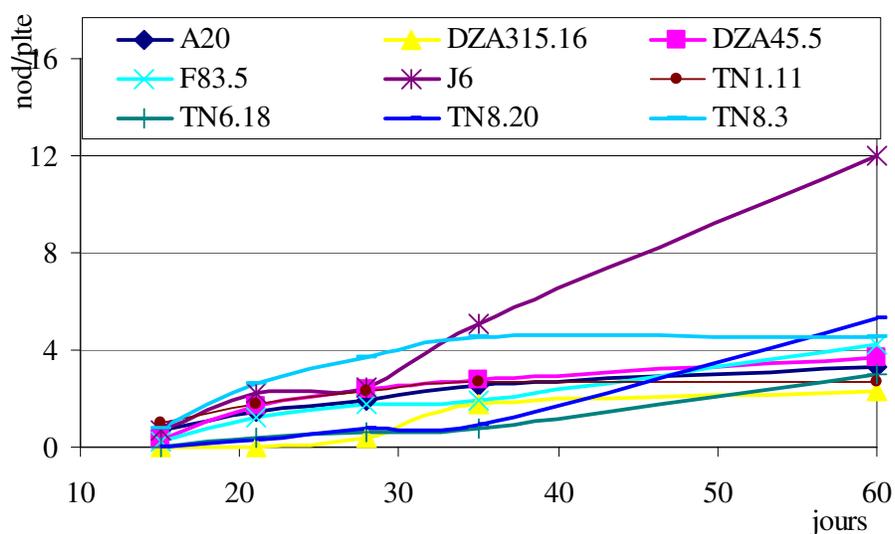


Tableau 17: Données concernant le nombre de nodules à 60 jours, la longueur des tiges (mm) et la matière sèche aérienne (mg) des lignées de *M.truncatula* en symbiose avec la souche 2011 et en absence de sel.

Lignées	Nodules à 60 jours		L.tiges		MSA	
	Moyenne	E.T	Moyenne	E.T	Moyenne	E.T
A20	3.29	1.70	13.57	1.43	34.51	4.35
DZA315.16	2.75	1.49	11.81	1.10	36.43	4.00
DZA45.5	3.67	2.50	11.17	2.56	29.30	9.08
F83.5	4.20	0.84	8.00	2.60	25.66	6.27
J6	12.00	4.55	10.14	1.80	25.54	3.19
TN1.11	2.67	1.12	15.17	2.63	29.89	7.10
TN6.18	3.00	1.00	1.00	0.00	17.70	4.70
TN8.20	5.33	3.21	13.33	0.58	24.80	2.70
TN8.3	4.56	1.59	12.11	1.22	30.06	4.99

E.T : représente l'écart type

absente à 45 mM de sel. Jusqu'à 75 mM de sel la lignée A20 produit le plus de nodules par rapport aux autres lignées. La lignée F83005.5 diminue son nombre de nodules à partir de 45 mM et la lignée TN8.25 montre le même comportement à 75 mM. La concentration de 90 mM s'avère assez forte pour l'ensemble des lignées, avec une forte inhibition de la nodulation. A 90 mM de sel, la lignée DZA315.16 présente une grande variance entre les répétitions.

La figure 23 montre la cinétique de nodulation en présence de 60 mM de NaCl. Ce qu'on peut remarquer par rapport aux témoins sans sel c'est le retard de la nodulation pour l'ensemble des lignées puis ensuite les cinétiques sont semblables au contrôle.

La comparaison visuelle de l'aspect des nodules révèle une diminution de la taille et voir même une coloration blanchâtre des nodules. Cette couleur témoigne de la diminution de l'efficacité de fixation de l'azote au niveau des nodules ainsi que nous le verrons plus loin.

Effet du sel sur la Longueur des tiges:

La figure 24 montre que la présence de NaCl dans le milieu entraîne une forte diminution de la longueur des tiges ainsi que nous l'avons montré en conditions non symbiotiques.

L'inhibition de l'allongement des tiges dépasse le seuil de 50% pour les lignées J6, TN6.18, F83.5 et DZA315.16 à partir de 45 mM de NaCl. Pour les autres lignées, la concentration de 75 mM est inhibitrice à plus de 50% pour ce caractère.

On peut en conclure que 60 mM peut être discriminante pour le caractère allongement des tiges entre lignées pour avoir une idée du niveau de leur tolérance au sel.

Matière sèche des parties aériennes

La figure 25 permet de se rendre compte que la MSA est moins affectée par la présence de NaCl que la longueur des tiges.

Efficiéce de fixation d'azote

Ce paramètre est représentatif de la capacité de la lignée à fixer l'azote atmosphérique en association avec la souche symbiotique.

$$\text{EFA} = \text{MSA en symbiose} / \text{MSA témoin}$$

Figure 21: Nombre de nodules par plante à 60 jours pour les différentes lignées de *M. truncatula* en absence de sel et en présence de 15, 30, 45, 60, 75 et 90 mM de sel.

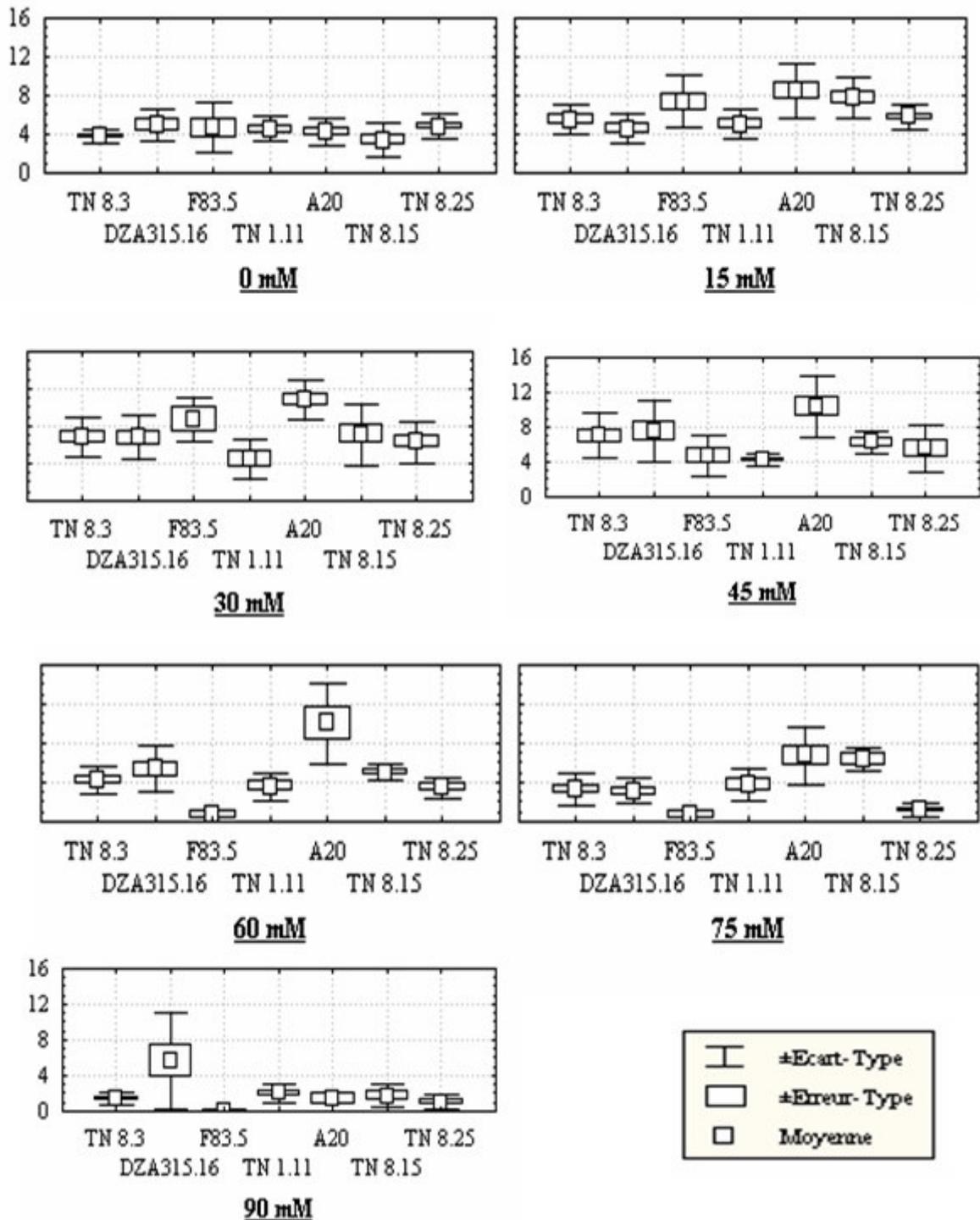


Figure 22: Pourcentage de nodulation à 60 jours après inoculation par rapport au témoin pour chaque lignée inoculée par la souche 2011 et à différentes concentrations de sel

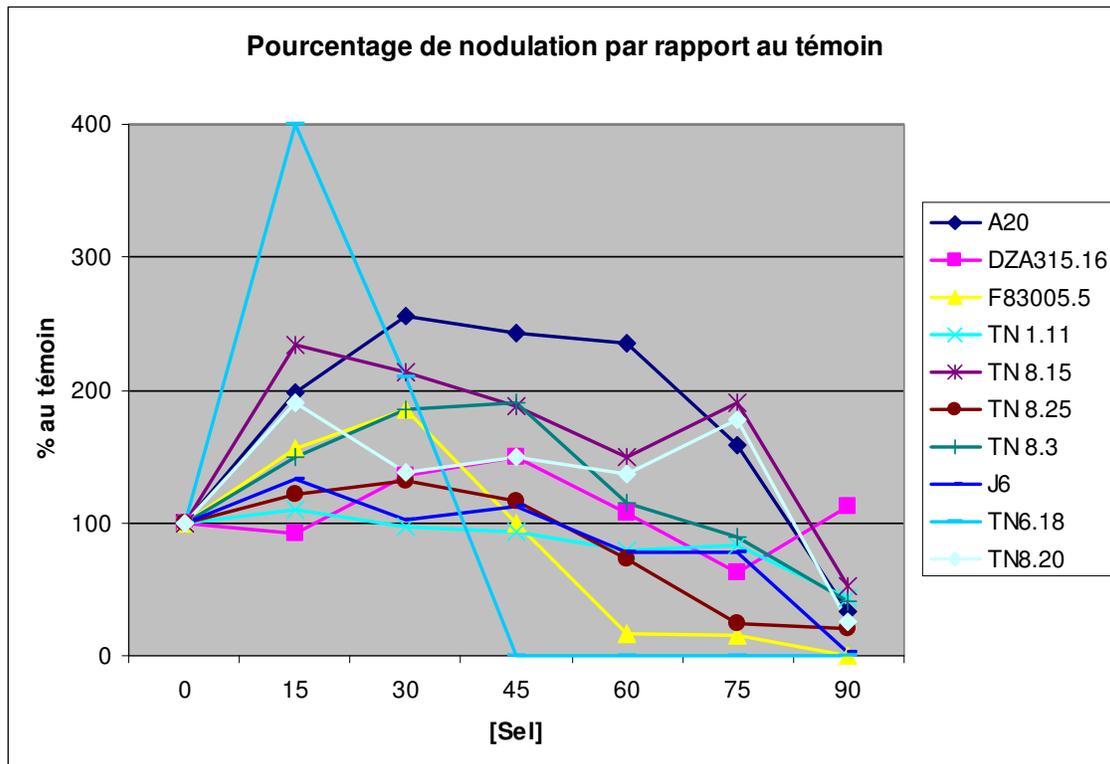


Figure 23: Effet du sel (60 mM de NaCl) sur la cinétique de nodulation des différentes lignées de *M.truncatula* par la souche 2011 en fonction du temps.

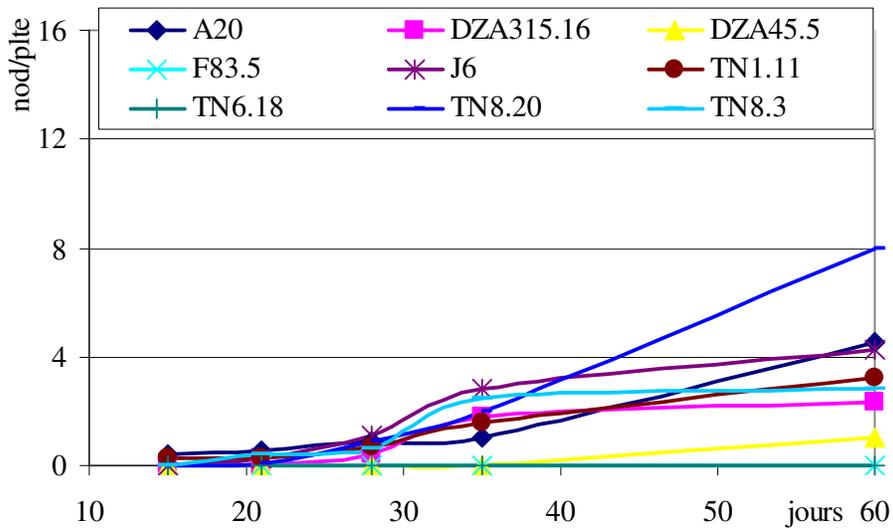
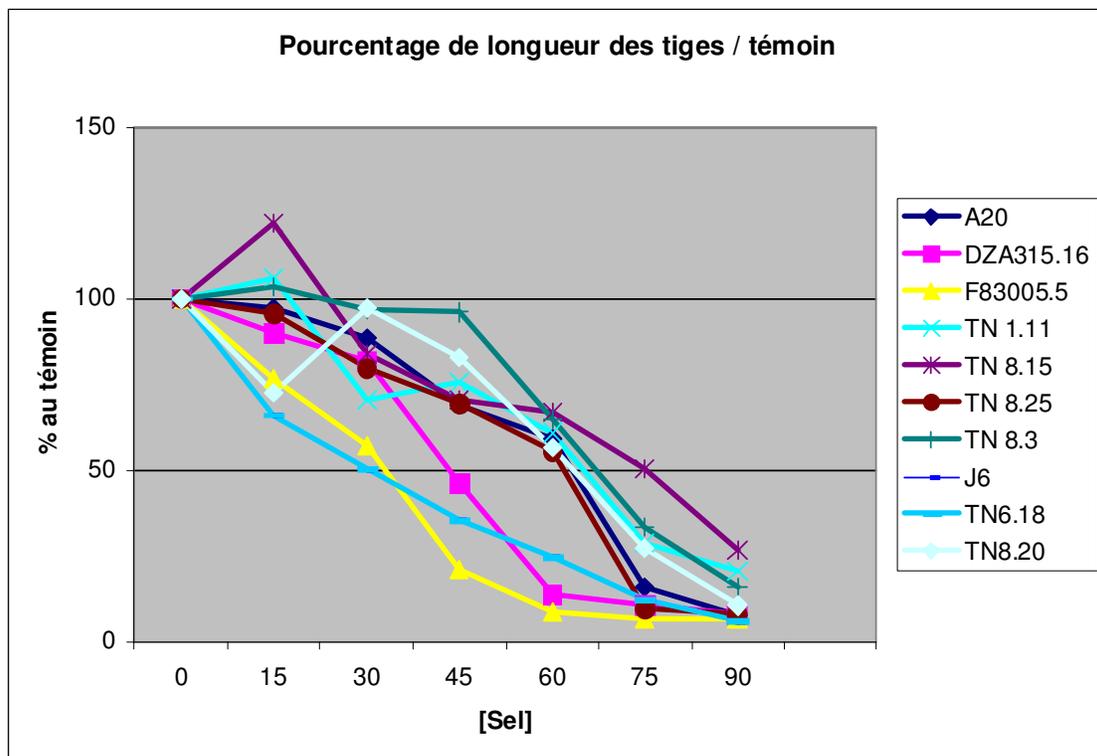
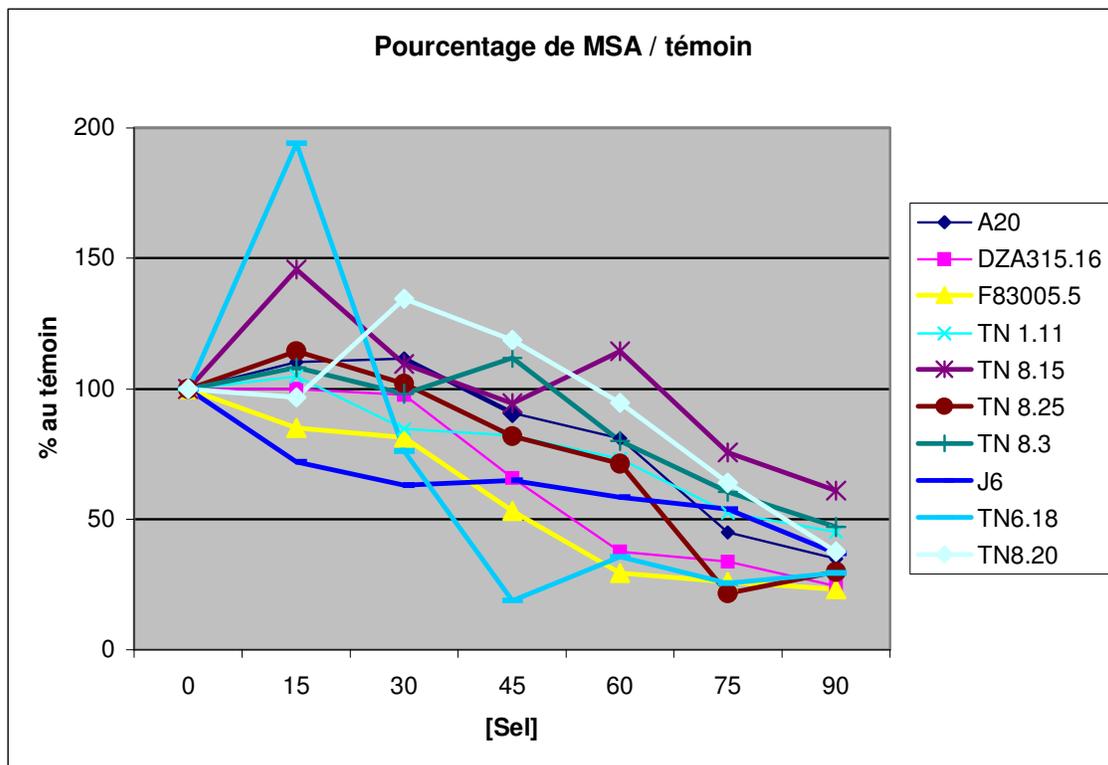


Figure 24: Pourcentage de longueur des tiges par rapport au témoin pour chaque lignée inoculée par la souche 2011 et à différentes concentrations de sel.



On note que la courbe correspondante à J6 coïncide avec celle de TN6.18.

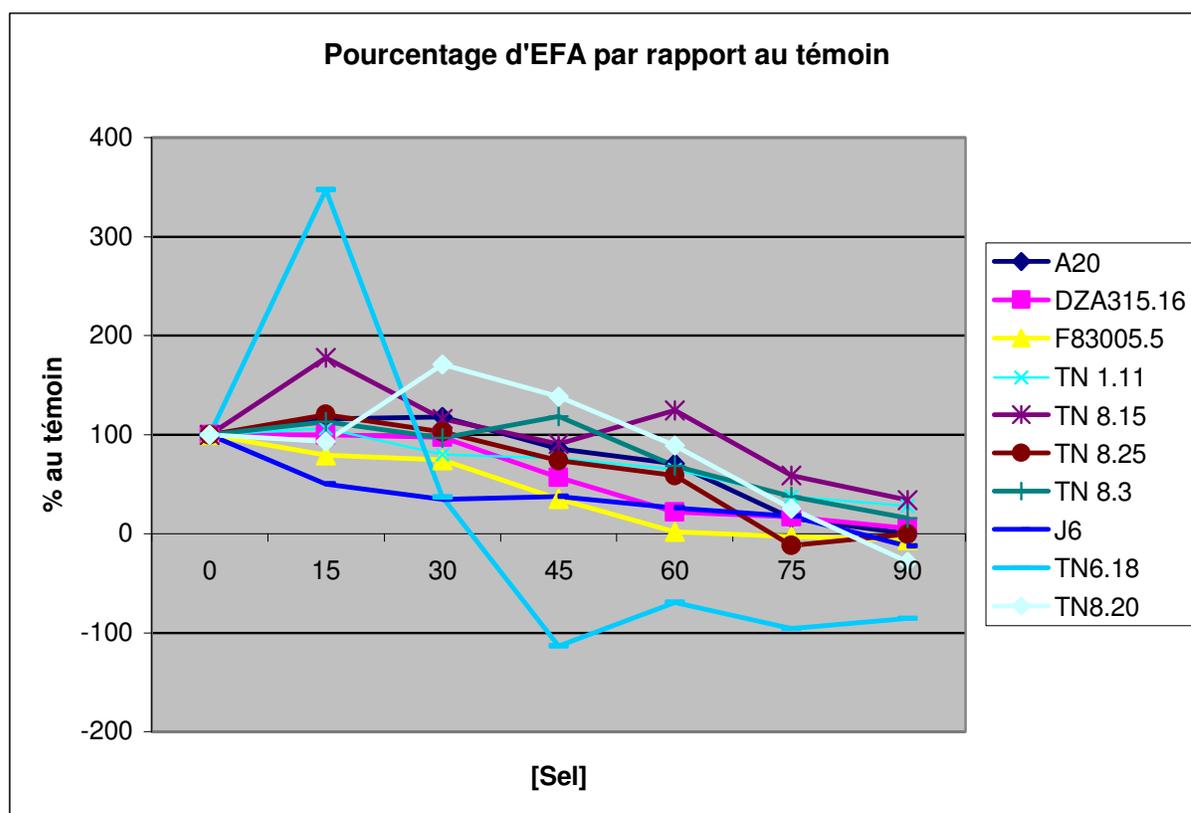
Figure 25: Pourcentage de matière sèche aérienne par rapport au témoin (sans sel) pour chaque lignée inoculée par la souche 2011 et à différentes concentrations de sel



Pour ce paramètre (Figure 26) on remarque qu'à faible concentration (15mM) il y a une forte augmentation de l'EFA pour la lignée TN6.18 puis la chute est brutale. En effet cette lignée est non efficiente avec la souche 2011.

➤ On ressort de ces différentes comparaisons, que la concentration de 60 mM de NaCl est la meilleure pour pouvoir discriminer un ensemble de lignées de *M. truncatula* pour leur comportement en présence de sel en conditions symbiotiques avec la souche 2011. Cette concentration n'est pas trop sévère pour la croissance de la plante et permet en même temps de bien distinguer entre lignées sensibles et lignées plus ou moins tolérantes au sel.

Figure 26: Pourcentage du paramètre EFA par rapport au témoin pour chaque lignée en symbiose avec la souche 2011 et à différentes concentrations de sel



III.2.3. Impact du sel sur la symbiose : Etude de la combinaison lignée * sel

Une question de base dans les études sur la symbiose est: « quel est le partenaire critique? La plante ou la bactérie ? ». Les facteurs: lignée, différentes concentrations en sel et l'interaction entre les deux constituent des facteurs influençant significativement la variance totale des paramètres étudiés (Tableau 18). Cependant l'effet le plus fort est attribué aux concentrations de sel.

On remarque que l'effet du facteur sel est le plus fort pour le caractère longueur des tiges. Ceci est bien perceptible dès les plus faibles concentrations de sel.

III.3. Variation de la tolérance des lignées de *M. truncatula* en fonction de la source d'alimentation azotée

On a procédé à une comparaison entre les deux modes de nutrition azotée en se basant sur le paramètre I50 (Tableaux 16 et 19). Pour les lignées utilisées la concentration I50 est différente selon le paramètre mesuré. Cette concentration est plus élevée pour la MSA par rapport à la longueur des tiges. De même ces lignées sont plus tolérantes à la présence du sel dans le milieu sous alimentation azotée qu'en conditions symbiotiques avec la souche 2011.

En symbiose les lignées locales ont des I50 plus faibles que celles de référence, montrant qu'elles sont plus performantes en présence de sel. Il faut signaler que les lignées locales (sauf TN6.18) utilisées sont d'origine provenant de sols salins.

III.4. Analyse de plusieurs lignées inoculées par plusieurs souches de *Rhizobium*

Dans cette partie, nous avons compliqué la situation puisque plusieurs lignées végétales ont été inoculées avec 5 souches rhizobiales:

* Deux souches de référence *S. medicae* ABS7(Bekki *et al.* 1987) et *S. meliloti* 2011 qui est complètement séquencée (Galibert *et al.* 2001).

* Trois souches locales ayant pour origines sols salins: E6 et E8 provenant d'Enfidha et SII4 provenant de Soliman.

Tableau 18: Décomposition de la variance pour les 3 caractères: Nodulation, allongement des tiges et matière sèche aérienne (MSA) en conditions de symbiose avec la souche 2011.

	dl	MC	F	p
nodulation				
lignée	6	70,63	19,62	0,00
sel	6	124,00	30,26	0,00
lignée * sel	36	17,23	3,57	0,00
Allongement des tiges				
lignée	6	23425,97	40,25	0,00
sel	6	111359,61	188,53	0,00
lignée * sel	36	2488,5796	4,70	0,00
MSA				
lignée	6	444,51	13,11	0,00
sel	6	3098,79	121,47	0,00
lignée * sel	36	117,53	5,38	0,00

Tableau 19: Concentrations de sel donnant 50% d'inhibition pour les différentes lignées et pour les paramètres mesurés en symbiose avec la souche 2011: nodulation, longueur des tiges et MSA.

	Nodulation	L. tiges	MSA
J6	90	45	90
A20	90	75	75
DZA315.16	-	45	60
F83.5	60	45	60
TN1.11	90	75	90
TN8.3	90	75	75
TN8.15	90	90	-
TN8.20	90	75	90
TN8.25	75	75	75
TN6.18	45	30	45

« - » : le 50 % d'inhibition n'est pas encore atteint à 90 mM de sel.

Nodulation

Selon l'exemple choisis (Figure 27), la nodulation de Jemalong et F83005.5 est différente selon la souche rhizobiale, par contre la lignée DZA315.16 semble avoir un comportement similaire pour les 5 souches utilisées.

Les souches E6 et E8, prélevés dans le même sol ont un comportement différent avec Jemalong, et se montrent semblables avec F83500.5.

En conditions contrôles ainsi qu'en présence de sel, les lignées locales nodulent plus vite que celles de référence avec toutes les souches (Tableau 19). La lignée F83005.5 est non efficiente avec la souche 2011 dans ces conditions. En effet les lignées peu vigoureuses sont vulnérables à tout changement de conditions environnementales.

Longueur des tiges, MSA et EFA

Le paramètre longueur des tiges (Figure 28) est bien touché par la salinité pour les lignées de référence, sauf A20 qui montre plus de résistance. Les deux lignées locales gardent une longueur de tiges assez élevée avec les 5 souches analysées.

Pour la production de matière sèche (Figure 29), le même comportement est observé pour les différentes associations. Les lignées locales sont plus efficaces pour la fixation de l'azote sans variation selon la souche.

Dans ce cas étudié, l'origine de la souche n'affecte pas significativement la performance de l'association symbiotique avec la plante hôte.

Dans ces conditions, L'EFA est élevée pour les lignées TN1.11 et TN8.3 avec les 5 souches (Figure 30).

La corrélation entre L'EFA en présence et en absence de sel est significative au seuil de 1% et de signe positif (Figure 31). Signifiant qu'en symbiose, un bon rendement végétatif en conditions contrôles confère une meilleure résistance aux conditions de stress salin.

Selon l'analyse de variance (Tableau 18), qui a pour objectif de voir l'influence de différents facteurs sur la variabilité de réponse observée, l'effet lignée et souches sont non significatifs pour les deux paramètres testés. Par contre l'interaction entre les deux est significative. Cela veut dire que la tolérance au sel en conditions symbiotiques est à ne pas comparer pour chaque partenaire à part. Comme on remarque que la concentration de 60 mM a un effet significatif sur la variabilité observée.

Figure 27: Exemple de diversité de nodulation en présence de 60 mM de sel: Cinétique de nodulation exprimée en pourcentage par rapport au témoin sans sel pour les lignées Jemalong, DZA315.16 et F83005.5 avec différentes souches.

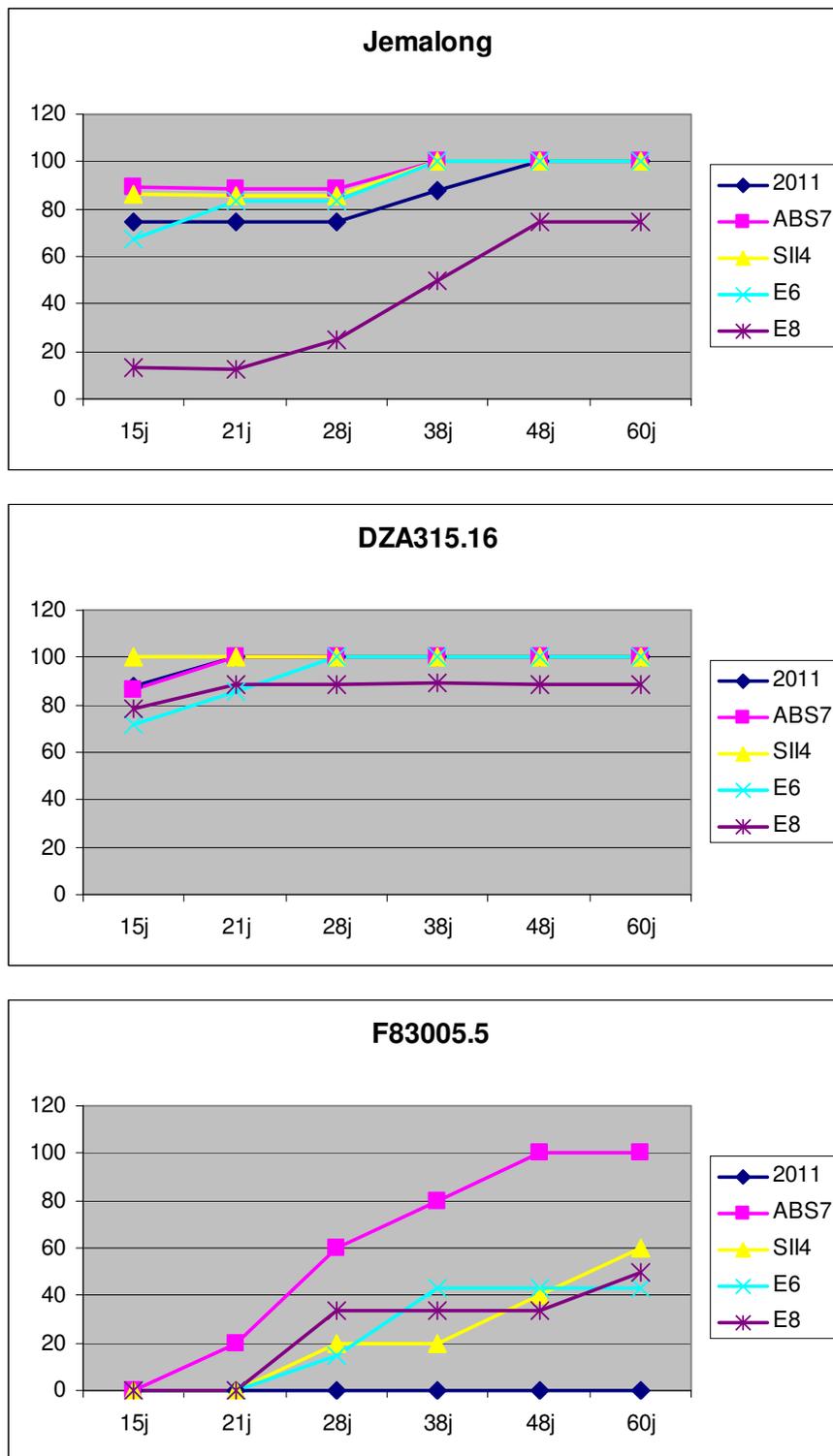


Tableau 20: Dates en jours correspondant à 100% de nodulation pour chaque association symbiotique étudiée.

* 100 % non atteinte

** absence de nodulation

Souches	Jemalong		DZA315.16		F83005.5		A20		DZA45.5		TN8.3		TN1.11		
	Traitement	C	60 mM	C	60 mM	C	60 mM	C	60 mM	C	60 mM	C	60 mM	C	60 mM
2011		15	48	15	28	15	**	15	15	28	38	15	28	15	15
ABS7		15	38	15	28	28	48	15	28	15	38	15	15	15	28
SII4		15	38	15	28	28	*	28	15	15	38	15	15	15	15
E6		15	38	15	28	15	*	28	28	15	15	15	28	15	15
E8		15	*	15	*	28	*	15	15	15	28	15	28	15	28

Figure 28: Pourcentage de diminution de longueur des tiges en présence de 60 mM de sel pour chaque association par rapport au témoin sans sel.

Les barres des histogrammes représentent les écarts types.

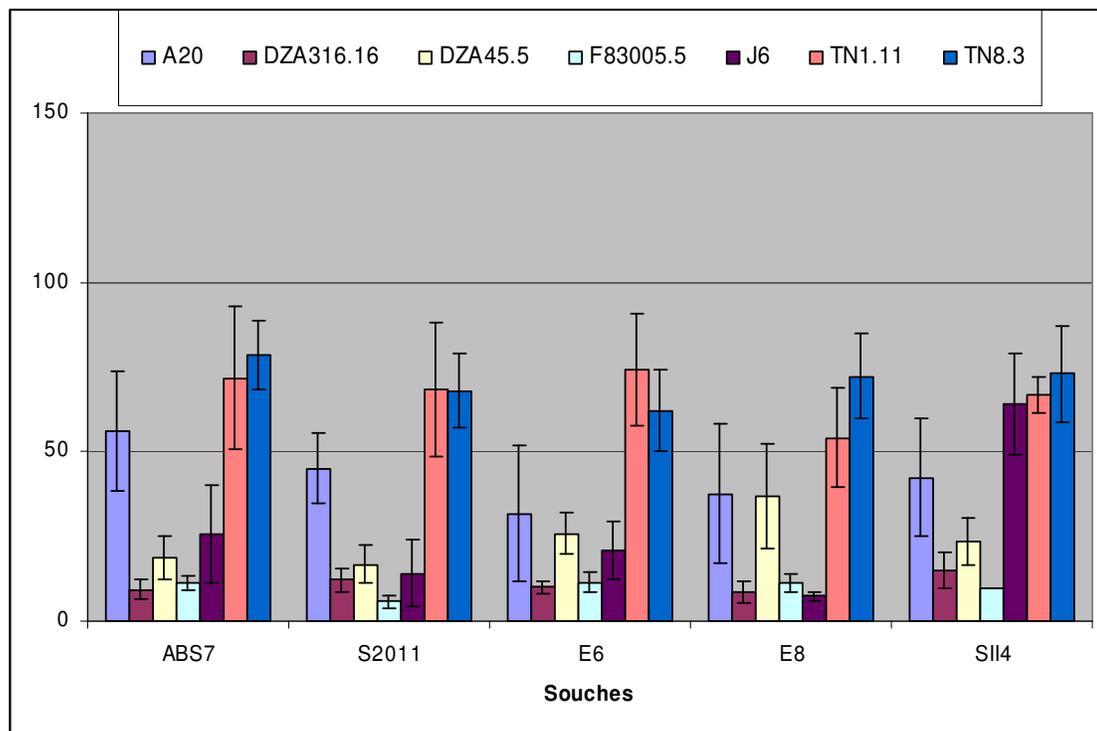


Figure 29: Pourcentage de MSA en présence de 60 mM de sel pour chaque association par rapport au témoin sans sel.

Les barres des histogrammes représentent les écarts types.

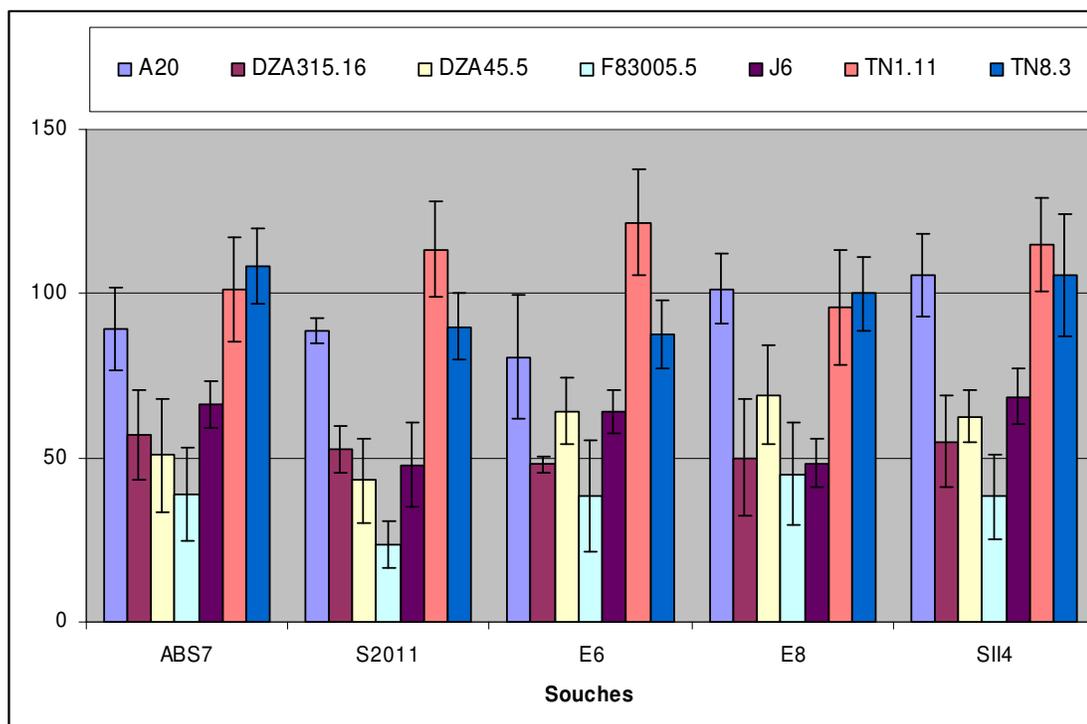


Figure 30: Pourcentage de l'EFA en présence de 60 mM de sel pour chaque association par rapport au témoin sans sel.

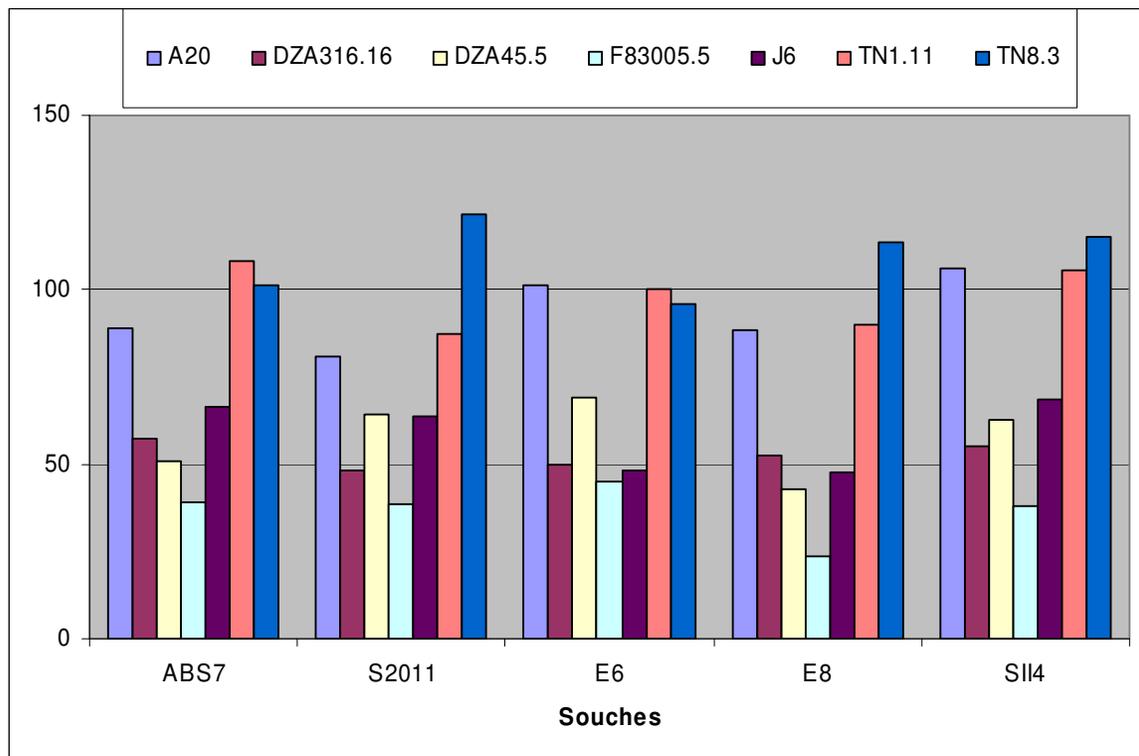


Figure 31: Corrélation entre EFA en absence et en présence de sel pour les différentes associations symbiotiques.

R = 0.21; ddl = 33 (La valeur seuil à 1% = 0.275).

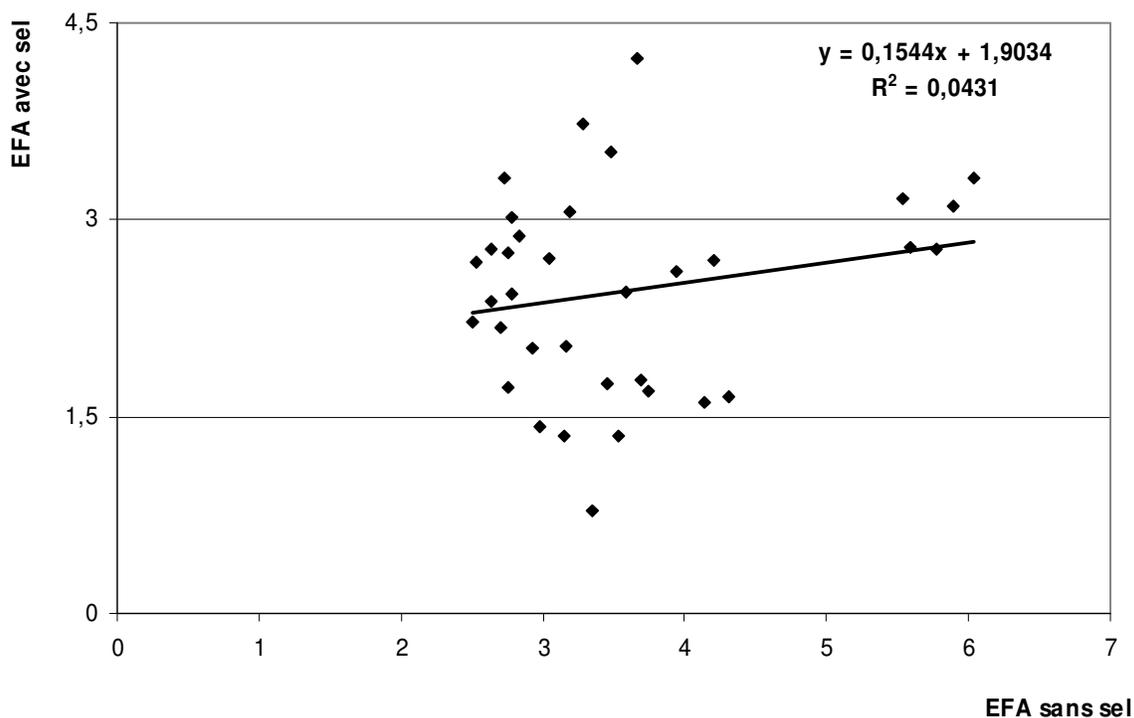


Tableau 21: Décomposition de la variance pour les caractères: allongement des tiges et matière sèche aérienne selon l'effet de la concentration de sel, de la lignée, de la souche rhizobiale et de différentes interactions.

	dl	MC	F	p
<u>Longueur des tiges</u>				
Sel (1)	1	250,46	42,16	0,00
Lignées (2)	6	249,37	1,53	0,30
Souches (3)	4	14,07	1,51	0,25
1*2	6	3,62	64,61	0,00
1*3	4	3,71	1,16	0,35
2*3	24	3,57	3,54	0,00
1*2*3	24	2,71	1,31	0,15
<u>MSA</u>				
Sel (1)	1	1933,69	6,15	0,05
Lignées (2)	6	1902,80	0,34	0,89
Souches (3)	4	146,31	2,23	0,13
1*2	6	28,52	62,61	0,00
1*3	4	29,45	2,48	0,07
2*3	24	28,17	3,41	0,00
1*2*3	24	16,16	1,72	0,02

Effet souches en conditions contrôles

Un ensemble de souches de différentes origines ont été testées avec la lignée J6 afin de déterminer l'effet origine des souches sur le rendement et la tolérance de l'association symbiotique en présence de 75 mM de sel. Seulement le traitement salin a rencontré des problèmes et on n'a pas pu analyser les données.

Cette analyse concernera donc le contrôle, et les souches utilisées sont de différentes origines:

- * 2 souches de référence: ABS7 et 2011
- * 5 souches provenant de sols salins : 4 d'Enfidha (E2, E5, E6, E8) et une de Soliman (SII4)
- * 2 souches tunisiennes d'origine sols non salins : El Kef (KIII8) et Bulla Régia (B8)
- * 3 souches provenant d'une collection russe (Travaux d'Oksana Kurchak) (AK36, AK57, AK107) et ces souches proviennent à notre connaissance de sols extrêmement salins.

La nodulation de J6 avec ces souches est variable. Le nombre minimum de nodules est obtenu avec les souches de sols salins tunisiennes (Figure 32) ainsi que provenant de Bulla Régia (sols non salin).

La souche ABS7 forme aussi peu de nodules qui doivent être efficaces selon leur aspect. La souche AK107 forme beaucoup de nodules qui ne sont pas efficaces. Selon le caractère nodulation, la distinction entre souches de sols salin et non salin n'est pas nette. En observant la longueur des tiges (Figure 33), on remarque nettement que l'association avec la souche AK107 est très peu efficace par rapport à l'ensemble des associations.

En global, selon la longueur des tiges et la production de matière sèche (Figure 34) on n'a pas pu faire de distinction entre les groupes de souches. Cette observation confirme les observations précédentes concernant l'origine des souches.

IV. Effet de l'AVG sur la réponse au sel des associations symbiotiques

L'AVG (L-a-(2-aminoethoxyvinyl)-glycine) est un inhibiteur de synthèse d'éthylène. L'éthylène est synthétisé par la plante en cas de stress. L'AVG enlève l'inhibition de l'éthylène sur la croissance des plantes. On a remarqué que la nodulation est inhibée chez certaines lignées trop sensibles au sel comme TN6.18 et F83005.5. Dans cette partie on a voulu voir l'effet de l'ajout de l'AVG dans le milieu de culture dans le cas de présence et absence de stress salin.

Figure 32: Nodulation (nod/plante) de Jemalong avec plusieurs souches de différentes origines

La significativité des différences est testée par un test de Duncan (1%)

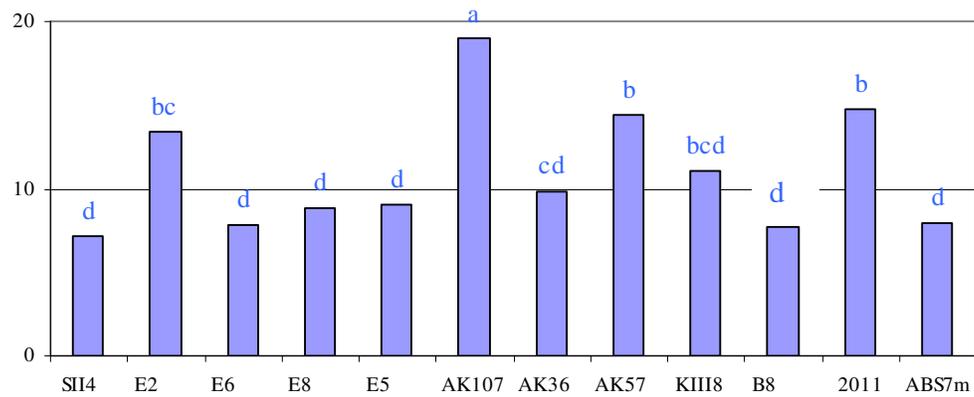


Figure 33: Allongement des tiges (cm) de Jemalong avec plusieurs souches de différentes origines

La significativité des différences est testée par un test de Duncan (1%)

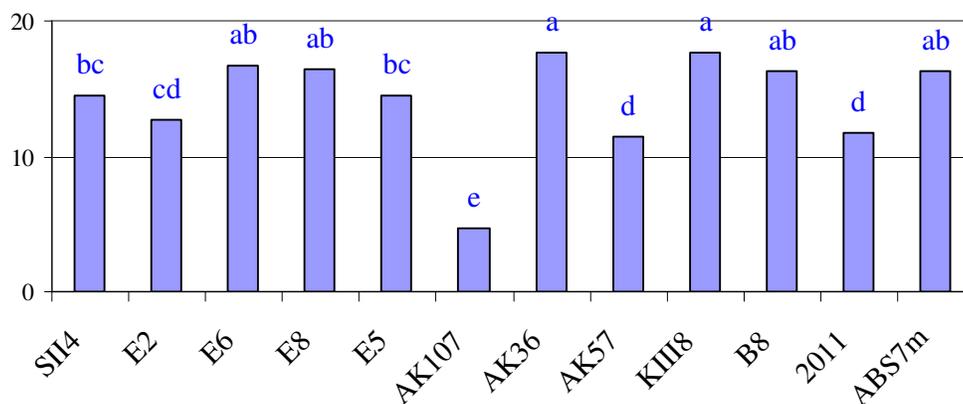
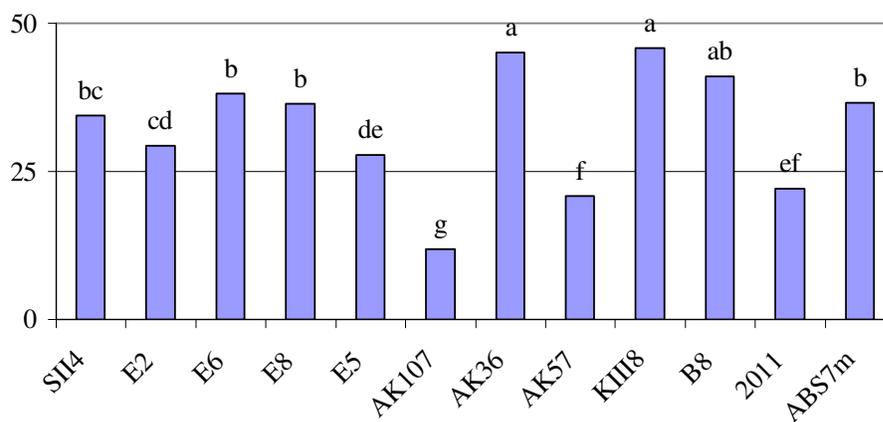


Figure 34: Production de matière sèche aérienne (mg) de Jemalong avec plusieurs souches de différentes origines

La significativité des différences est testée par un test de Duncan (1%)



Selon le caractère Nodulation (Figure 35, Tableau 22) et en conditions contrôles, le comportement des lignées est inchangé, on observe seulement une légère augmentation pour TN6.18 et une diminution pour J6.

Dans ces conditions et en présence de 60 mM de sel, la lignée TN6.18 ne nodule pas avec la souche 2011. On remarque une augmentation du nombre de nodules pour DZA315.16, DZA45.5 et F83005.5 (F83.5).

En observant l'allongement des tiges en présence de sel (Tableau 23), on remarque une amélioration en présence d'AVG pour les lignées F83005.5, TN8.20 et J6. Pour le reste des lignées il n'y a pas de différences significatives entre les deux conditions.

Dans les conditions contrôles, le comportement des lignées n'est pas significativement différent entre absence et présence d'AVG.

Les mêmes observations sont confirmées avec le caractère MSA (Tableau 24), seulement une légère augmentation en ajoutant de l'AVG est observée pour TN8.20 et J6 en présence de sel.

On peut tirer la conclusion que la concentration d'AVG utilisée n'a pas d'effets bénéfiques sur l'ensemble des associations, et on doit l'ajuster à chaque lignée pour avoir de meilleurs résultats. Cette conclusion a été renforcée après l'application de 3 concentrations d'AVG (0, 0.5 et 1 μ M) à la lignée TN6.18. On a calculé un pourcentage de nodulation en fonction du temps (Figure 36). En absence d'AVG, le 50% de nodulation est obtenu à 25 jours alors qu'en présence d'AVG le 50% est atteint avant les 12 jours.

On remarque que les deux concentrations 0.5 et 1 sont assez suffisantes pour l'amélioration de la nodulation de cette lignée sensible. Ce comportement doit être confirmé en appliquant le stress salin.

V. Effet du stress salin sur les populations d'origine constituant la collection tunisienne de *M. truncatula*

Dans cette partie nous avons voulu avoir une idée générale de la tolérance des populations au sel. Nous voulons apporter une réponse aux questions:

- Est ce que ces populations sont homogènes pour leurs réponses au sel?
- Est ce que leur réponse au sel est corrélée avec la salinité de leur milieu d'origine ?
- Est ce que l'on peut trouver des lignées tolérantes au sel dans des populations provenant de sols non salins ?

Pour des raisons pratiques de disponibilité en graines, il ne nous a pas été possible d'étudier chacune des lignées des 10 populations étudiées au chapitre 1. Nous avons donc choisi de

Figure 35: Comportement des lignées de *M.truncatula* par rapport à la nodulation avec la souche 2011 en présence d'AVG (0.3µM) dans le milieu en conditions contrôles et en présence de 60 mM de NaCl.

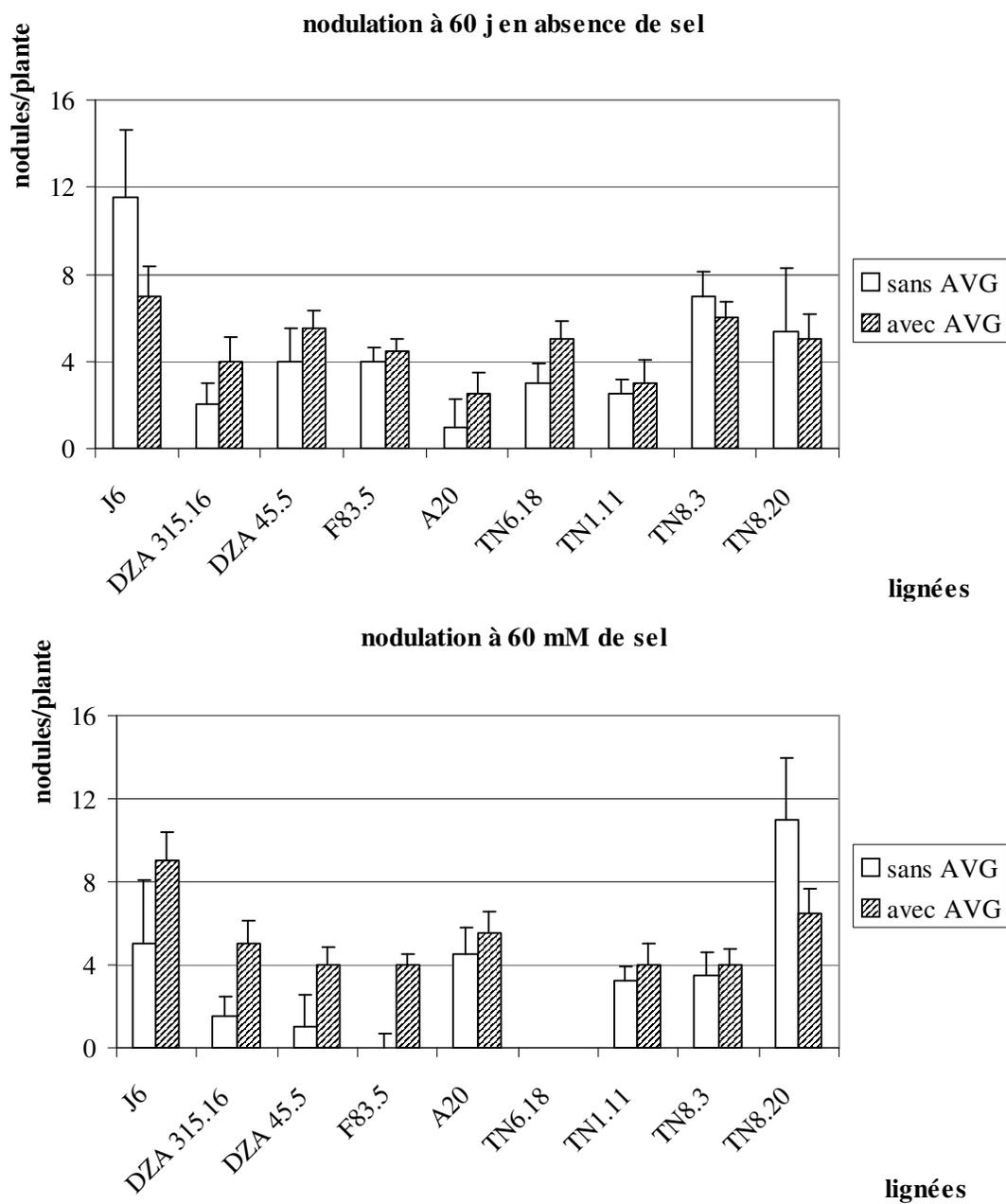


Tableau 22: Nodulation des lignées inoculées avec la souche 2011 à 60 jours en absence et en présence de sel et d'AVG (0.3 μ M).

La significativité des différences est testée par un test de Duncan (1%)

Lignées	Sans AVG		Avec AVG	
	C	avec sel	C	avec sel
A20	3,3 b	4,8 abc	4,5 b	5,3 b
DZA315.16	2,8 b	5,2 abc	2,3 bc	4 bc
DZA45.5	3,7 b	5,2 abc	1 c	4 bc
F83.5	4,2 b	4,9 abc	- -	2,3 c
J6	12 a	6,4 a	4,3 b	9 a
TN1.11	2,7 b	4,9 abc	3,3 bc	3,9 bc
TN6.18	3 b	3,9 c	- -	- -
TN8.20	5,3 b	4 bc	8 a	5,5 b
TN8.3	4,6 b	5,7 ab	2,8 bc	3,5 bc

Tableau 23: Longueur des tiges (cm) en absence et en présence de sel et d'AVG (0.3 μ M).

La significativité des différences est testée par un test de Duncan (1%)

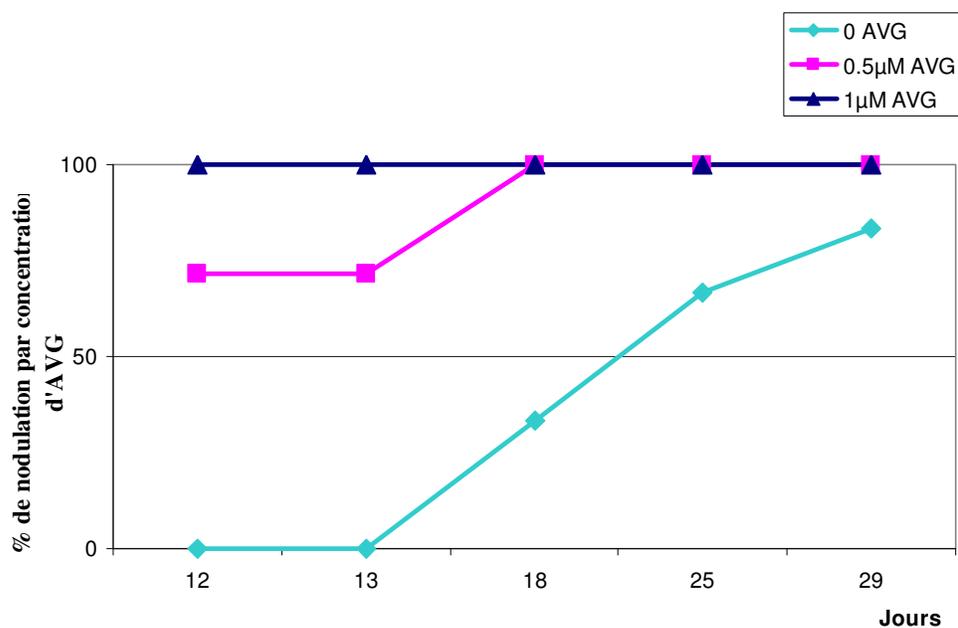
Lignées	Sans AVG		Avec AVG	
	C	avec sel	C	avec sel
A20	13,57 ab	1,25 b	14,11 b	1,45 c
DZA315.16	11,81 bc	1,22 b	12,17 cd	1,45 c
DZA45.5	11,17 bc	1,50 b	10,83 de	2,17 c
F83.5	8,00 d	0,00 c	9,80 e	2,33 c
J6	10,14 cd	1,50 b	12,65 bcd	3,31 c
TN1.11	15,17 a	4,50 a	16,44 a	5,36 b
TN6.18	1,00 e	0,00 c	2,00 f	0,00 d
TN8.20	13,33 ab	4,38 a	11,80 cd	9,67 a
TN8.3	12,11 bc	2,20 b	12,94 bc	2,13 c

Tableau 24: Production de matière sèche aérienne (mg) des lignées de *M. truncatula* inoculée par la souche 2011 en absence et en présence de sel et d'AVG (0.3µM).

La significativité des différences est testée par un test de Duncan (1%)

Lignées	Sans AVG		Avec AVG	
	C	avec sel	C	avec sel
A20	34,51 a	17,30 bc	37,48 a	18,08 bc
DZA315.16	36,42 a	20,90 abc	34,87 abc	20,79 b
DZA45.5	29,30 ab	11,60 d	29,51 c	13,83 c
F83.5	25,66 b	- -	36,31 ab	12,70 c
J6	25,54 b	15,66 cd	30,81 bc	23,23 b
TN1.11	29,89 ab	22,45 ab	31,63 bc	22,23 b
TN6.18	17,70 c	- -	19,47 d	- -
TN8.20	24,80 b	23,25 a	30,88 bc	30,63 a
TN8.3	30,06 ab	16,83 c	34,44 abc	14,26 c

Figure 36: Pourcentage de nodulation de la lignée TN6.18 inoculée par la souche 2011 en absence d'AVG, en présence de 0.5 et 1 µM d'AVG, et en conditions contrôles.



travailler à partir d'un échantillon représentatif des populations locales de *M. truncatula*. De même, nous n'avons pas eu le temps d'étudier l'impact de la salinité en conditions symbiotique. Notre analyse sera réalisée uniquement en condition d'assimilation de l'azote et avec, ou non, une seule concentration de NaCl (60mM).

V.1. Matériel végétal et conditions de culture

A partir de la collecte faite initialement sur les sites, nous avons prélevé, au hasard, 25 gousses. Pour chaque gousse 2 graines ont été prises, chacune servant à une expérience en présence ou non de sel (Voir données brutes dans l'annexe 5). La culture des plantes est faite *in vitro* dans les tubes sur milieu Fahraeus additionné de 3 mM de KNO₃ pendant 60 jours.

V.2. Analyse globale des populations

La figure 37 représente la moyenne de chaque population pour les 2 caractères étudiés en présence ou non de sel. On constate que la longueur des tiges est le caractère le plus variable et, comme nous l'avons vu précédemment, le plus affecté par la salinité.

V.2.1. Allongement des tiges

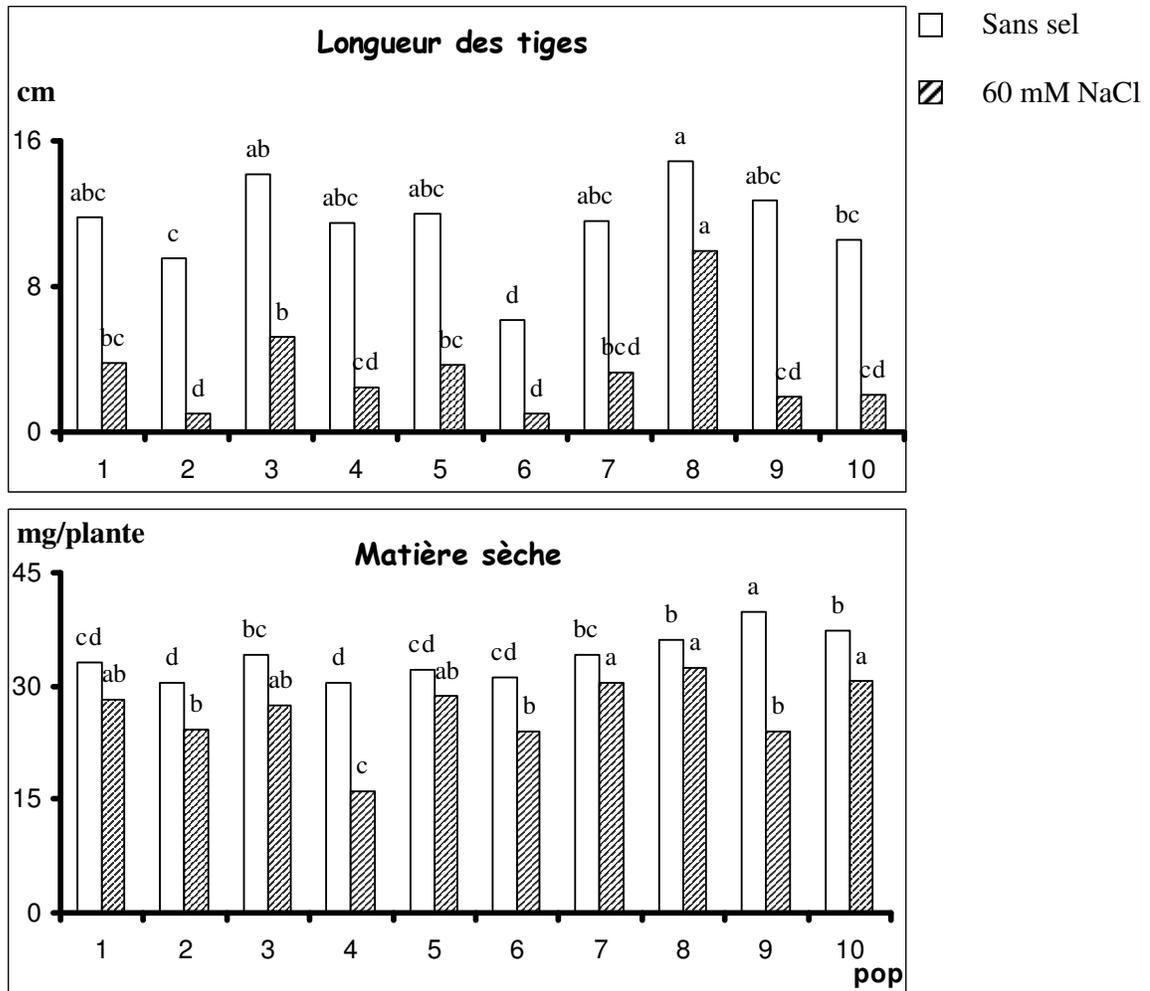
En absence de sel, les extrêmes sont Soliman (population 8) présente les tiges les plus allongées contrairement à la population de Thala (population 6), ayant des tiges plus de 2 fois plus courtes. Sous stress salin, ces deux populations gardent le même comportement différentiel. Les autres populations ont un comportement intermédiaire entre Soliman et Thala sous les deux conditions. La population de Soliman étant d'origine un sol salin a tendance à allonger ses tiges d'une façon orthotropes comme on a déjà vu dans le chapitre I. Celle de Thala, a pour origine un site à moyenne altitude.

V.2.2. Production de matière sèche des parties aériennes

D'une manière générale, la production de matière sèche aérienne en absence de sel n'est pas très différente entre les populations. En présence de sel seules les populations Bulla Régia (population 9) et Deguache sont nettement affectées. On peut seulement noter que ces deux populations proviennent de sols très différents puisque Bulla Regia provient de sols fertiles riches en matière organiques tandis que la population de Deguache provient de sols salins avec un climat sec.

Figure 37: Effet du sel sur les paramètres longueur des tiges et matière sèche aérienne en culture sur 3mM d'azote (KNO₃) chez les 10 populations naturelles de *M. truncatula*

La significativité des différences est testée par un test de Duncan (1%)



V.3. Variation de réponse au sel à l'intérieur des populations

Dans le paragraphe précédent, nous n'avons pas pu distinguer d'une manière nette les populations à sols salins pour leur tolérance au sel par rapport aux autres. Nous allons dans la partie suivante regarder la diversité au sein de chaque population et non plus la moyenne des individus examinés qui n'est pas réellement représentative de la diversité des phénotypes au sein de chaque population. La Figure 38 représente la distribution (exprimée en %) des lignées au sein de chaque population pour chaque caractère.

- La population Enfidha semble assez homogène puisque, en l'absence de sel, les individus se répartissent, en première approximation, d'une manière unimodale quelque soit le caractère pris en compte. L'application du stress salin entraîne un élargissement modéré de la distribution. Le caractère Longueur est fortement affecté avec une réduction drastique de la longueur des tiges. Par contre, la MSA n'est que peu affectée.
- La population Jelma confirme cette non corrélation entre la MSA et la longueur des tiges puisque la distribution de la MSA est grossièrement unimodale, en présence ou non de sel, avec un faible effet du stress. Par contre, le caractère Longueur est extrêmement variable allant de 18 à 2 cm. En présence de sel, pratiquement toutes les plantes (80%) ont un allongement bloqué.

Il est clair que cette population présente un intérêt majeur afin de comprendre les bases génétiques et physiologiques de cette diversité dans l'allongement des tiges.

- La population Amra est, semble t-il, homogène quant à sa production de matière sèche ou d'allongement des tiges. Par contre, l'application du stress salin met en évidence une diversité non évidente en condition contrôle puisque une certaine proportion des lignées ne semble pas affectée par le stress salin.
- La population Deguache se comporte comme la population Jelma avec une nette diversité d'allongement en l'absence de sel mais une majorité de plantes sensibles au sel. L'effet du sel sur la MSA est plus marqué que chez Jelma avec plus de plantes affectées par le sel.
- La population Majel Bel abbes présente environ 20% de plantes à courtes tiges mais toutes sont affectées par le sel. La distribution selon la MSA ne semble pas affectée par

l'application de sel.

- La population de Thala est clairement bimodale en ce qui concerne l'allongement des tiges, avec des valeurs relativement faibles par comparaison aux autres populations, mais est unimodale par rapport à la MSA. L'allongement des tiges est très affecté par le NaCl mais la MSA ne l'est que peu.
- La population El Kef a un comportement assez semblable à celui de la population Majel Bel Abbas.
- La population Soliman a un comportement nettement différent des autres populations puisque l'allongement des tiges de cette population n'est que peu affecté par le sel. Cette population a des tiges les plus longues de toutes les populations. Par contre, il est possible que 15% des lignées aient une MSA significativement sensible au sel.
- L'originalité de la population de Bulla Regia se situe au niveau de la tolérance de la MSA au sel puisque la distribution des lignées en présence de sel est clairement différente de celle en l'absence de sel. C'est la seule population qui réagisse de cette manière pour ce caractère.
- La population Rhayet a un comportement approximativement identique à celui de la population d'Enfidha.

Figure 38: A: Distribution des fréquences (en pourcentage) des individus des populations de *M.truncatula* pour la longueur des tiges cultivés sur Azote minéral en conditions contrôles et en présence de 60 mM de sel.

B: Distribution des fréquences (en pourcentage) des individus des populations de *M.truncatula* pour la matière sèche aérienne cultivés sur Azote minéral en conditions contrôles et en présence de 60 mM de sel.

Figure 38_1

Population Enfidha

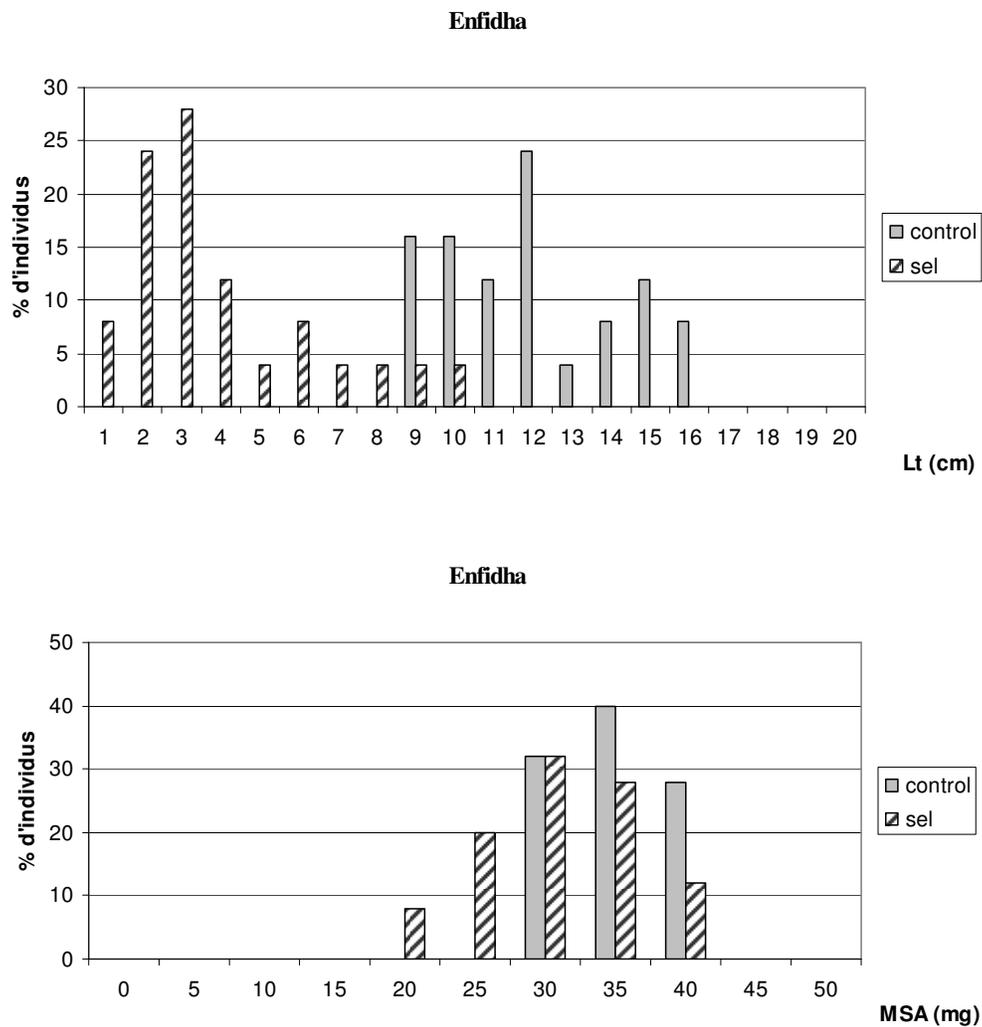


Figure 38_2

Population Jelma

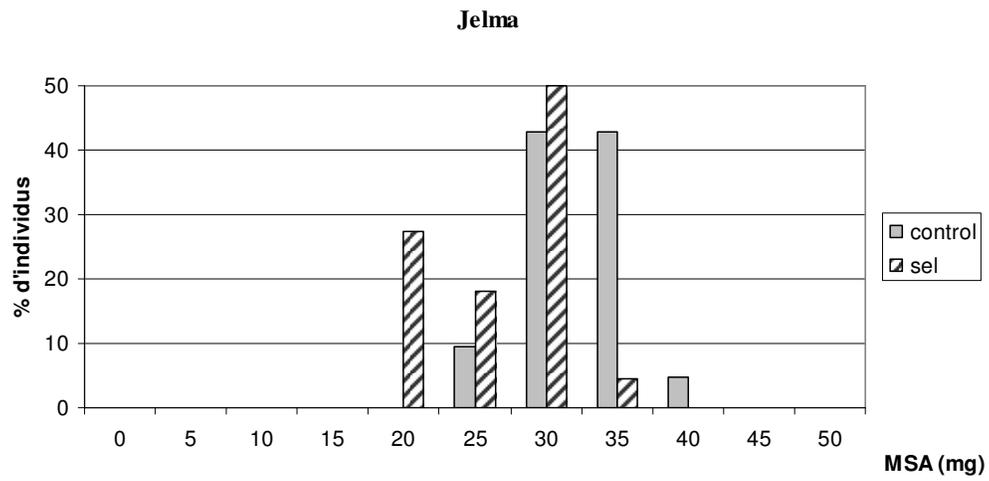
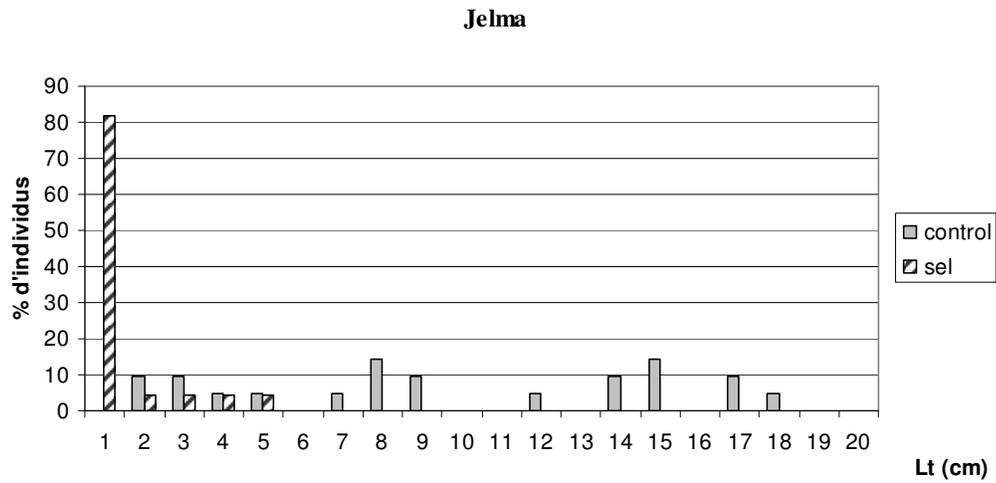


Figure 38_3

Population Amra

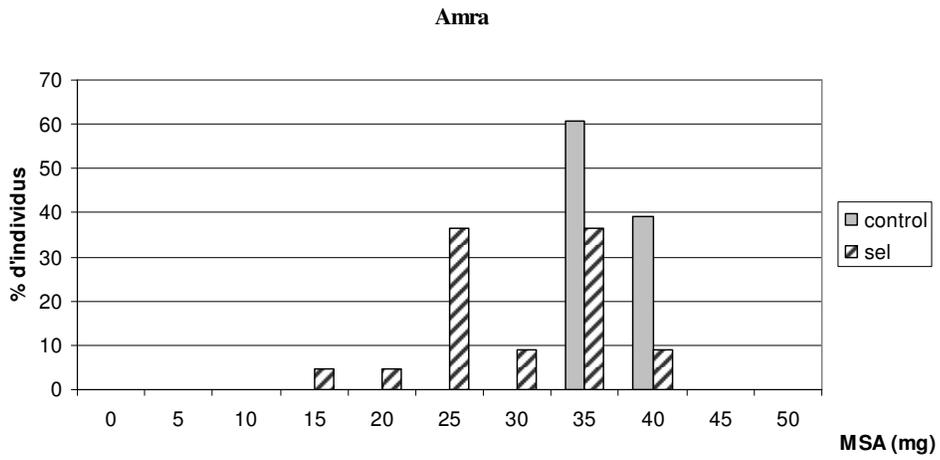
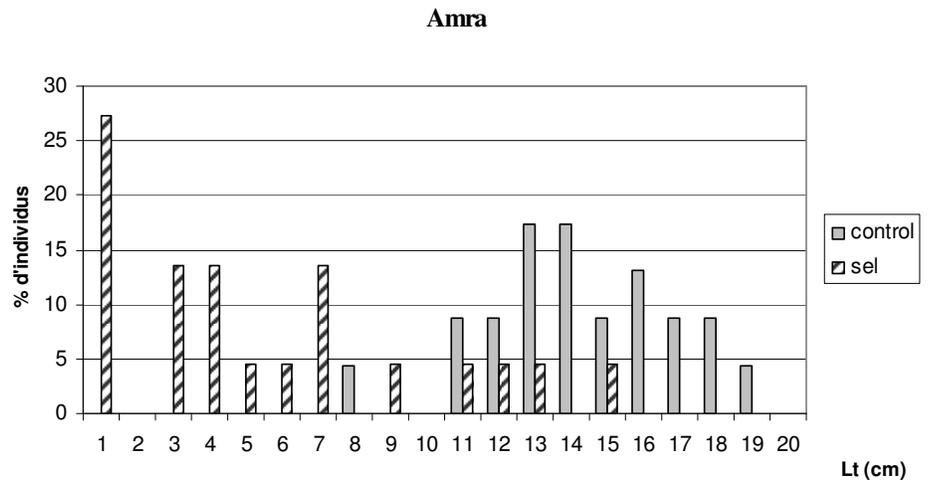


Figure 38_4

Population Deguache

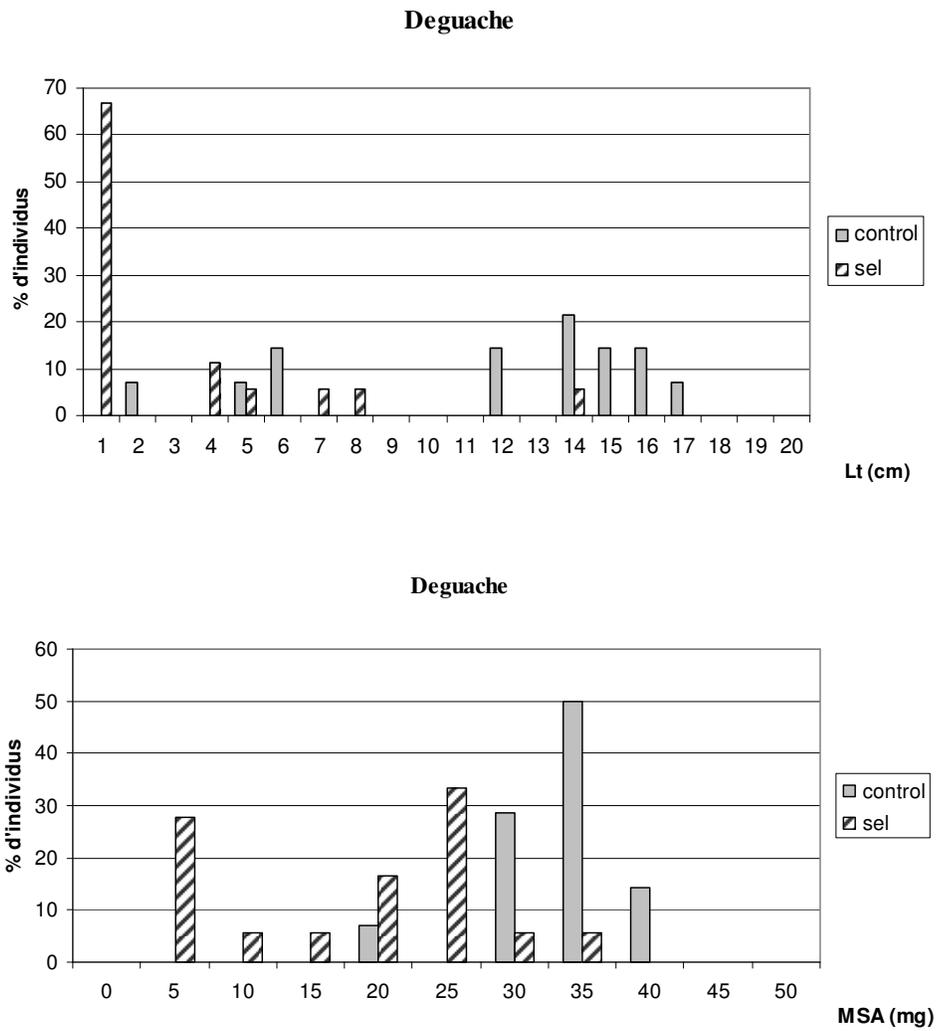


Figure 38_5

Population Majel Bel Abbes (M.B.Abbes)

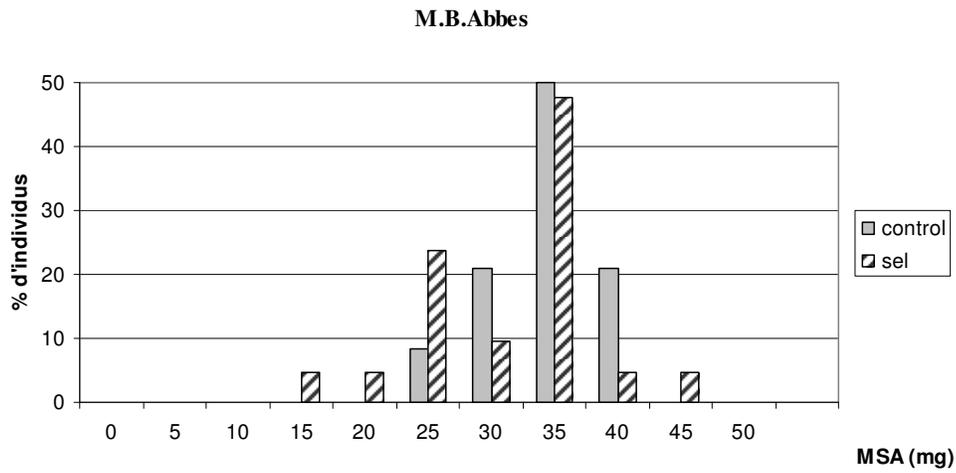
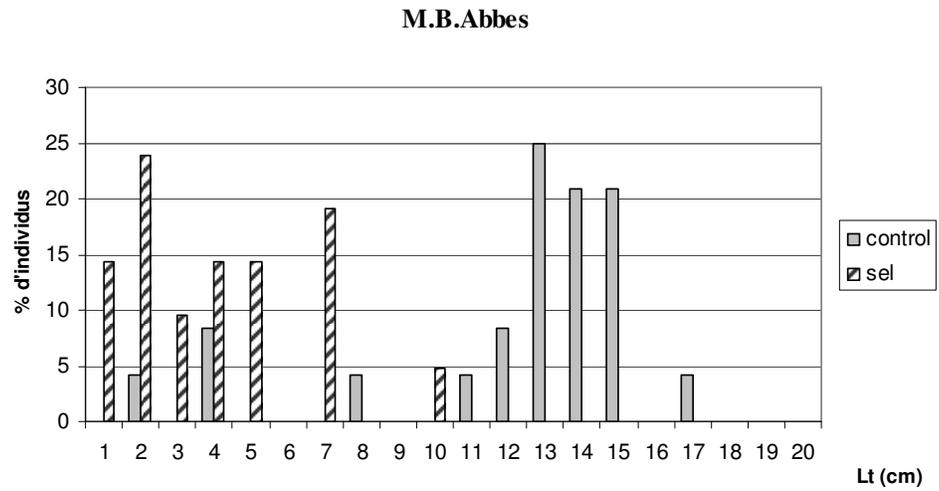


Figure 38_6

Population Thala

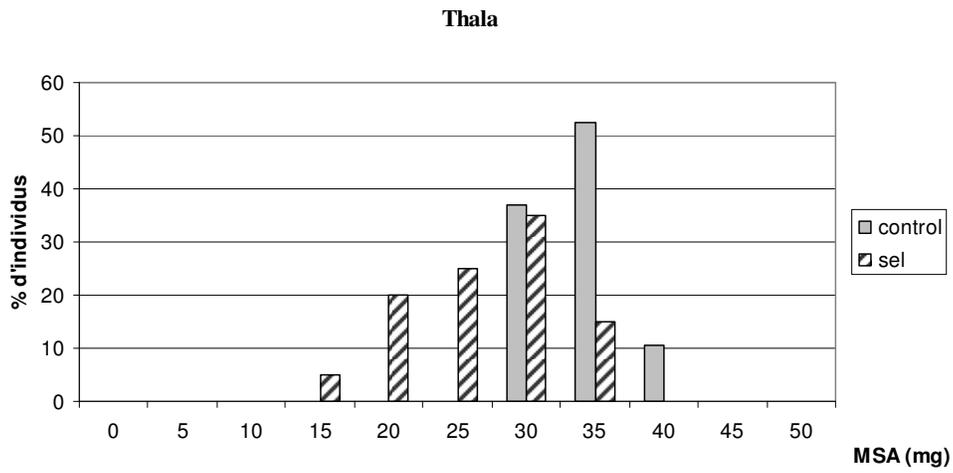
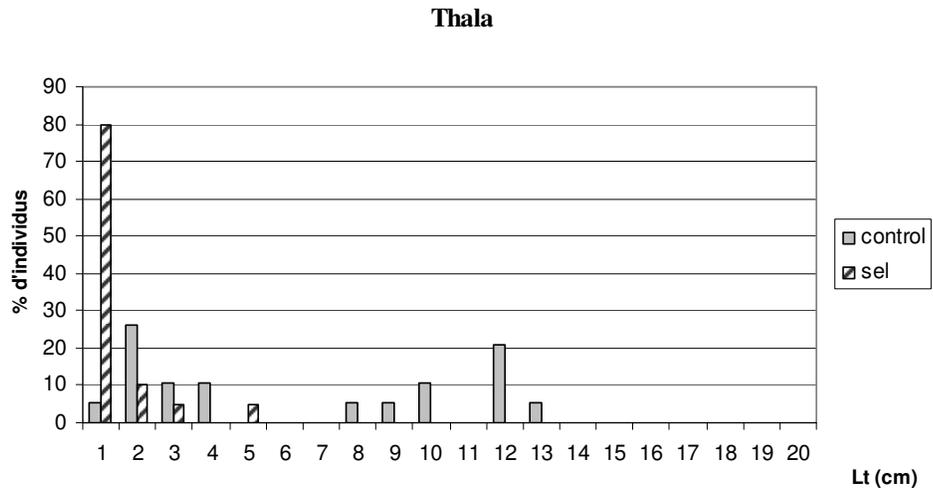


Figure 38_7

Population El Kef

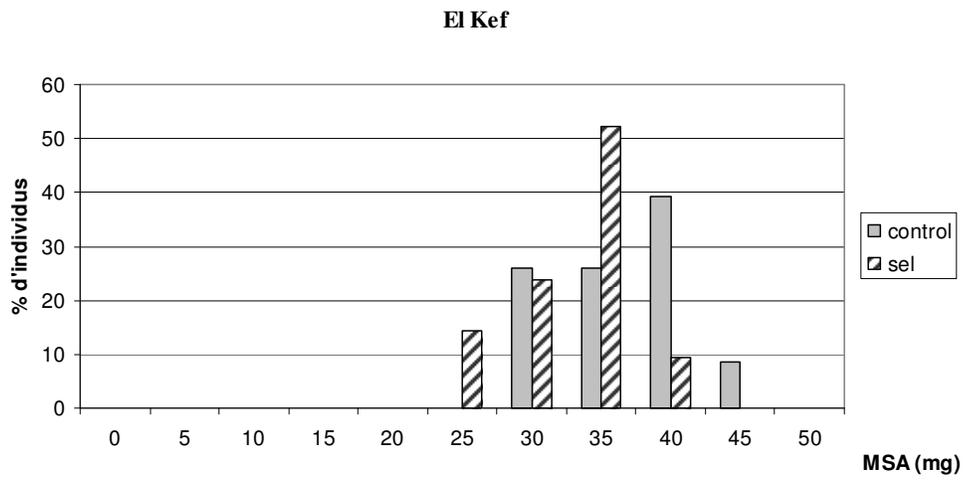
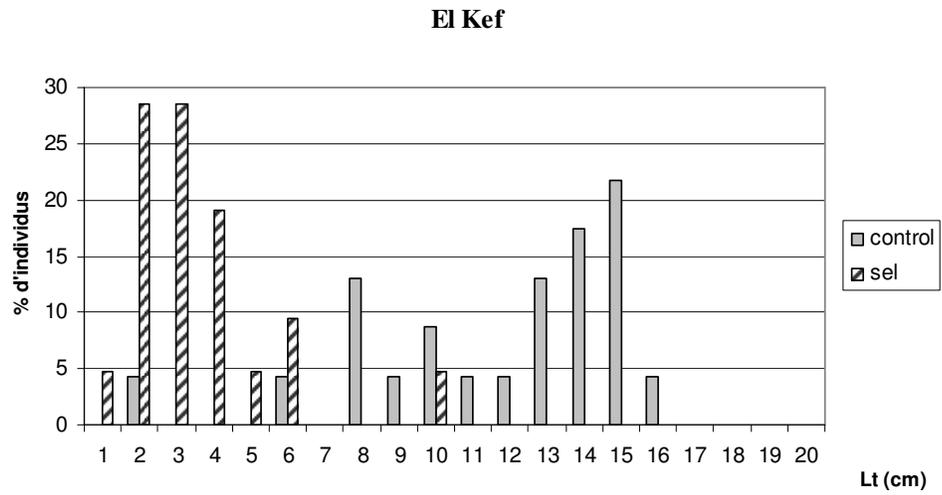


Figure 38_8

Population Soliman

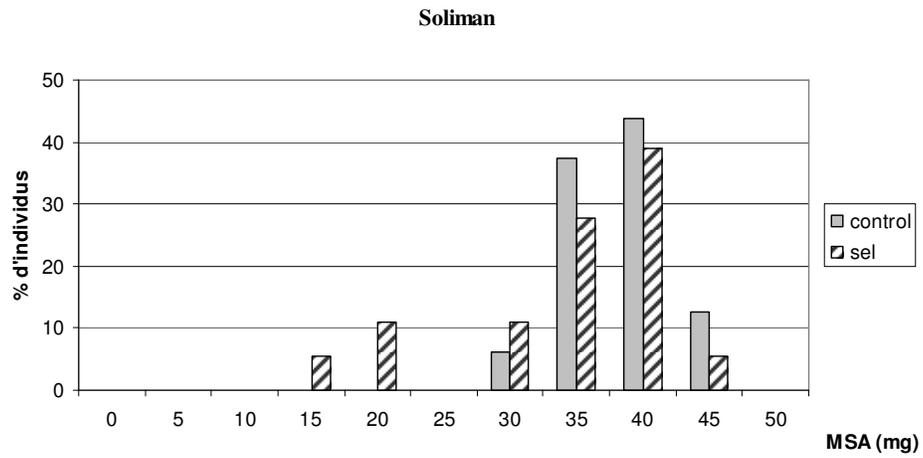
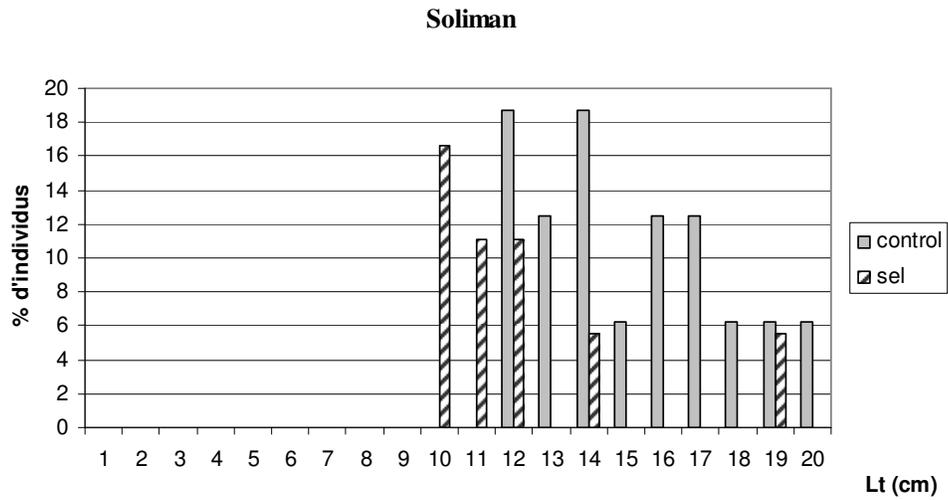


Figure 38_9

Population Bulla Regia

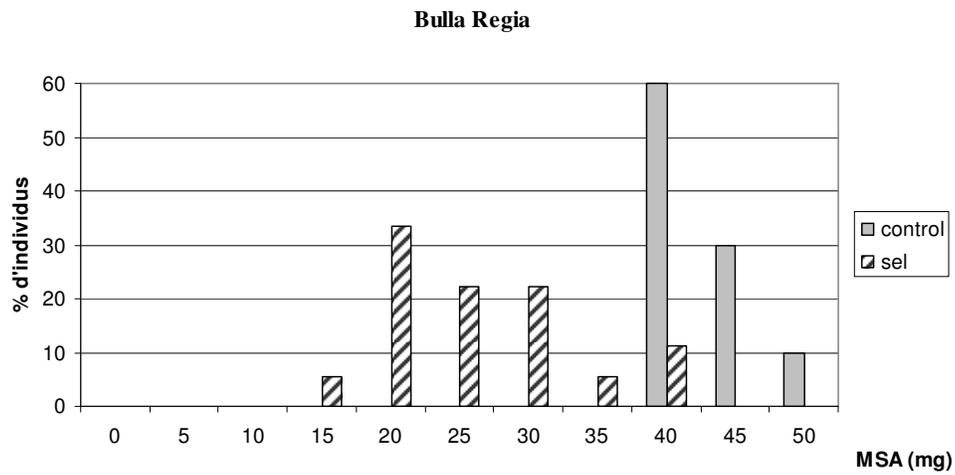
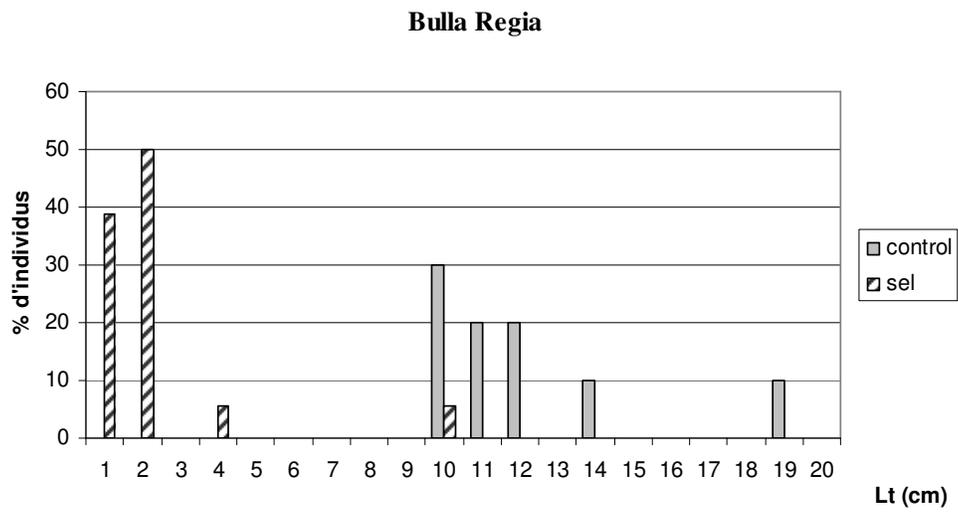
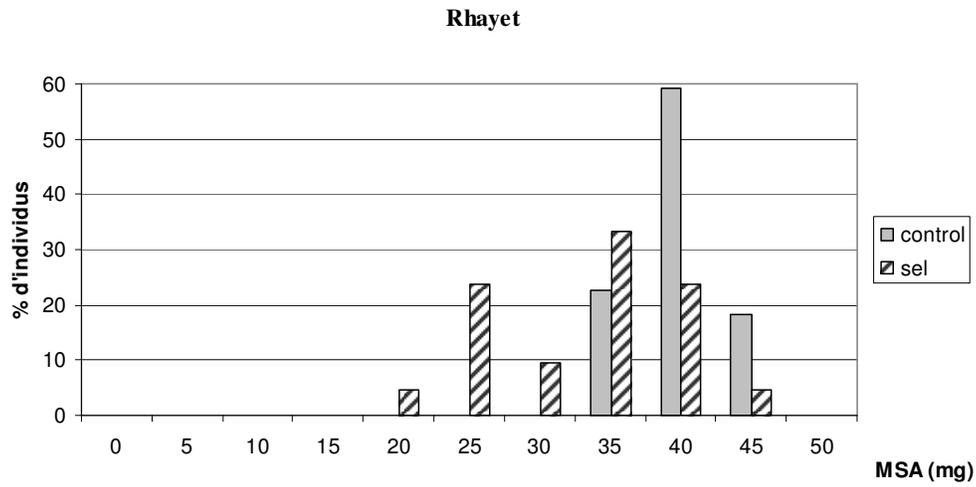
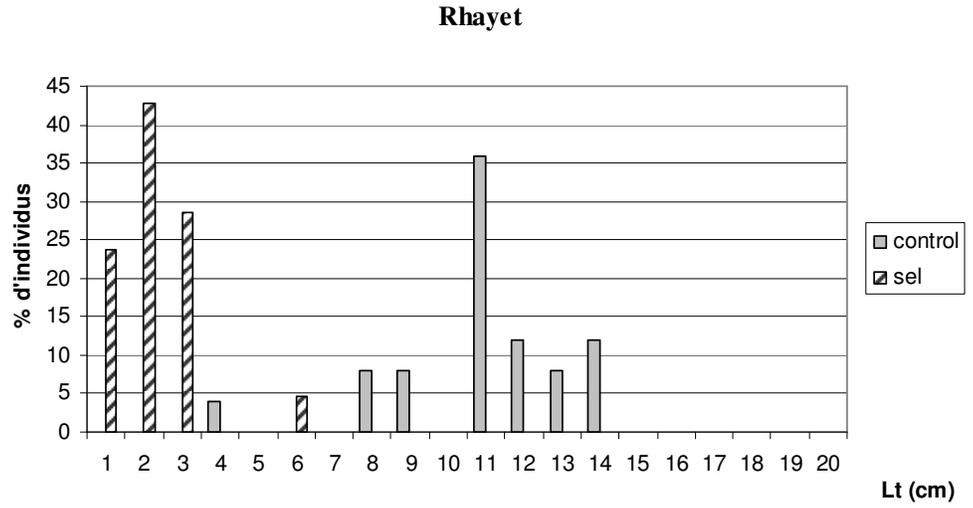


Figure 38_10

Population Rhayet



V.4. Variation de réponse au sel entre populations

Afin de mieux estimer l'impact du sel, nous avons représenté (Figure 39) les valeurs d'allongement des tiges et de MSA en présence de 60 mM NaCl exprimées en % du contrôle sans sel. Pour l'ensemble des populations, on remarque que l'inhibition de la longueur des tiges est beaucoup plus importante que celle de la MSA. L'inhibition de l'allongement des tiges est dans l'ensemble forte pour l'ensemble des populations, de 60 à 80 %, sauf pour la population de Soliman (8) qui n'est inhibée qu'à environ 35%. Il faut remarquer que les lignées de Soliman analysées précédemment (TN8.20, TN8.3, TN8.15, TN8.25) présentaient aussi cette particularité. Il n'y a pas d'apparente corrélation entre la longueur des tiges en absence de sel et l'inhibition par le sel, puisque la population Thala (6) n'est pas inhibée différemment des autres populations.

Pour la réduction de MSA, nous retrouvons les deux populations de Deguache (4) et de Bulla Regia (9) qui se distinguent des autres populations. En effet, alors que les autres populations sont inhibées à 20-25%, Deguache et Bulla Regia sont inhibées à 40-50%. Le rapport Longueur à 60 mM / Longueur à 0 mM (pareil pour MSA) permet de représenter la sensibilité des lignées: une lignée non sensible aura un rapport de 1. Mettre en x-y les rapports L60/L0 et M60/M0 permet de voir, pour les 2 caractères, s'il y a des plantes sensibles ou tolérantes et surtout de voir la distribution pour les 2 caractères.

On a représenté le rendement sous l'effet du sel pour les deux paramètres (Figure 40): matière sèche aérienne et longueur des tiges, l'un en fonction de l'autre, exprimé par la valeur en présence de sel / valeur en absence de sel. De cette façon il est possible de distinguer le mode de dépendance de ces deux paramètres pour chaque population et pour les différentes plantes.

On voit ainsi qu'il y a des plantes sensibles à Deguache et à Soliman ! On voit aussi que l'on trouve toutes les combinaisons dans les pops ce qui veut dire que l'on pourrait sélectionner des plantes tolérantes pour les 2 caractères.

D'une manière générale, on ne peut observer des corrélations entre la Longueur des tiges et la MSA, les deux caractères semblant être indépendants. Certaines populations présentent une forte réduction des tiges mais elles conservent une MSA assez importante. Ce type de population présente des tiges plus courtes mais épaisses en présence de sel par rapport au témoin et conservent donc une MSA importante.

Figure 39: Pourcentage d'inhibition par 60mM de NaCl des populations tunisiennes pour les deux caractères longueur des tiges (LT) et production de matière sèche aérienne (MSA).

Les barres des histogrammes représentent les intervalles de confiance au seuil de 5%.

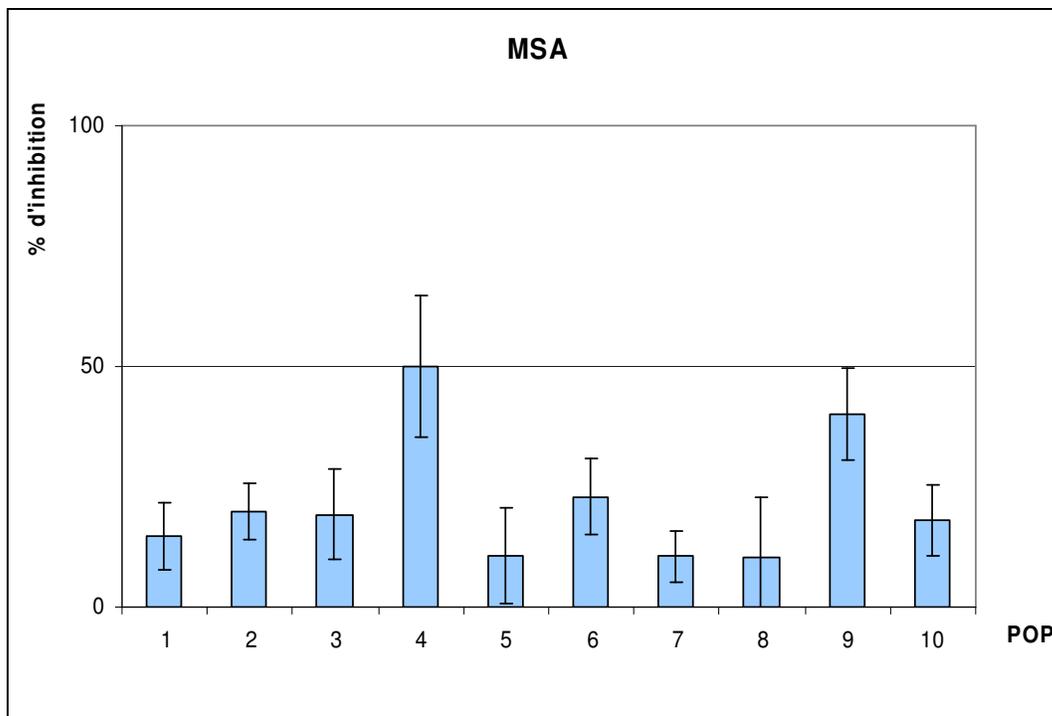
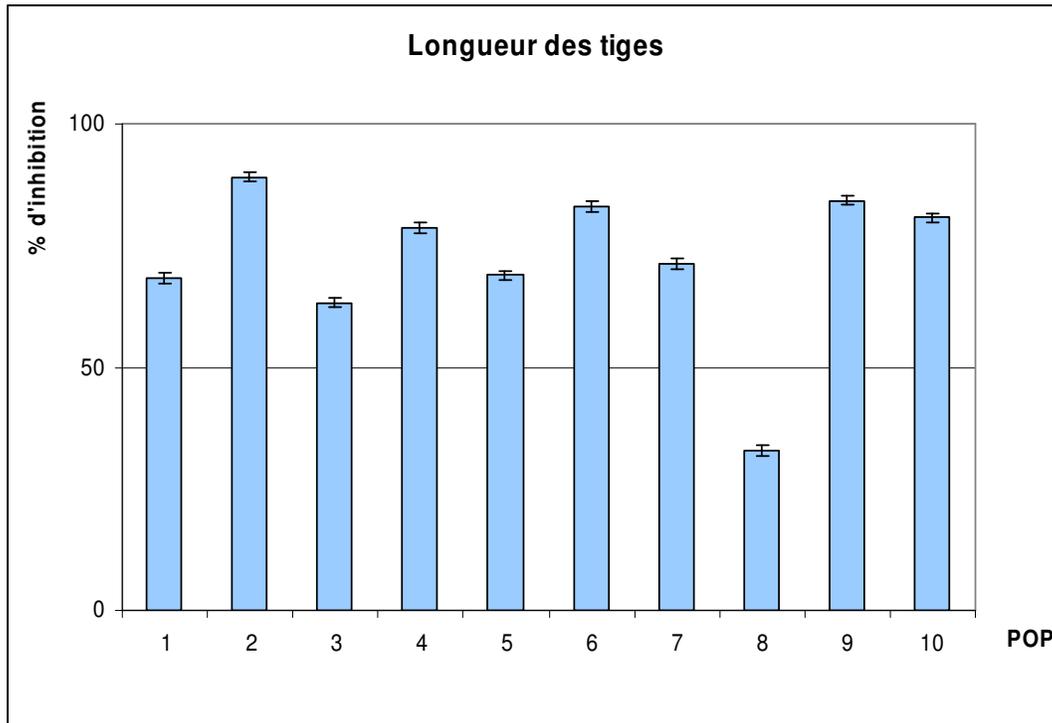
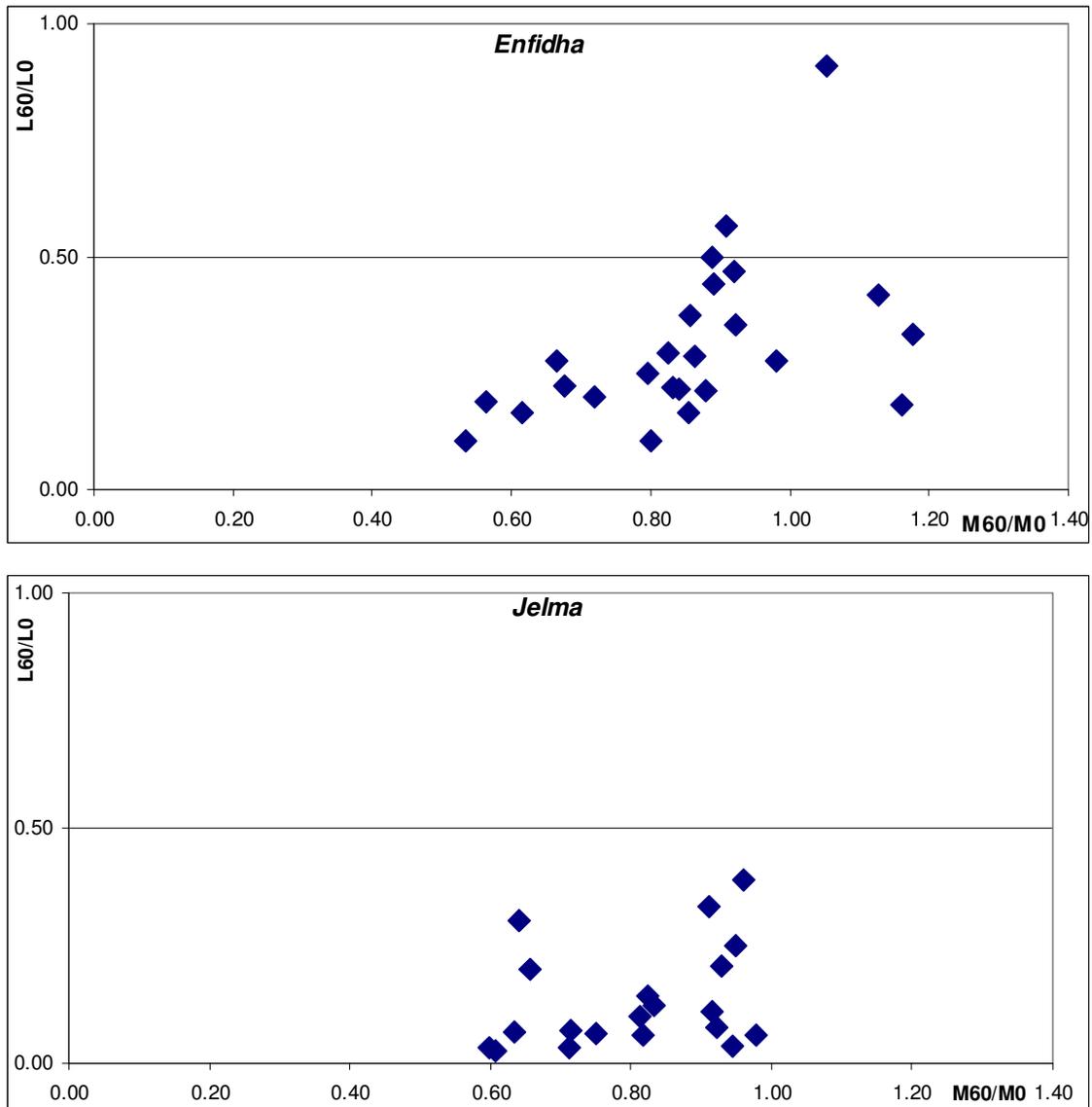
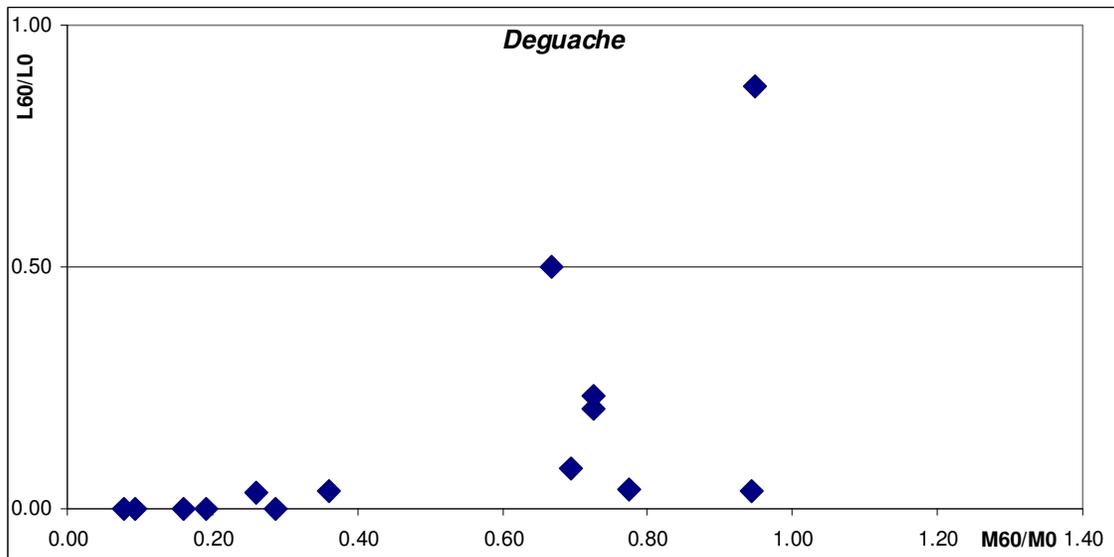
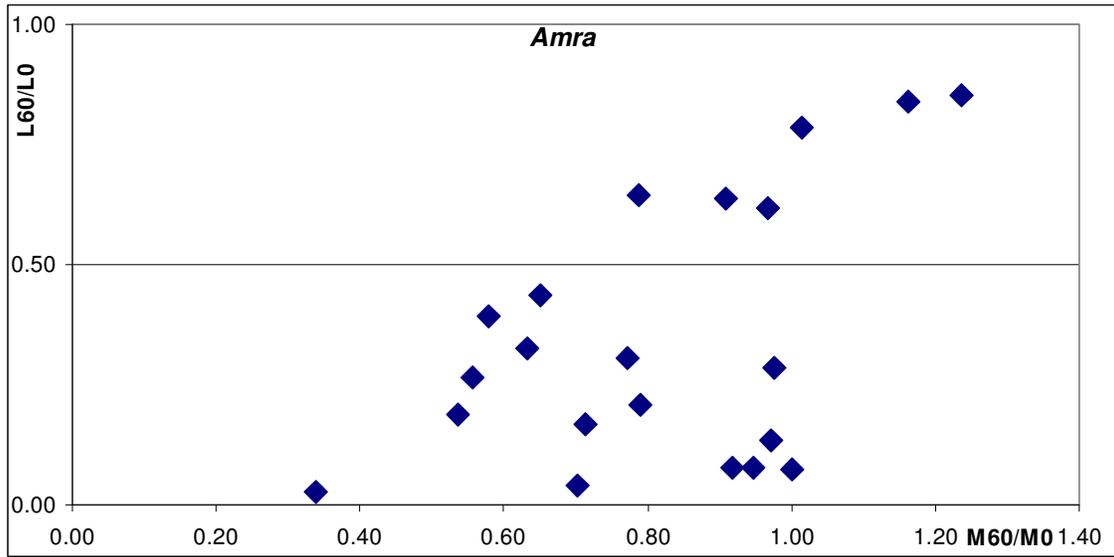
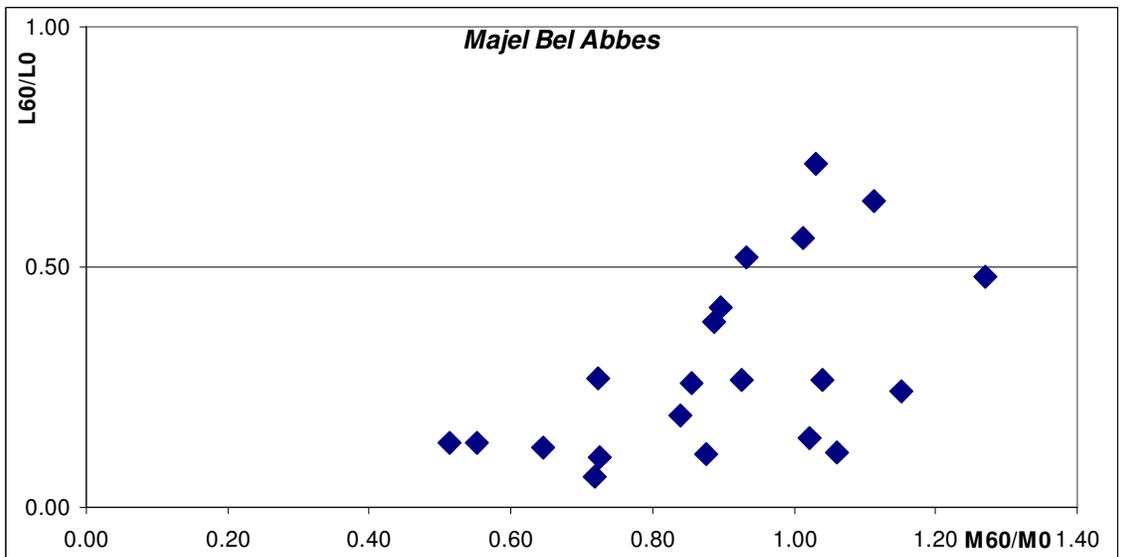
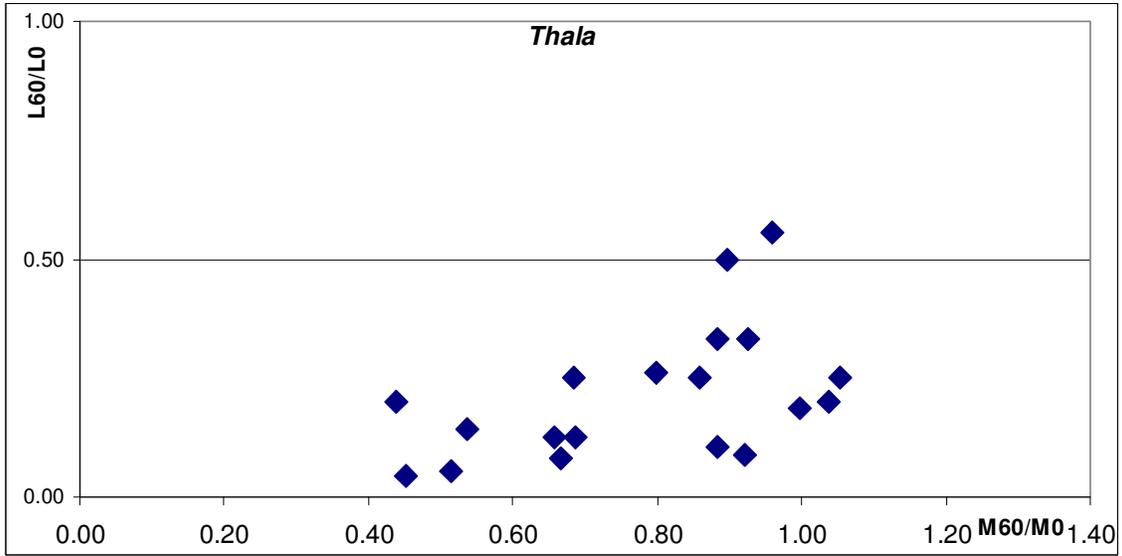
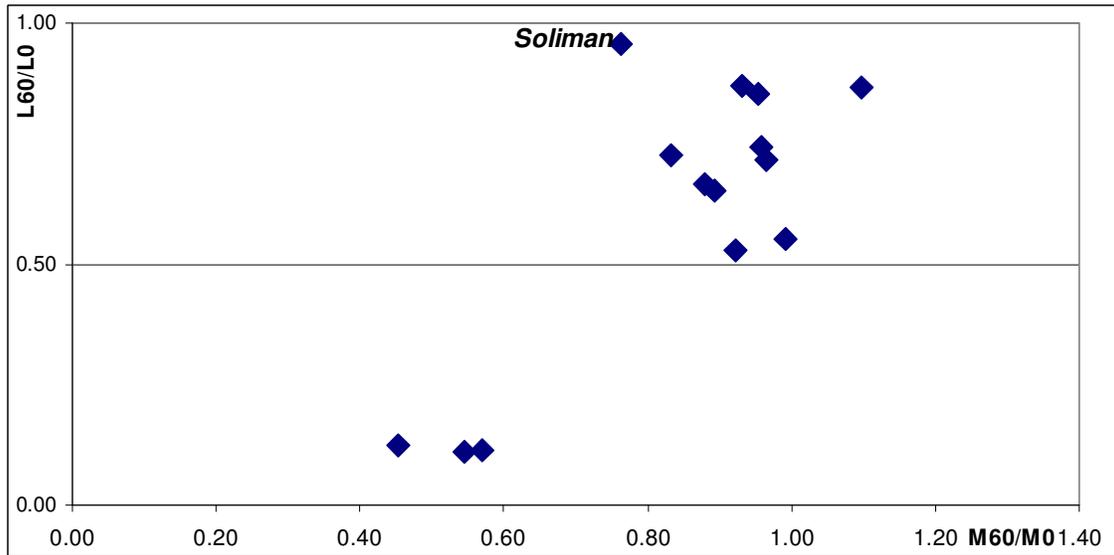
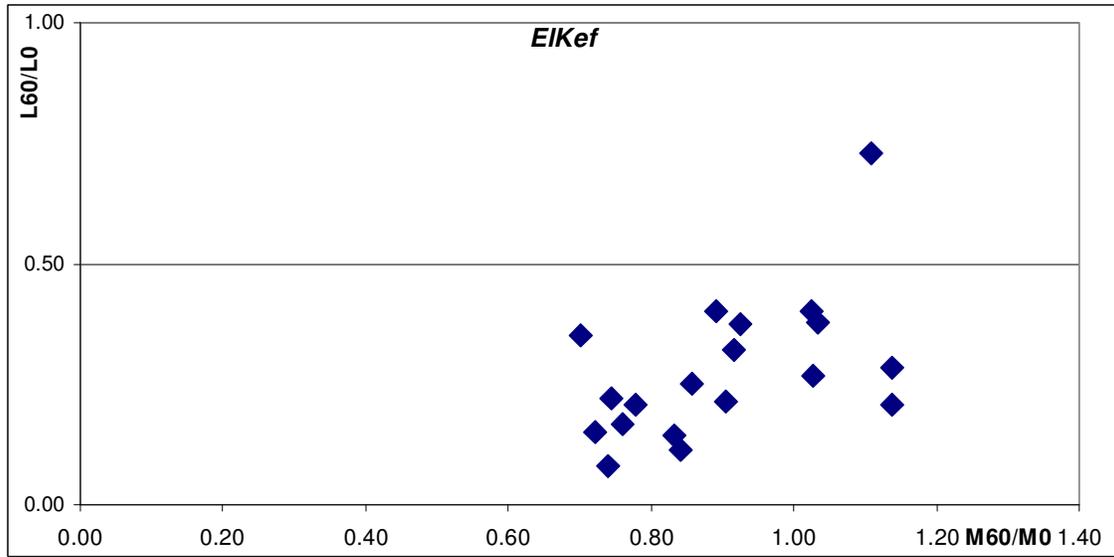


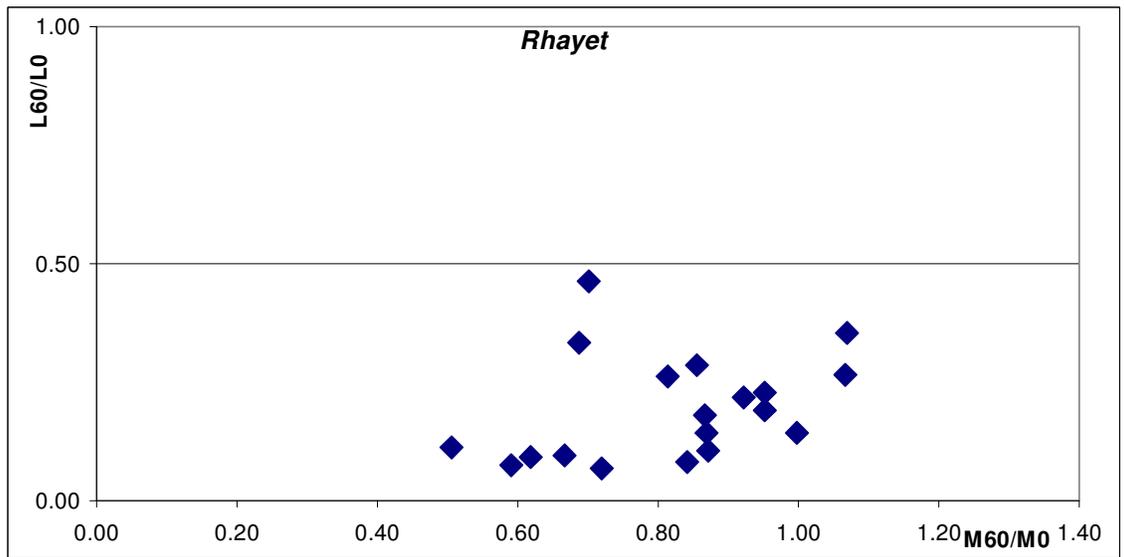
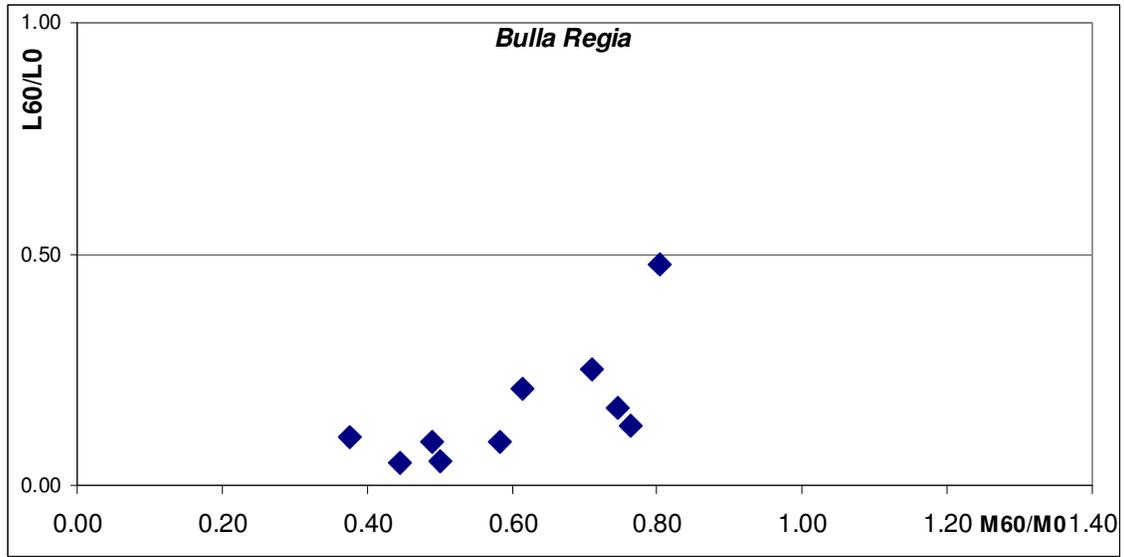
Figure 40 : Représentation du rendement en longueur des tiges (L60/L0) en fonction de celle en MSA (M60/M0) sous l'effet de 60mM de sel.











Commentaires

Que peut-on conclure de nos observations ?

Nous confirmons que le caractère Longueur des Tiges est le plus affecté par la salinité pour toutes les populations sauf Soliman. Mais l'analyse plante à plante nous a permis de mettre en évidence une diversité intra-population qui se révèle par la dispersion des données et/ou leur distribution, modale ou bimodale, en présence ou non de sel. Cette diversité est plus ou moins marquée selon les populations.

Le caractère MSA a une diversité beaucoup plus faible, l'application de sel ne modifiant que peu ce caractère. La population Bulla Regia faisant exception avec une sensibilité assez forte.

L'étude de toutes les populations démontre que les caractères Longueur des Tiges et MSA ne sont pas corrélés génétiquement ni physiologiquement.

Il est clair qu'il faudra plus tard faire une analyse lignée par lignée en utilisant les lignées génotypées au chapitre I afin de pouvoir corréler génotypes et phénotypes et d'identifier des lignées contrastées qui seront la base d'une future analyse génétique.

Les lignées provenant des populations poussant sur des terrains salins peuvent elles être distinguées des autres ? Mis à part, la population Soliman qui semble assez tolérante au stress salin les 2 autres populations (Enfidha et Deguache) ne s'en distingue pas des autres populations.

VI. Discussions et conclusion générales

Les légumineuses et leurs symbiotes naturelles ont attiré l'attention des écologistes, du fait de leur tolérance aux conditions environnementales extrêmes comme la salinité, la sécheresse sévère et les températures élevées. En plus, les Rhizobia des légumineuses poussant dans la nature établissent des symbioses effectives sous ces contraintes (Zahran 2001).

Il faut signaler que les effets de la salinité sur la croissance et la productivité ne sont pas toujours négatifs. Nous avons observé que des concentrations faibles en NaCl (15 mM) dans le milieu a conduit à une stimulation de la production de la matière sèche des organes aériens chez les lignées de *M. truncatula* étudiées. Une réponse analogue a été signalée chez le trèfle cultivé en milieu hydroponique (Ben Khaled *et al.* 2003) et chez des variétés sensibles au sel d'haricot (Jeffrey *et al.* 1985).

L'effet des concentrations de sel est différent selon le caractère mesuré: la nodulation et la longueur des tiges sont touchées à des faibles concentrations, alors que la MSA est influencée à plus fortes concentrations.

Au cours de nos travaux on a mesuré les caractères qui concernent seulement la partie aérienne, vu la limitation du système de culture. Mais il serait intéressant de faire les mesures pour les racines. En effet il a été rapporté que le sel influence le rapport tiges / racines (Mayak *et al.* 2004).

Tolérance au sel en conditions symbiotiques

Au cours de nos expériences, certaines lignées comme Jemalong augmentent le nombre de nodules en présence de sel. Ces nodules sont de petite taille et blanchâtres montrant ainsi qu'ils ne sont pas efficaces pour la fixation de l'azote. Cependant, Zahran et Sprent (1986) rapportent que le processus d'installation de la nodosité est plus sensible au stress osmotique que l'est le métabolisme des racines et des parties aérienne des plantes. Ceci est valable pour d'autres lignées comme TN6.18 qui présente une nodulation très sensible à la présence du sel dans le milieu. Ce comportement ne peut pas être alors généralisé pour toutes les espèces et les lignées.

Le paramètre nombre de nodule n'est pas explicite pour estimer l'effet du sel sur la nodulation. Certains auteurs ont fait une classification selon les propriétés symbiotiques

basées sur l'observation visuelle de formation de nodules et la couleur du feuillage. Une description détaillée de la forme, la couleur et la taille est meilleure pour montrer l'effet du sel sur l'association symbiotique.

L'efficacité de l'activité symbiotique dépend des souches de rhizobia, de la plante hôte et des conditions environnementales. Peu d'information est disponible pour les légumineuses et leur Rhizobia associées.

Dans notre travail on a utilisé des souches provenant de sols salins, ces souches sont aussi résistants à la salinité quand elles sont cultivées seules (travaux d'Oksana Kurchak : communication personnelle). D'autres ont trouvé que des souches des *R. leguminosarum* isolées à partir de sols salins ou à partir de sols à hautes températures peuvent survivre en les exposant à de tels stress, mais perdent leur infectivité (Moschetti *et al.* 2005). Seulement ces souches en association à des lignées peu vigoureuses ne leur confèrent pas une meilleure tolérance au sel. Certains auteurs suggèrent que l'efficacité de la symbiose Rhizobium-légumineuse en sols salins est obtenue lorsque les 2 partenaires sont résistants au stress salin (Cordovilla *et al.* 1995).

Craig *et al.* (1991) a montré que des souches rhizobiales isolées d'*Acacia redolens*, se développant dans des zones salines en Australie, produisent des nodules efficaces avec *A. redolens* et *A. cyclops*, se développant dans un sol sableux avec une salinité supérieure à 80 mM NaCl. Ainsi d'autres exemples ont été aussi étudiés avec l'Acacia (Lal et Khanna 1995; Zou *et al.* 1995).

Les souches locales d'origine tunisiennes, en comparaison à celles de référence, semblent conférer une tolérance au sel pour leurs associations symbiotiques avec les plantes de *M. truncatula*. Cette même remarque a été faite avec des souches locales de *Rhizobium leguminosarum* en Italie (Moschetti *et al.* 2005). Selon cette étude, les souches locales ont un spectre de nodulation et de tolérance au sel remarquablement supérieur à celui des souches de références.

Ainsi un catalogue de souches et de lignées résistants aux conditions défavorables isolées à différents sites peut être utile pour faire face à l'altération de conditions locales suite à la modification dans le climat global.

Selon Béna *et al.* (2005), les caractéristiques symbiotiques des plantes, avec la structuration géographique de la diversité bactérienne, apparaissent comme force sélective influençant la distribution géographique des espèces de plantes hôtes.

Diversité de tolérance au sel des lignées de différentes origines

On a remarqué que dans la plupart des cas, les lignées les plus performantes en conditions contrôles semblent être les plus tolérantes après application du stress salin.

Les études concernant la variabilité de réponse au sel chez l'espèce *M. truncatula* ne sont pas nombreuses. Veach *et al.* (2004) ont évalués le rendement des différentes accessions de *M. truncatula* exposés à 4 différentes concentrations de sel allant de 0 à 115 mM de NaCl. Ils ont constaté que les génotypes avec les rendements le plus élevé en absence de sel, le sont aussi en présence des plus fortes concentrations de sel. Cette corrélation entre le rendement en absence et en présence de sel indique qu'il n'y a pas un seul mécanisme d'adaptation à la salinité chez *M. truncatula*.

Le développement des lignées en conditions contrôle, est aussi dépendant de leur quantité initiale de réserve. En effet, les variations de production de biomasse proviennent essentiellement de la mise en place de l'appareil foliaire, qui assure l'interception du rayonnement photosynthétiquement actif. Cette mise en place de l'appareil foliaire est initiée à partir des réserves contenues dans les graines. Cela veut dire que la tolérance au sel est aussi indirectement reliée à la quantité de réserves disponibles dans les graines.

L'augmentation de la concentration de sel diminue le potentiel osmotique dans le milieu de culture (croissance) ce qui implique une réduction de la quantité d'eau disponible pour la plante. Les mécanismes de réponse au sel sont en partie similaires aux mécanismes de réponse à la sécheresse (Blumwald 2000). De cette façon les études réalisées sur les lignées de *M. truncatula* en présence de sel peuvent renseigner aussi sur leur tolérance à la sécheresse.

AVG et nodulation

La moindre perturbation environnementale peut augmenter la biosynthèse d'éthylène. Cette perturbation est très variable selon l'espèce et aussi pendant le cycle de développement de la plante (Hall et Smith 1995).

L'éthylène est considéré comme un signal secondaire de l'induction de mécanismes de défense chez les plantes. En effet, les réponses des plantes sont modelées par la variation du taux de biosynthèse d'éthylène induit par le stress.

Durant l'interaction symbiotique l'éthylène inhibe la formation de nodules. Des travaux suggèrent que cette inhibition peut être le résultat de l'effet de l'éthylène sur le

développement de la plante tel que l'élongation racinaire, déterminante pour l'invasion par les rhizobia (Oldroyd *et al.* 2001).

La nodulation de *Medicago sativa* est bien touchée par la biosynthèse d'éthylène (Ligero *et al.* 1991) et l'AVG permet une accélération de nodulation et l'augmentation du nombre de nodules produit. Cette même observation a été retrouvée avec les lignées de *M. truncatula* étudiées dans ce présent travail (Voir plus de détails dans l'annexe 6).

Identification d'un matériel végétal polymorphe qui peut être utilisé pour des analyses génétiques

Une diversité de réponse au sel sous alimentation azotée minérale et en symbiose avec différentes souches a été notée chez les lignées locales de *M. truncatula*.

La tolérance au sel du partenaire végétarien étant importante pour la tolérance au sel de l'association symbiotique, les travaux présentés dans ce chapitre ont permis de distinguer des lignées tolérantes et d'autres sensibles à la présence du sel dans le milieu.

A partir de ce travail, plusieurs couples de lignées sont utilisés pour des analyses physiologiques (Aydi *et al.* 2004; Mhadhbi *et al.* 2005) ou génétiques liées aux mécanismes de tolérance au sel comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

Chapitre 3

Bases génétiques de la tolérance au stress salin

I. Introduction

Utilisation des ressources génomiques pour l'amélioration de la tolérance au sel

La nécessité d'augmenter les surfaces cultivées crée une pression de plus en plus forte pour trouver une solution au problème de la culture des plantes sur sols salins.

Le développement de la génomique et des marqueurs moléculaires durant ces dernières années a ouvert de nouvelles possibilités pour améliorer les stratégies de sélection. De nombreuses techniques puissantes se sont développées pour altérer des gènes et leur expression dans des plantes. La gestion et la manipulation de la variabilité génétique ont rendu possible la possibilité de l'étiquetage de certains gènes. Ce qui permettrait, en théorie, de construire des génotypes ayant de plus en plus de gènes ou d'associations de gènes favorables.

D'une façon large, la sélection assistée par marqueurs (SAM) correspond à toute forme possible d'utilisation des marqueurs dans le processus d'amélioration. L'une des principales applications pour le sélectionneur est le processus de criblage qui permet de bien illustrer la variation attendue. Ceci est particulièrement important de même que la cartographie précise des marqueurs. Mais ces techniques n'ont, jusqu'à présent, que peu été utilisées pour l'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques. En effet la tolérance au sel, comme la plupart des caractères qui intéressent les sélectionneurs et les agronomes, sont complexes. Ces caractères qui manifestent une variation phénotypique continue, suivant souvent une distribution normale, sont appelés caractères quantitatifs ou complexes et leur hérédité est définie comme polygénique.

Le phénotype de ces caractères est déterminé (en proportions variables selon le type de caractère) par le génotype et l'environnement. Grâce aux approches statistiques de la génétique quantitative, il est possible d'estimer la proportion de la variabilité phénotypique expliquée par les effets des gènes, ce qui correspond à l'héritabilité d'un caractère quantitatif. Chacun des locus qui contribuent à la variabilité génétique de ces caractères est appelé QTL, en anglais « Quantitative Trait Locus ». La détection des QTL permet de décomposer les caractères quantitatifs en leurs composantes mendéliennes, et donc de déterminer le nombre de locus en cause, leur position dans le génome et leurs effets. Une fois les QTLs identifiés, ils peuvent être validés et caractérisés dans plusieurs conditions environnementales ou dans plusieurs fonds génétiques: lignées isogéniques (NILs) ou des familles hétérogènes (HIFs) (Borevitz et Chory 2004). Les lignées NILs contiennent des petits fragments introgressés dans

un fond génétique isogénique, alors que les familles HIFs dérivent d'une lignée avec une seule recombinaison hybride qui ségrége pour une seule région QTL dans un fond génétique hybride qui est un mélange des 2 génomes parents. NILs et HIFs sont aussi un matériel de départ pour une cartographie fine et un clonage de QTLs.

Il reste ensuite à identifier les séquences qui peuvent rendre compte de l'effet de certains QTLs. Cette stratégie (dite Stratégie Gènes Candidats) consiste à cartographier des séquences d'ADN caractérisées comme susceptibles d'intervenir dans les mécanismes physiologiques régissant le caractère étudié. Lorsqu'on dispose de la séquence complète du génome, l'annotation de ce dernier permet de suggérer des gènes dans l'intervalle QTL retrouvé. Pour certains caractères quantitatifs, l'étiquetage des gènes est plus facilement réalisable par la stratégie de "gènes candidats" que par le clonage positionnel. La prédiction de fonctions de gènes et la comparaison avec d'autres plantes aide pour la sélection de gènes candidats. Par exemple, chez le riz, 3 QTLs ont été identifiés avec gènes candidats dont les fonctions étaient connues d'après les travaux faites avec *Arabidopsis* (Kojima *et al.* 2002).

Les QTLs de salinité

Les QTLs identifiés concernent différentes étapes de réponse au stress salin : le développement végétatif, la survie de la plante et le transport ionique.

Chez la tomate il a été reporté (Foolad *et al.* 1997) que 8 régions génomiques sont associées à la tolérance au sel en utilisant des marqueurs RFLP. Breto *et al.* (1994) ont identifié aussi chez la tomate, 6 marqueurs associés à des caractères concernant le fruit sous stress salin.

Chez le riz (*Oryza sativa*), un total de 16 marqueurs AFLP sont associés à la concentration ionique dans les parties aériennes (Flowers *et al.* 2000).

Chez un ancêtre sauvage du soja, *G. soja*, 6 marqueurs RAPD ont été associé avec la tolérance au sel, mais la position génomique de ces marqueurs reste à vérifier (Zhang *et al.* 1999). Chez le soja un QTL majeur a été identifié, à côté d'un marqueur SSR, conditionnant la tolérance au sel dans deux conditions environnementales différentes (Lee *et al.* 2004).

Cependant, quelques auteurs (Foolad *et al.* 1999; Tozlu *et al.* 1999) ont rapporté une forte interaction génotype x environnement pour les QTLs associés à la tolérance au sel.

Mon projet de Thèse

Au cours de ma Thèse, j'ai utilisé une approche de génétique quantitative pour identifier les bases génétiques de la tolérance de *M.truncatula* à la salinité. Une carte génétique préalablement réalisée au laboratoire m'a permis de détecter des QTL contrôlant des caractères adaptatifs à la présence d'une forte salinité dans le milieu chez *M. truncatula*.

II. Méthodologies de détection des QTL : l'étude du contrôle génétique des caractères complexes

La tolérance au sel, comme la plupart des caractères qui intéressent les sélectionneurs et les agronomes, sont complexes.

Ces caractères qui manifestent une variation phénotypique continue, suivant souvent une distribution normale, sont appelés caractères quantitatifs ou complexes et leur hérédité est définie comme polygénique. Le phénotype de ces caractères est déterminé (en proportions variables selon le type de caractère) par le génotype et l'environnement. Grâce aux approches statistiques de la génétique quantitative, il est possible d'estimer la proportion de la variabilité phénotypique expliquée par les effets des gènes, ce qui correspond à l'héritabilité d'un caractère quantitatif. Chacun des locus qui contribuent à la variabilité génétique de ces caractères est appelé QTL, en anglais « Quantitative Trait Locus ».

La génétique quantitative nous offre une vision générale des propriétés génétiques de ces caractères (nombre approximatif, proportion de la variance génétique expliquée par les effets additifs, de dominance et d'épistasie), mais c'est grâce à la détection des QTL que nous pouvons déterminer avec plus de précision le nombre de locus en cause, leur position dans le génome et leurs effets (Tanksley 1993; De Vienne et Causse 1997). Ce type d'analyse consiste à décomposer les caractères quantitatifs en leurs composantes mendéliennes, les QTL, et elle est basée sur la recherche systématique de déséquilibre de liaison (ou association statistique) entre les allèles aux marqueurs cartographiés et les locus contrôlant les caractères. Bien que la première association entre un marqueur morphologique et un locus contrôlant un caractère quantitatif remonte au début du siècle passé (Sax 1923) et que le principe de la détection des QTL ait été formulé en 1961 par Thoday (Thoday 1961), ce n'est qu'à partir de la fin des années 80 que la disponibilité d'un grand nombre de marqueurs moléculaires a permis la construction de cartes génétiques et le développement des méthodes statistiques

d'analyse des données qui ont favorisé l'essor des études de recherche de QTL (Tanksley 1993).

Depuis ces dernières années, de nombreuses ressources génomiques et outils sont disponibles pour faciliter la recherche et la cartographie de QTL ainsi que le clonage des gènes correspondants à ces QTLs. Ainsi, on peut citer, le séquençage du génome, des milliers de marqueurs moléculaires, des microarrays, des collections de mutants sont appliqués à la cartographie des QTLs facilitant l'utilisation des ressources naturelles pour la recherche de gènes.

II.1. Méthodes

J'évoquerais en premier lieu les principes de base de la recherche de QTLs et les principaux modèles et outils statistiques développés en ce sens.

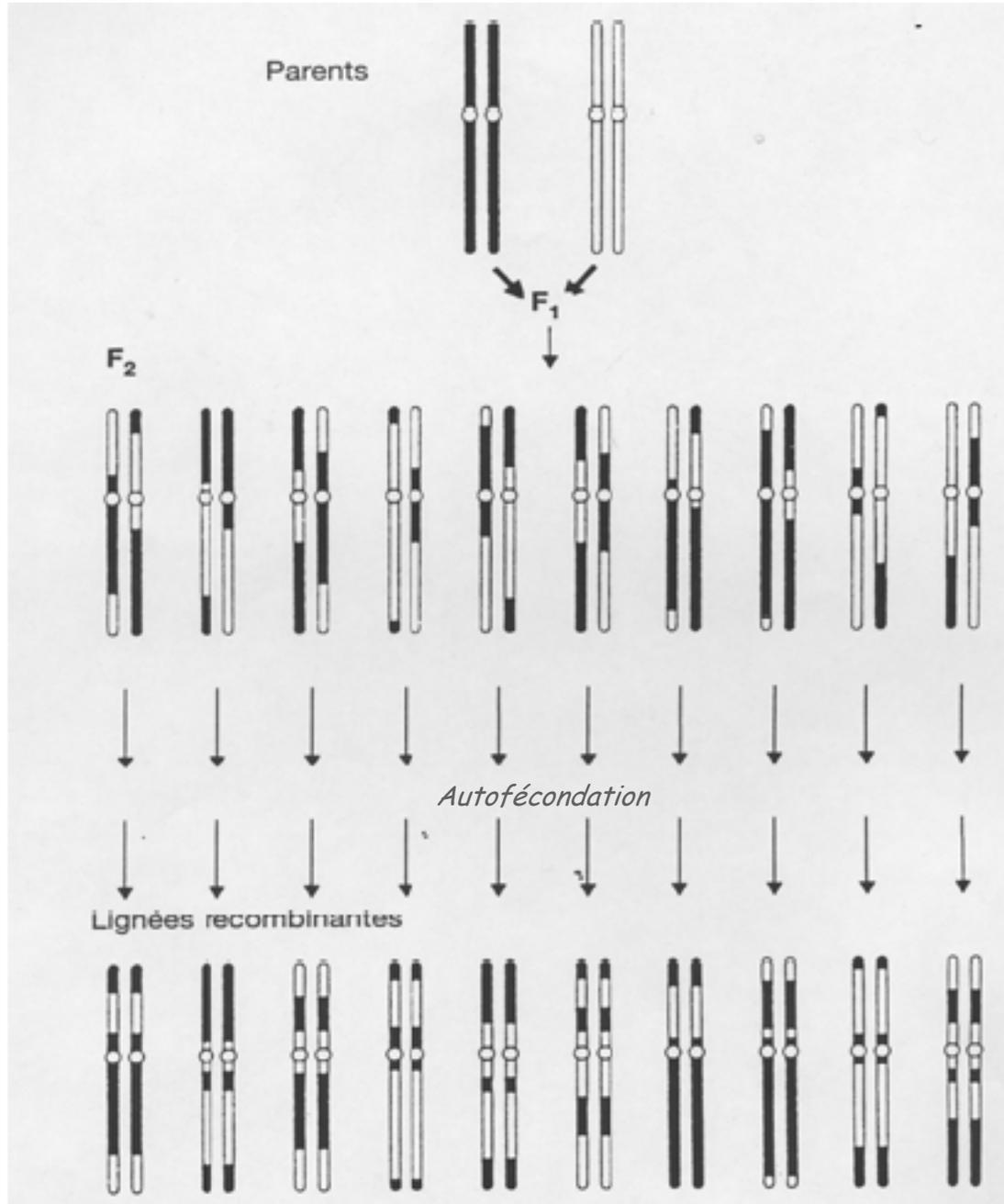
II.1.1. Populations en ségrégation

La recherche de QTLs est basée sur un matériel dans lequel existe de la variabilité génétique visible. Une descendance en ségrégation permettra de faire la relation entre le déséquilibre de liaison et la distance génétique, ce qui est la clef à la fois de la cartographie des marqueurs et des QTLs.

Dans le cas de *M. truncatula*, il est fréquent que les parents soient homozygotes purs en raison du fort taux d'autogamie de cette espèce (Bonnin *et al.* 1996). Le type de population en ségrégation le plus souvent utilisé est une population de RILs (Recombinant Inbred Lines) issue de F2 provenant de l'autofécondation d'individus F1 ou de back-cross (BC) dans lesquels chaque plante individuelle doit être analysée tant au niveau phénotypique que génotypique. Or ce génotype est déterminé par la présence d'un certain allèle aux marqueurs moléculaires du génome.

Ce type de populations est obtenu par autofécondations successives d'individus F2 (Figure 41). A chaque génération un individu est choisi (processus du SSD, *single seed descent*), qui sera à l'origine de la génération suivante. Ces populations de lignées offrent plusieurs avantages :

Figure 41: Lignées recombinantes. Chaque paire de chromosomes schématise la structure du génome d'une plante. Les portions (noires ou blanches) représentent les contributions des lignées parentales.



- le taux d'hétérozygotie diminue, il est divisé par 2 à chaque génération (il n'est plus que de 3% environ à la génération F6)

- après plusieurs autofécondations, tous les individus d'une lignée n sont génétiquement identiques entre eux et identiques à la lignée $n-1$ (à l'hétérozygotie résiduelle près)
- par le jeu des méioses successives chaque lignée correspond à une combinaison particulière d'allèles (lignée recombinantes ou Recombinant Inbred Lines, RILs)

Finalemment chaque lignée recombinante représente la fixation d'une combinaison unique et aléatoire des génomes parentaux.

Les meilleurs résultats devraient donc être en théorie obtenus dans des populations issues de croisements entre des lignées génétiquement distantes, pour les quelles on maximise la probabilité d'observer de la variabilité aux locus neutres et non neutres (Gallais et Rives 1993). Mais, dans la pratique, le choix des génotypes de départ est le plus souvent fait sur la base de l'observation d'une diversité phénotypique pour le (ou les) caractère(s) travaillé(s).

II.1.2. Carte génétique

Dans une population en ségrégation nous pouvons nous baser sur le déséquilibre de liaison pour calculer des distances génétiques entre locus. En effet le taux de recombinaison observé entre deux locus est une estimation de la distance qui les sépare. La population en ségrégation permet donc de construire une carte génétique qui est un maillage couvrant la totalité du génome de la plante, basé sur un certain nombre de marqueurs génétiques.

Ces marqueurs génétiques représentent chacun un locus polymorphe (au niveau du quel on peut identifier l'allèle parental présent) et si possible codominant (au niveau du quel on peut distinguer l'hétérozygote de chacun des allèles parentaux).

La carte génétique est dite saturée lorsque tout point du génome est lié au moins à un marqueur, ce qui est nécessaire pour assurer une recherche de QTLs qui couvre l'ensemble du génome. Cette carte permettra alors pour chacun des individus de la population, l'estimation du génotype à tout point du génome, à partir de la connaissance du génotype aux marqueurs liés à ce point. On peut dire que l'on infère le génotype à un locus en fonction du génotype connu de marqueurs liés.

II.1.3. Phénotypage d'une population

Quelle que soit la fonction physiologique étudiée, il s'agit pour « phénotyper » une population d'attribuer à chacune des lignées la valeur mesurée d'un caractère. Ce caractère pourra être intégrateur, c'est-à-dire résultant de la mise en œuvre de plusieurs fonctions, ou bien un caractère « simple » correspondant à une étape physiologique donnée, supposée être

contrôlée par moins de loci. En fait, le nombre de QTLs contrôlant ces caractères ne dépend pas toujours de la complexité ou de la simplicité du caractère (Vedele et Loudet 2001).

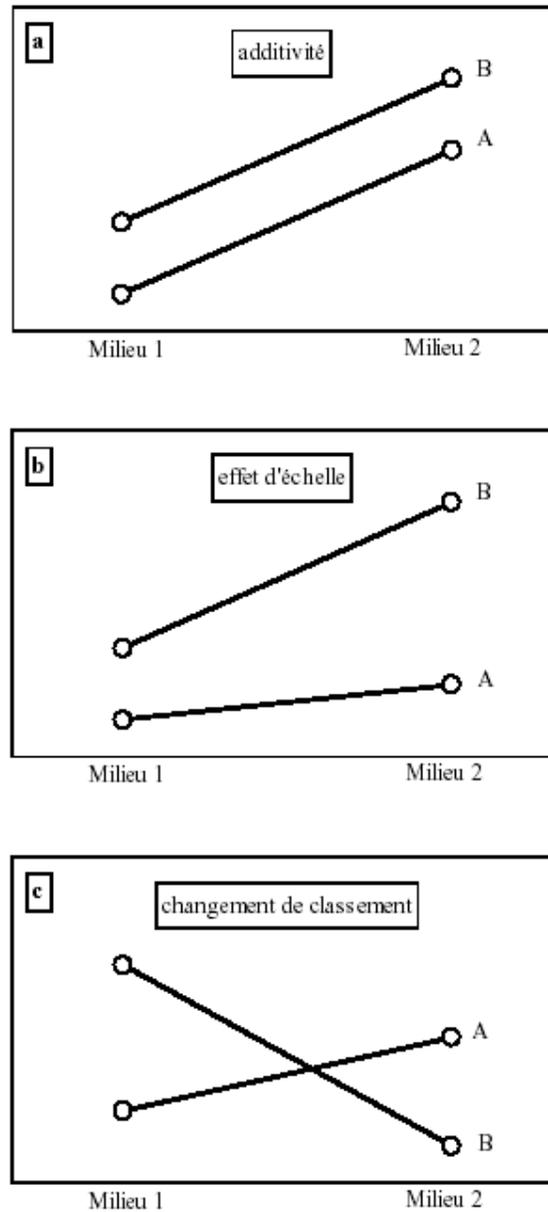
Une représentation graphique permet de rendre compte de la manière dont les valeurs numériques mesurées se répartissent dans la gamme de variation observée: c'est la distribution. Cette distribution forme une courbe en cloche, qui est la caractéristique de la loi Normale, renseigne sur la variation continue des caractères quantitatifs étudiés. Toutefois, les caractères pour les quels on ne peut pas admettre la normalité de la distribution nécessitent un traitement approprié. Par exemple, une transformation mathématique des données par des fonctions tel que le logarithme, la racine carrée, etc., permet souvent de normaliser la distribution.

II.1.4. Effet environnement

Des conditions environnementales peuvent induire d'importantes variations des caractères quantitatifs (Zhuang 1997; Teulat *et al.* 2001). Pour caractériser une modalité particulière d'un facteur de milieu contrôlé, là encore, il est naturel de calculer la valeur moyenne des individus qui sont soumis à cette modalité. Exprimée en écart à la moyenne de la population, cette valeur moyenne est, par définition, l'effet moyen de la condition considérée. Cette analyse suppose cependant que les différents génotypes soient répartis de façon équilibrée entre les différentes conditions de milieu.

Les implications de l'additivité supposée des effets du génotype et du milieu sont illustrées à la figure 42. Si le passage d'une condition de milieu à une autre se traduit, pour un génotype donné, par un certain écart de moyenne phénotypique, alors cet écart doit se retrouver pour un autre génotype à l'occasion du même changement de conditions de milieu: l'écart entre les moyennes relatives aux différentes conditions de milieu est le même pour tous les génotypes. Pareillement, le classement des génotypes et l'écart entre leurs valeurs moyennes est le même sous différentes conditions de milieu. L'additivité entre les effets du génotype et du milieu implique qu'une condition de milieu donnée affecte tous les génotypes de la même façon

Figure 42: Représentation de différentes possibilités de combinaison des effets du génotype et du milieu. A et B représentent deux génotypes différents. En ordonnée, moyenne phénotypique pour un génotype donné dans une condition de milieu donnée.



(Figure 42, cas a), et qu'un génotype donné confère le même avantage (ou désavantage) quel que soit le milieu dans lequel se développe l'individu correspondant.

Par définition, on dit qu'il y a interaction génotype x milieu lorsque l'on s'écarte de la situation d'additivité, c'est-à-dire lorsqu'une condition de milieu affecte différemment les génotypes comparés et que l'écart entre les génotypes n'est pas le même selon les conditions de milieu.

Ce phénomène peut avoir plus ou moins d'ampleur et des conséquences pratiques différentes. Notamment, on distingue le cas où l'écart entre les génotypes dépend des conditions de milieu mais leur classement est inchangé (figure 42, cas b), et le cas où le classement des génotypes est modifié (figure 42, cas c).

Fondamentalement, l'interaction entre les effets du génotype et du milieu est un concept statistique, dont la mise en évidence passe par les techniques de l'analyse de variance.

II.2. Modèles et outils de recherche de QTLs

«Le génotype a-t-il un effet sur le phénotype ?» c'est la question à la quelle une recherche de QTLs essaye de répondre tout au long du génome de la plante étudiée. Ceci permettra de construire une carte des zones chromosomiques qui influent sur l'expression de la valeur du caractère étudié.

Le principe de détection des QTL est simple: il s'agit de rechercher les marqueurs dont la ségrégation des allèles dans la descendance montre une liaison statistique significative avec la valeur phénotypique d'un caractère donné chez les individus. Bien que le principe soit très simple, les méthodes statistiques de détection des QTL sont plutôt complexes (Doerge 2002). Nous ne considérerons pas les détails statistiques des différentes approches, mais nous nous focaliserons sur la description et l'évolution des méthodes d'analyse en considérant les avantages et les défauts de chacune.

II.2.1. Méthodes

II.2.1.1. Méthode Marqueur par marqueur

Au début des années 80, c'est la première méthode de détection de QTLs, utilisée avec des marqueurs isoenzymatique (Tanksley *et al.* 1982) et plus tard avec les débuts des marqueurs moléculaires (Edwards *et al.* 1987; Paterson *et al.* 1988); Elle consiste à tester l'effet du génotype à chaque marqueur individuellement.

En effet pour chaque marqueur, on peut tirer les individus selon l'allèle qu'ils portent (classes génotypiques), calculer les moyennes de chacun des groupes constitués et tester par une analyse de variance l'existence ou non de différences entre ces moyennes.

L'explication de l'effet du génotype au marqueur passe par la présence d'un QTL polymorphe génétiquement lié à ce marqueur. Le fait de classer les individus selon leur génotype au locus marqueur les classe également pour le génotype au QTL. Si le polymorphisme au QTL a un effet sur la valeur du caractère (les deux allèles parentaux en ségrégation dans la population n'apportent pas la même valeur au caractère), alors on détectera une différence significative entre les moyennes des classes génotypiques. Cette méthode ne peut pas dire si un marqueur est associé à un ou plusieurs QTL, elle ne permet pas d'estimer la position probable du QTL et en plus les effets des QTL sont largement sous estimés puisqu'ils sont confondus avec des recombinaisons entre locus marqueur et le QTL. Ces inconvénients viennent du fait que cette méthode n'utilise pas la totalité de l'information contenue dans les données de marquage.

II.2.1.2. Cartographie d'intervalle

III.2.1.2.1. IM Interval Mapping

Cette méthode a été développée par la suite en se basant sur l'utilisation de l'information contenue dans un intervalle encadré par deux marqueurs.

Pour ces QTL, le génotype de chaque lignée est inféré (de façon probabiliste) en fonction des génotypes connus des marqueurs flanquants. Pour cette approche, les méthodes statistiques développées pour tester l'existence d'un QTL et estimer son effet sont basées soit sur l'utilisation du maximum de vraisemblance.

Plusieurs auteurs ont développé une approche semblable basée sur des tests de régression linéaire (Haley et Knott 1992). Cette approche utilise les mêmes informations que l'IM, possède l'avantage d'être plus rapide (moins coûteuse en temps de calculs informatique) et plus facile à adapter à des modèles plus complexes (Xu 1998).

Cependant du fait de certains biais statistiques, les méthodes utilisant la régression semblent moins précises et moins puissantes (Kao 2000), au moins dans certaines situations (cas de 2 QTLs proches).

La principale limitation de la technique d'IM, est que le modèle ne considère qu'un seul QTL à la fois lors de la recherche. Ce qui ne permet pas d'identifier plusieurs QTLs présents sur un même chromosome (Zeng 1994).

De plus l'IM ne tient pas compte des QTLs indépendants de celui recherché dans le modèle, qui développent un bruit de fond important spécifique à chaque lignée.

III.2.1.2.2. Cartographie d'intervalle composite: CIM Composite Interval Mapping

Pour tenir compte des problèmes de QTLs multiples, plusieurs auteurs ont proposé de combiner les techniques de l'IM et de régression multiple (Jansen 1993; Zeng 1993).

Zeng nomma cette technique Composite Interval Mapping. Le principe de l'approche est que en recherchant un QTL éventuel dans un intervalle, l'utilisateur introduit d'autres marqueurs en tant que cofacteurs dans le modèle, de façon à contrôler l'effet des autres QTLs en ségrégation (le bruit de fond génétique).

La réduction de la variance résiduelle qui en résulte a des effets très positifs sur la puissance du test par rapport à l'IM simple (Wu 1999). Le bon choix des cofacteurs (chacun représentant un QTL) conditionne de façon importante la puissance du test de CIM, qui doit servir à maximiser les chances de trouver plus de QTLs, tout en conservant (et même en améliorant) la précision de leur cartographie (Zeng 1993).

D'après les simulations, la séparation de QTLs liés (par ex à 20 – 25 cM l'un de l'autre) est possible avec cette méthode dans des cas classiques.

Idéalement, les modèles les plus puissants de recherche de QTLs devraient permettre de rechercher simultanément plusieurs QTLs dans le génome. Il faudrait alors tenir compte de plusieurs intervalles pour construire un véritable modèle à QTLs multiples. Cette stratégie a été effectivement développée sous le nom *Multiple Interval Mapping*.

III.2.1.2.3. MIM Multiple Interval Mapping

Cette stratégie récemment développée : MIM (Kao *et al.* 1999; Zeng *et al.* 1999), repose sur un algorithme complexe destiné à établir un modèle multi-QTL, à le tester, puis le reformuler en fonction des résultats, jusqu'à obtenir le modèle global le plus satisfaisant c'est à dire celui qui maximise le test. Mais plusieurs problèmes se posent encore en particulier concernant les règles d'arrêt de l'algorithme en fonction de la maximisation du modèle (Zeng *et al.* 1999). Ces contraintes, conjuguées à la complexité des calculs (durée d'analyse informatique très importante) limitent encore l'intérêt de l'utilisation du MIM bien que cette méthode paraisse très prometteuse pour l'avenir.

Les programmes d'amélioration des plantes rencontrent un problème d'intégration de la génomique et de l'analyse QTL afin d'identifier des séquences génomiques contrôlant la variation des caractères intéressants. En dépit du développement des bases de données intégratives, qui construisent une carte consensus des gènes et des QTLs, les cartes multiples restent pénibles à manipuler. Néanmoins, c'est une étape critique pour indiquer des Co-

localisation entre les gènes et QTL. Une autre question importante est de déterminer si QTL lié aux mêmes traits ou à celles reliées, est détecté dans des expériences indépendantes. Des outils statistiques tels que le meta-analyse peuvent être utilisés pour répondre à cette question. Le logiciel BioMercator (Arcade *et al.* 2004) a été développé pour automatiser la compilation de cartes génétiques et la méta-analyse de QTL, et pour visualiser des co-localisation entre les gènes et QTL à l'aide d'une interface graphique.

II.2.2. Puissance et fiabilité des analyses statistiques dans la recherche de QTL

Quel que soit le dispositif mis en place, les méthodes statistiques développées pour tester l'existence d'un QTL et estimer son effet sont basées soit sur l'utilisation du maximum de vraisemblance, soit sur l'utilisation des moindres carrés (régression, analyse de variance). Le test statistique le plus utilisé est le test basé sur un rapport de vraisemblance appelé LOD score (*Logarithm of the odds ratio*).

Le LOD score est le logarithme décimal du rapport entre la fonction de vraisemblance dans l'hypothèse de l'existence d'un QTL donné au locus testé et la fonction de vraisemblance dans l'hypothèse de l'absence de QTL. Un LOD score d'une valeur 'X' signifie que la présence d'un QTL est 10^X fois plus probable que son absence, compte tenue des données étudiées. La méthode de cartographie par intervalle pose le problème du seuil de LOD score, à partir du quel on considère que le QTL est significatif.

Ce seuil se situe à l'équilibre entre une valeur élevée qui limite le risque d'erreur de première espèce (une erreur consistant à détecter un QTL alors qu'il n'existe pas en réalité) et une valeur faible qui permet de limiter le risque d'erreur de deuxième espèce (erreur qui consiste à ne pas détecter un QTL qui existe pourtant en réalité).

En utilisant la technique de permutations, qui permet de simuler aléatoirement un nombre quasi infini de situations sur lesquels on peut tester le comportement de la fonction de LOD score, Churchill et Doerge (1994) définissent des seuils empiriques qui se révèlent très utiles. Bien souvent avec cette technique, le seuil utilisé est autour de 2.3 : dans ce cas, l'existence des QTLs qui sont retenus est au moins 200 fois plus probable que leur absence. Au delà du seuil choisi, c'est le sommet du pic de LOD score qui détermine la position probable du QTL sur l'intervalle.

Les différences de performances de ces deux méthodologies sont peu marquées. Les résultats obtenus sont similaires, tant sur la position du QTL que sur l'estimation de son effet (Lander et Botstein 1989; Haley et Knott 1992; Rebaï *et al.* 1995). Le léger avantage en terme de puissance accordé aux méthodes basées sur le maximum de vraisemblance semble être

compensé par la plus grande simplicité des méthodes basées sur les moindres carrés et la possibilité de tester dans ce dernier cas des hypothèses complexes (présence de plusieurs QTL sur un groupe de liaison, interaction entre QTL,...) (Hyne et Kearsey 1995).

II.2.3. Paramètres estimées lors d'une recherche de QTL

II.2.2.3.1. Intervalle de confiance du QTL: IC

La valeur du LOD score donne une idée sur la significativité du QTL à ce locus (plus il est élevé, plus le QTL est significatif). Mais cette position n'est qu'une estimation de la localisation du QTL: elle est entachée d'erreur qui dépend de plusieurs paramètres, en particulier la contribution du QTL à la variation totale. On peut tenir compte de cette erreur en construisant un intervalle de confiance (IC) autour du QTL: il s'agit d'une fenêtre plus ou moins grande dans laquelle il y a les chances que le QTL se trouve (au risque d'erreur près: souvent 5%). Lander et Botstein (1989) proposaient dès le début des approches d'*Interval Mapping* de construire cet IC en déterminant les points qui représentent une chute de 1 LOD de part et d'autre du sommet de LOD score (ce qui revient à une chute d'un facteur de 10 du rapport de vraisemblance). Par la suite, il a été montré que ce type d'intervalle de confiance était anti-conservatif: l'intervalle a moins de chances que prévu de contenir effectivement le QTL, en particulier pour les QTLs dont la contribution est faible et lorsque l'étude est réalisée dans une population de petite taille (Van Ooijen 1992; Mangin *et al.* 1994). Van Ooijen (1992) propose alors d'utiliser un IC basé sur une chute de LOD score de 2 unités, tout en reconnaissant que ces IC sont en général grands et très variables.

Finalement, après ces techniques arbitraires de construction d'IC, une technique de simulation (par *bootstrap*: technique de rééchantillonnage par tirage et remise) a été proposée (Visscher *et al.* 1996). Cette technique semble très intéressante car elle n'est pas basée sur le profil de LOD score. Par contre, d'après plusieurs études, à l'inverse de l'IC basé sur la chute de 1 LOD, l'IC par *bootstrap* est apparemment fortement conservatif, en particulier pour les QTLs dont la contribution est faible (Visscher *et al.* 1996; Walling *et al.* 1998).

II.2.2.3.2. Effet du QTL

La mesure de l'effet QTL recouvre deux paramètres: l'effet additif et la contribution du QTL.

L'effet additif du QTL représente la différence d'effet sur la valeur du caractère des deux allèles parentaux en ségrégation (De Vienne 1998). Schématiquement, ce paramètre est estimé à partir des moyennes des classes génotypiques déterminées au locus testé (Figure 2, additivité

et dominance). Cet effet est exprimé dans l'unité du caractère étudié; de plus il possède un sens (un signe), en référence à l'un des deux parents choisi arbitrairement, puisqu'il correspond à l'effet de la substitution d'un allèle parental par l'autre. Notons que l'estimation de cet effet additif est particulièrement biaisé dans le cas de QTLs multiples liés (Knott et Haley 1992).

La contribution du QTL (R^2) représente le pourcentage de la variation phénotypique totale expliquée par le QTL. En général, on estime R^2 des QTLs à partir de la décomposition de la variance phénotypique totale sur les marqueurs les plus proches des QTLs détectés (Charcosset et Gallais 1996). Cette même analyse de la variance permet d'estimer aussi la contribution des effets d'interactions entre QTLs (effets d'épistasie). Dans le cas idéal (mais irréel) où l'on détecte tous les QTLs qui influent sur un caractère, la somme des R^2 de l'ensemble des QTLs et l'interaction entre QTLs ne peut dépasser l'héritabilité du caractère, puisque celle ci représente la part de la variation totale du caractère qui est d'origine génétique.

II.3. Puissance de détection de QTLs

II.3.1. Effectif de la population

Un très grand nombre d'études montrent que l'augmentation de la taille de la population a des effets sur la puissance de détection des QTLs (Vales *et al.* 2005). Les principaux avantages d'une population de grande taille résident dans le nombre de QTLs détectés et la précision de leur localisation.

II.3.2. Densité des marqueurs génétiques

Globalement on considère qu'il y a relativement peu à gagner à augmenter la densité de marqueurs au delà de 20cM (distance entre 2 marqueurs). De même, la puissance de détection de QTLs est beaucoup plus marquée par l'effet de la taille de la population que par la densité des marqueurs sur la carte génétique. Donc il est préférable d'augmenter le nombre d'individus dans la population plutôt que le nombre de marqueurs (Darvasi et Soller 1995).

II.3.3. Héritabilité du caractère / R^2 du QTL

La mesure d'un caractère plus héritable est en effet moins soumis aux effets environnementaux et ce caractère est contrôlé généralement par des QTLs dont les contributions sont plus importantes (Zeng 1994).

II.3.4. Autres facteurs

La qualité des estimations phénotypiques est un élément fondamental de la puissance de détection des QTLs. C'est pour ça qu'il faut répéter les mesures phénotypiques sur plusieurs plantes par lignées pour pouvoir baisser la variance environnementale (Lander et Botstein 1989). Cependant si on est limité par le volume du travail, il semble préférable d'augmenter le nombre de lignées plutôt que le nombre de répétition par lignée (Knapp et Bridges 1990; De Vienne 1998).

III. Matériel & Méthodes

III.1. Croisements

Les études d'efficiencesymbiotique et de tolérance au sel des lignées locales tunisiennes, ainsi que ceux de référence disponibles au laboratoire, ont permis de ressortir des couples de lignées contrastantes pour différents aspects. Ces couples ont été croisés dans l'objectif de disposer de matériel végétal utilisable pour les études génétiques: les RIL. L'ensemble de ces croisements est listé dans la figure 43, et leur descendance est à différents stades de cultures.

D'autres croisements ont été aussi réalisés, mais pas exploités jusqu'à maintenant vu la lourdeur des cultures occasionnées par chacun d'entre eux.

Au début, on a focalisé notre attention sur le croisement TN6.18 par Jemalong. En effet ce croisement est intéressant du fait de la différence de réponse au sel en association symbiotique avec la souche de *R. meliloti* 2011. La plante TN6.18 étant très sensible et Jemalong tolérante au sel.

Ce croisement s'est avéré par la suite non utilisable, car on s'est rendu compte qu'en génération F2 sa descendance génère beaucoup de plantes non viables. En effet on obtient 28% d'albinos, 36% de plantes jaunes non viables et seulement 37% de plantes normales (Figure 44).

Un croisement entre TN6.18 et TN8.20 a été mis aussi en culture pour avoir la descendance au stade F2. On a rencontré le même problème que le croisement précédent en se retrouvant avec un nombre important de plantes non viables.

Un autre croisement impliquant TN6.18 et Jemalong, mais cette fois la plante femelle est Jemalong, est en cours de vérification pour voir s'il est exploitable pour les analyses génétiques. Car on a émis l'hypothèse que le fond génétique de TN6.18 est non exploitable pour des croisements.

Pour les analyses génétiques de ma thèse on a décidé de choisir un autre croisement avec des RIL au stade minimum de F6 du reste des croisements disponibles, tout en ayant un contraste

Figure 43: Croisements réalisés entre couples de lignées de *M. truncatula* et dont leur descendance est au stade F2 ou RIL.

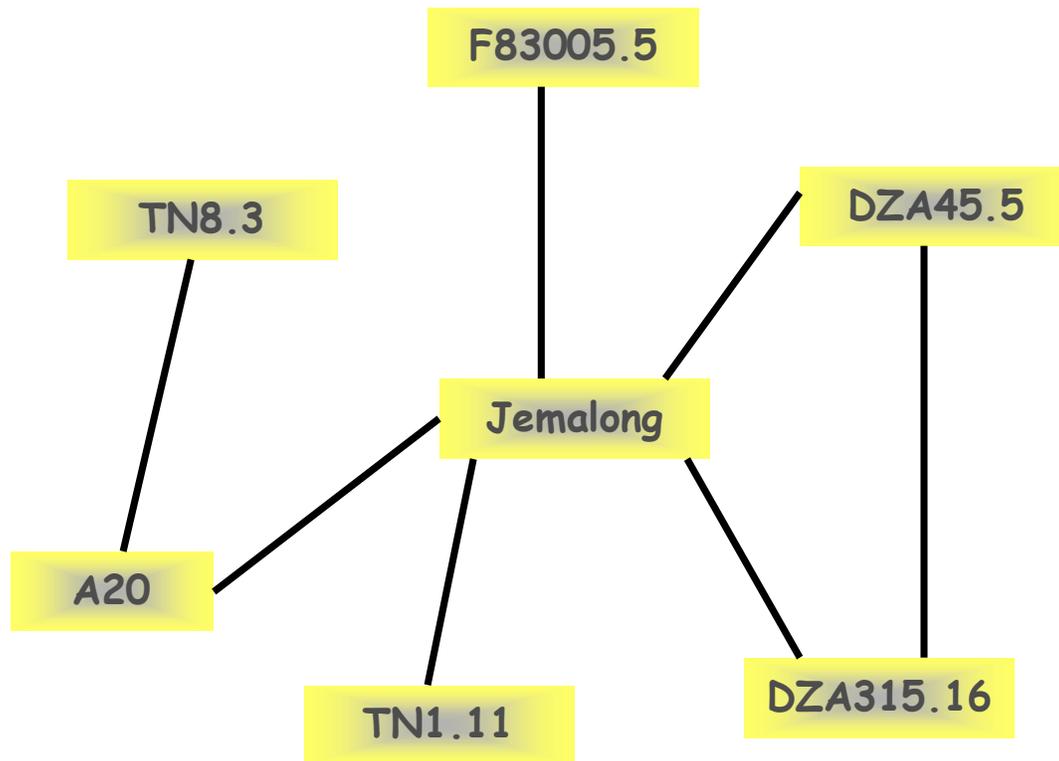


Figure 44 : Germination des graines de la génération F2 issues du Croisement X07 entre TN6.18 et Jemalong.



de tolérance au sel entre les parents. On a pris à la fin les lignées recombinantes LR5, issues du croisement F83005.5 et Jemalong, à la génération F7. La plante F83005.5 est connue pour sa sensibilité au sel et Jemalong modérément tolérante.

III.2. Carte génétique

La carte génétique utilisée pour le croisement Jemalong J6 x F83005.5 (LR5), a été réalisée par l'équipe de Thierry Huguet à Toulouse.

III.3. Dispositif expérimental

III.3.1. Phénotypage des lignées

Notre objectif est de mesurer un grand nombre de caractères sur un effectif important de lignées recombinantes dans deux conditions: en absence et en présence de sel. Ces mesures, faites en conditions environnementales contrôlées, concernent la partie aérienne et racinaire de la plante. Cette analyse a concerné 122 RIL pour la partie racinaire et 124 pour la partie aérienne.

Conditions de croissance en chambre de culture

Nous travaillons en jours longs, soit 16 heures de jours et 8 heures de nuit. La température de jour est de 21°C. L'hygrométrie n'est pas contrôlée: elle reste stable à 90% la nuit et descend jusqu'à 65% le jour.

Mais ces conditions externes d'hygrométrie ont peu d'importance puisque nos systèmes de cultures sont *in vitro*, donc la plante est dans une atmosphère à peu près à 100% de saturation en eau.

Systèmes de cultures utilisés

Organes aériens

La partie aérienne a été étudiée dans des tubes avec 20 ml de milieu de culture Fahraeus solide à 15 % d'agar. Ce milieu de culture est incliné pour permettre une progression plus facile des racines en début de leur croissance (Figure 45). Le milieu de culture utilisé est le milieu Fahraeus contenant 5 mM d'azote minéral (NH₄NO₃). La récolte a lieu au bout de 5 semaines de mise en tubes des germinations, période suffisante pour ressortir les différences entre les parents. L'ensemble des paramètres a été mesuré à la récolte. Ces derniers sont listés dans le Tableau 20, s'intéressant à la croissance végétative de la plante.

Une expérience préliminaire a été réalisée dans une chambre de culture et sur 4 étagères différentes afin de vérifier l'homogénéité des conditions environnementales. Ces conditions ayant été estimées hétérogènes, et afin de minimiser l'effet environnement pour les expériences ultérieures, les tubes ont été tournés chaque jour entre étagères. Cette randomisation a permis à différentes lignées de séjourner dans les mêmes conditions environnementales.

Racines :

Dans le système en tubes, il n'était pas possible d'étudier les racines car, à leur arrivée au fond du tube, ils s'enroulent en tortillon difficile à défaire. En plus du fait que ces racines ne sont pas bien en contact avec le milieu de culture, ce qui risque de biaiser les mesures effectuées sur ces derniers. En conséquence, on a étudié la partie racinaire dans des boîtes carrées de 12 cm de côté contenant de l'ordre de 50 ml du milieu Fahraeus à 15% d'agar (figure 46). Un papier est déposé sur le milieu de culture, pour empêcher le contact direct des racines avec le milieu d'Agar, sachant que ce dernier a un effet inhibiteur sur l'allongement des racines.

Les mesures ont été réalisées au 7^{ème} jour après la mise en boîte et seulement la matière fraîche a été mesurée après 10 jours afin de ressortir plus de différences entre les lignées.

III.4. Analyses statistiques pour la localisation de QTL

La détection des QTL a été réalisée en utilisant les moyennes ajustées les données obtenues à partir de 2 expériences indépendantes. Cet ajustement tient compte des effets variables qui étaient estimés par l'ANOVA pour chaque caractère. Ce qui devrait nous permettre de nous affranchir des conditions environnementales variables.

Le logiciel PlabQTL et la stratégie d'analyse des données

Le logiciel PlabQTL (Utz et Melchinger 1996) (<http://www.uni-hohenheim.de/~ipspwww/soft.html>) a été utilisé pour la détection des QTL. Ce logiciel est disponible gratuitement.

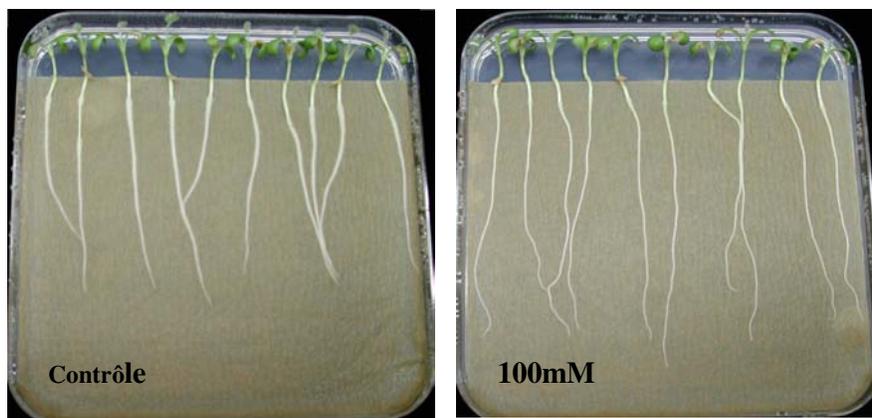
Ce logiciel permet de tester plusieurs modèles statistiques de détection des QTL, de l'analyse par marqueur individuel, au CIM et dans sa version plus récente le MIM. Le logiciel possède trois modèles d'analyse intéressants: l'hypothèse de présence de deux QTL sur le même groupe de liaison peut être testée (Ronin *et al.* 1999); les données dérivant de différents environnements peuvent être analysées à la fois (Korol *et al.* 2001); et enfin, le logiciel peut

Figure 45: Système de culture des parties aériennes: la plante TN8.20 après 60 jours de mise en tubes en absence de sel et en présence des concentrations de 15, 30, 45, 60, 75 et 90 mM de NaCl.

Note: Les bouchons ont été enlevés pour la prise de la photo.



Figure 46: système de culture des parties racinaires: la plante Jemalong après 7 jours de mise en boîtes en absence et en présence de 100 mM de NaCl.



analyser les caractères corrélés selon une option « MultiTraits » qui devrait théoriquement permettre d'identifier les QTL montrant un effet pleiotrope (Korol *et al.* 2001). PlabQTL permet aussi de calculer le niveau de signification par test de permutation selon Churchill et Doerge (Churchill et Doerge 1994) et l'intervalle de confiance par « bootstrap » (Visscher *et al.* 1996). Le logiciel est très convivial et rapide pour les modèles à un seul QTL et un seul caractère. Dans ce dernier cas l'analyse CIM, le test de permutation et le « bootstrap » pour un caractère peuvent demander moins d'une heure.

Le logiciel « MapChart » a été utilisé pour la création des figures relatives à ces cartes génétiques et aux QTL (Voorrips 2002).

III. Mises au points des conditions de culture

1. La croissance racinaire

Pour les mesures de la croissance racinaire, on a testé les concentrations de 0, 50, 75 et 100 mM de NaCl à la lignée J6 et les mesures de la vitesse l'allongement des racines ont été faites au bout 7 jours de mise en tubes (Figure 47).

D'après cette expérience on remarque que la présence du sel dans le milieu accélère l'allongement des racines et la concentration de 50 mM est suffisante pour faire la différence avec le témoin.

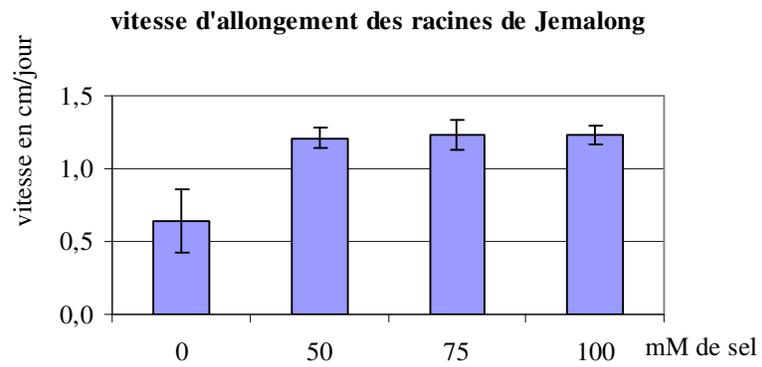
Comme on constate que l'épaisseur des racines est touchée par la présence de sel dans le milieu. Sur la photo de la figure 46, on voit que les racines sont bien plus allongées à 100 mM de sel par rapport au témoin et les racines sont beaucoup plus fines. Mais la mesure de la matière fraîche des racines pourrait être un paramètre discriminant entre les traitements.

IV. Analyse de la population RIL

L'ensemble des lignées recombinantes a été analysé en trois expériences indépendantes. L'objectif était d'analyser de façon reproductible la variabilité phénotypique de la réponse des lignées au stress salin.

Nous avons choisi de n'utiliser la concentration de 45 mM NaCl afin de pouvoir comparer la réponse des organes aériens et des racines soumis à un stress de même intensité.

Figure 47: Vitesse d'allongement des racines de J6 en présence de 0, 50, 75, et 100 mM de NaCl après 7 jours de mise dans les boîtes de Pétri.



La liste des caractères utilisés pour l'analyse génétique est donnée dans le tableau 25.

Distribution de la variabilité phénotypique

Partie aérienne (Figure 48)

Pour la longueur des tiges

Le comportement des parents est contrastant dans les 2 conditions avec une distribution approximativement monomodale en absence de sel centrée sur 7.5 cm, alors qu'en présence de sel cette longueur est réduite à 2.5 cm.

Feuilles

Le nombre de feuille est un caractère très peu variable dans les deux conditions testés et les différences entre les parents ne sont pas très nettes. D'autant que ce caractère est parfois difficile à mesurer du fait de l'existence de nouvelles feuilles émergentes. Dans ce cas le fait de les compter comme feuille entière risque de biaiser les mesures. Ce caractère doit donc être pris avec précaution.

Phaut

L'observation de différentes plantes a révélé que la longueur des pétioles se trouve influencée par l'ajout du sel dans le milieu de culture. Ce caractère ne se trouve variable qu'en comparant les 2 traitements. En effet pour un traitement donné la différence entre la longueur des pétioles est de l'ordre de 1 cm.

La matière fraîche

Le comportement des parents est assez contrastant pour les deux traitements. Pour les RIL, ce paramètre a une distribution normale pour les deux conditions et la variabilité est assez large.

La matière sèche

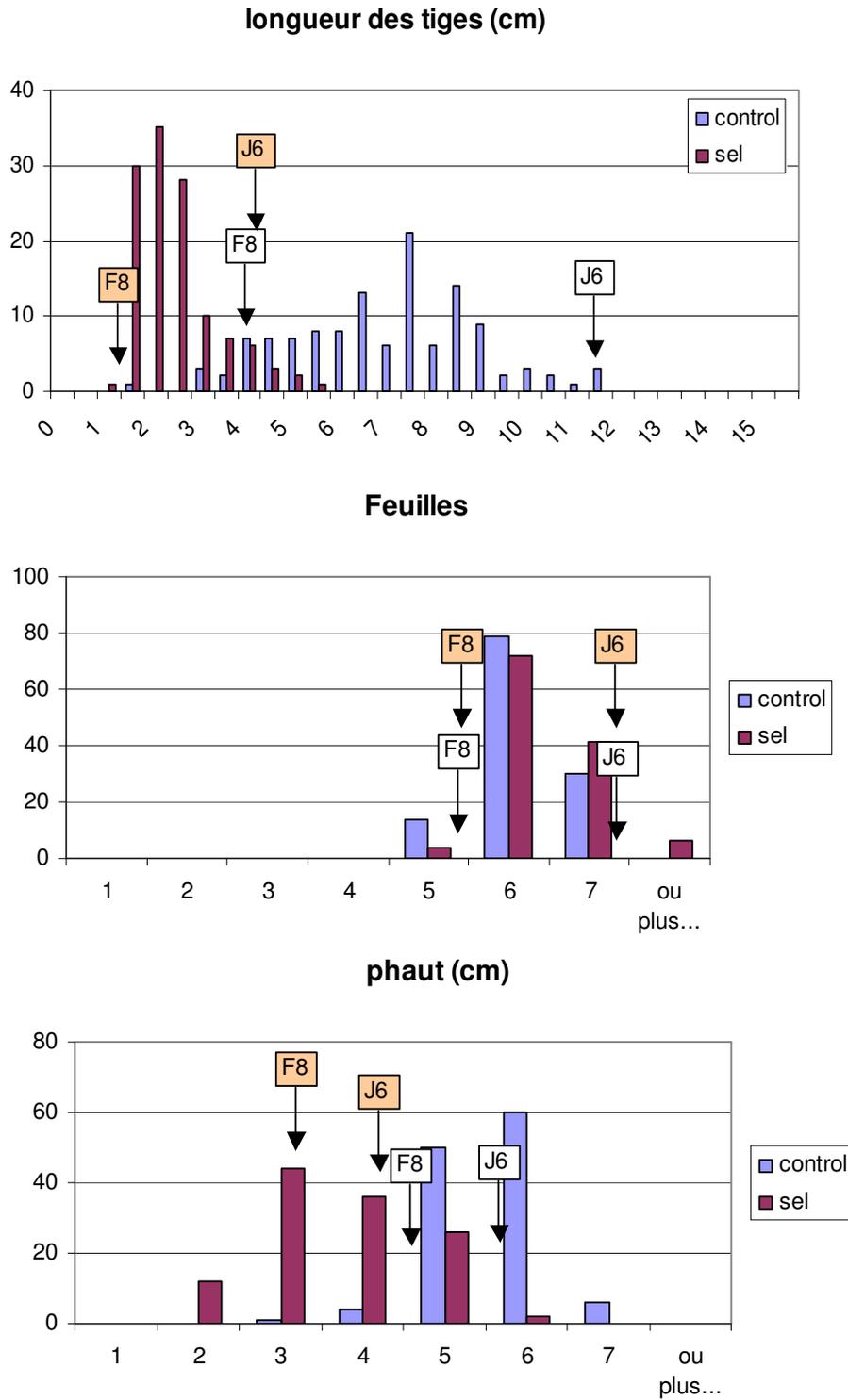
Les différences entre les parents sont moins nettes que par rapport à la matière fraîche. De même, la variabilité de la distribution chez les RILs est réduite. Cette différence entre matière fraîche et matière sèche nous laisse penser que la teneur en eau des plantes pourrait être un caractère intéressant pour distinguer les 2 génotypes.

Tableau 25: Liste des caractères de la croissance végétative relative aux tiges et racines mesurés sur les parents et les RIL du croisement LR5.

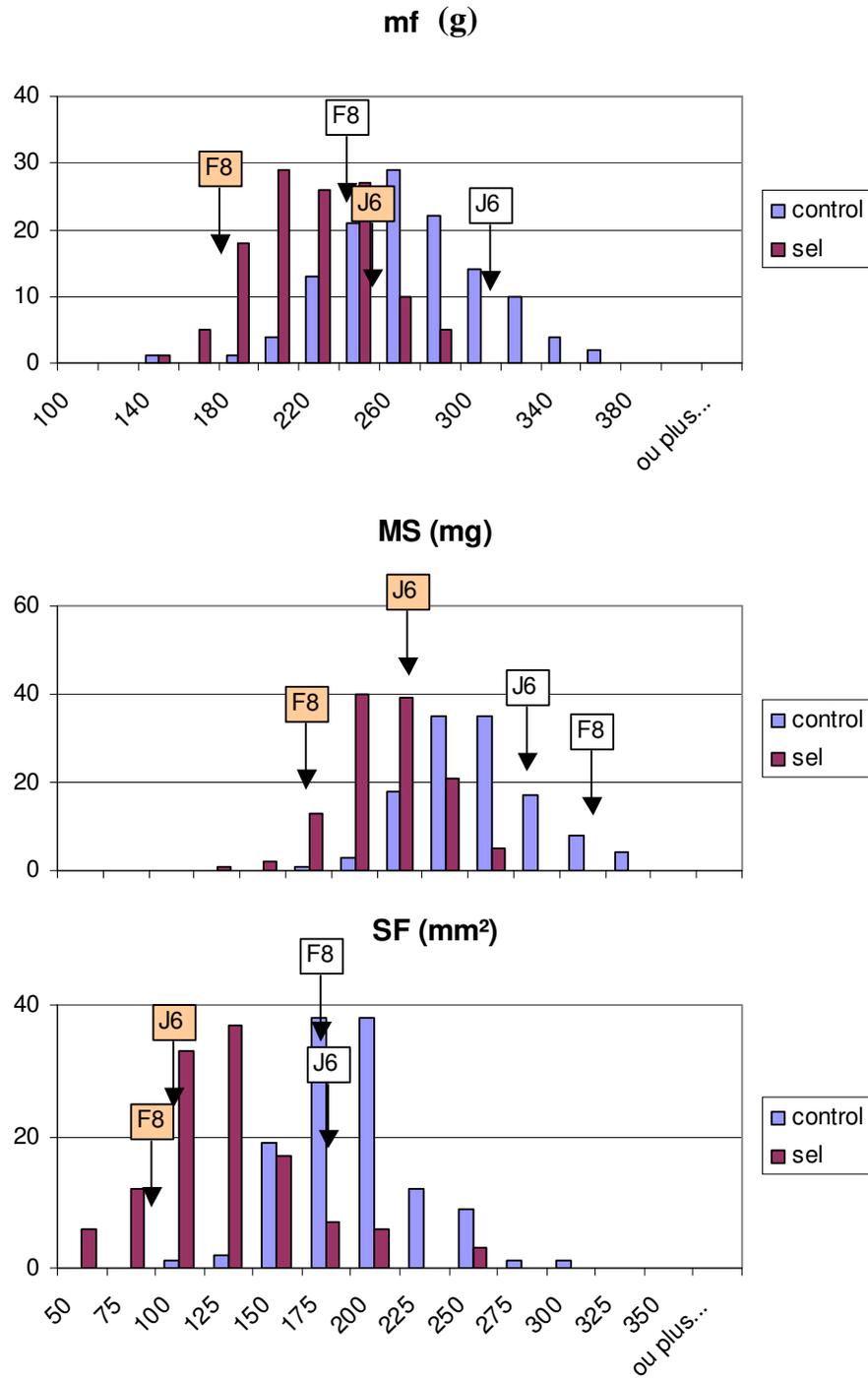
	Notation	caractère
Tiges	tige	Longueur de la tige
	f	Nombre des feuilles
	Mf-t	Matière fraîche
	Ms-t	Matière sèche
	phaut	Longueur du pétiole au rang +3
	sf	Surface de la feuille au rang +3
Racines	all	Allongement des racines au bout de 7 jours
	vitesse	Vitesse d'allongement par jour
	Mf-r	Matière fraîche des racines à 10 jours

Figure 48: Fréquence de la distribution des lignées LR5 pour les caractères de la croissance de la partie aérienne.

Les parents sont placés en carré blanc pour les contrôles et en carré coloré pour ceux soumis au stress salin.



Suite Figure 48: Le comportement des parents est assez contrastant pour les deux traitements. Pour les RIL, ce paramètre a une distribution normale pour les deux conditions et la variabilité est assez large.



La surface foliaire

Pour les RILs, la surface foliaire est assez différente entre les deux conditions même si les deux parents pour un traitement donné n'ont pas un phénotype pas contrastant. Par contre, on observe la présence de lignées transgressives, aussi bien en présence qu'en absence de sel. Ces lignées ont une surface foliaire nettement plus importante que chez les parents.

Partie racinaire (Figure 49)

Allongement des racines

Ce paramètre est plus contrastant chez les parents en présence de sel qu'en son absence. Mais la distribution pour l'ensemble de la population coïncide pour les deux traitements. En fait la concentration de 45 mM ne permet pas de ressortir des différences nettes entre les lignées.

Vitesse d'allongement

De la même façon que l'allongement des tiges au bout de 7 jours, la vitesse d'allongement n'est pas trop différente entre les deux traitements.

Matière fraîche

Ce paramètre, montre plus de différences entre les parents pour les deux traitements. Pour les Ril, la distribution est très variable mais n'est pas centrée.

Pour tous les caractères racinaires, on observe une nette transgression dans les deux sens.

Héritabilités

L'analyse de variance à un facteur (génotype) a permis d'estimer la variance génétique (la différence entre la variance du facteur génotype et la variance résiduelle divisée par le nombre de répétitions). La variance résiduelle est prise comme un bon estimateur de la variance environnementale.

L'héritabilité est alors le rapport entre la variance génétique et la variance phénotypique totale (variance génétique + variance environnementale).

Le tableau 21 indique le niveau d'héritabilité pour chaque caractère individuel dans les deux conditions où celui-ci était mesuré.

Figure 49: Fréquence de la distribution des lignées LR5 pour les caractères de la croissance racinaire.

De même que la figure précédente les parents sont placés sur les graphes.

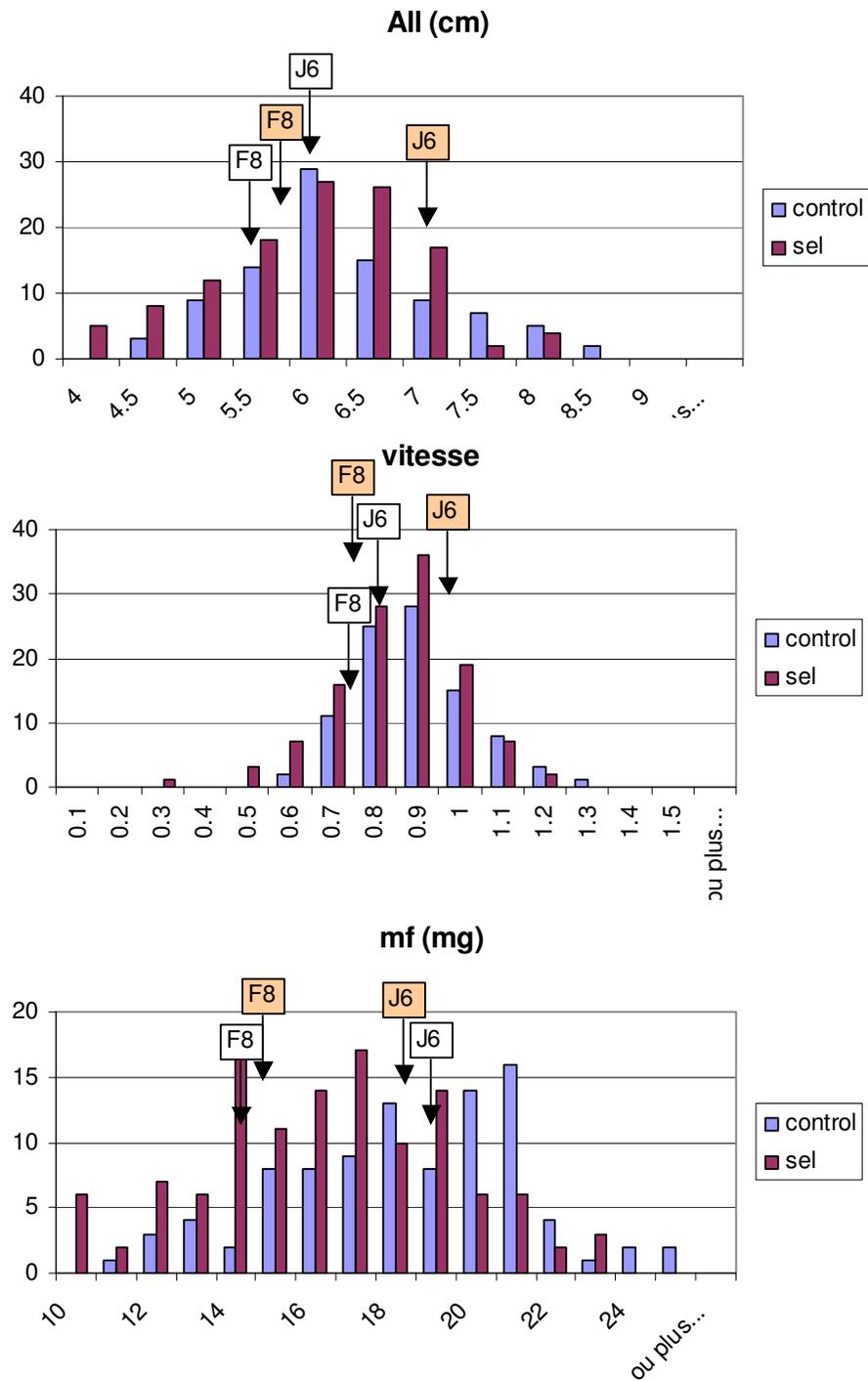


Tableau 26: Héritabilités des caractères mesurés pour les tiges et les racines en conditions contrôles et sous sel.

	caractère	Sans sel	Avec sel
Tiges	tige	0.83	0.77
	NF	0.61	0.38
	Mf-t	0.57	0.54
	Ms-t	0.52	0.50
	phaut	0.39	0.62
	sf	0.41	0.47
Racines	all	0.56	0.65
	vitesse	0.53	0.67
	Mf-r	0.52	0.32

Les héritabilités calculées se situent entre 0.32 et 0.83, indiquant que la variation phénotypique totale observée sur notre matériel est en majorité due à des facteurs génotypiques.

En absence de sel, les caractères phaut et SF présentent une héritabilité inférieure à 0.5. La mesure du caractère phaut se trouve amélioré en présence de sel dans le milieu, vu que son héritabilité est augmentée.

Plusieurs caractères se trouvent stables au changement des conditions de culture par l'ajout du sel dans le milieu, à l'exception du nombre de feuilles (NF) et MF des racines (Mf-r).

Corrélations entre caractères

La partie aérienne (Tableau 27)

En conditions contrôles ainsi qu'en présence de sel, la matière sèche est corrélée à l'ensemble des autres paramètres. Et la plus forte corrélation est avec la matière fraîche. Ceci est normal du fait que la MS mesure l'ensemble des autres paramètres. La même constatation est aussi valable pour la matière fraîche.

Le nombre de feuilles n'est pas corrélé à la surface foliaire et la longueur du pétiole, ils constituent en effet des paramètres indépendants.

La surface foliaire est corrélée à la longueur du pétiole, en sachant que la surface mesurée est celle de la même feuille que le pétiole.

En comparant le comportement des lignées pour chaque paramètre entre les deux conditions testées, on trouve que tous sont corrélés sauf MF et SF. Pour ces deux derniers paramètres le comportement des lignées est variable selon les conditions de la culture.

Les racines

L'ensemble des corrélations est significatif au seuil de 1%, cela veut dire que les paramètres mesurés sont dépendant les uns des autres et montrent la même variation entre les deux conditions de culture.

Localisation de QTLs

Les caractères utilisés pour la recherche de QTL, ont inclus les données brutes mesurées dans les 3 expériences ainsi que des paramètres synthétique (comme la teneur en eau) ou

Tableau 27: Corrélation (coefficient de Spearman) entre différents paramètres mesurés pour la partie aérienne en présence ou non de sel.

Les chiffres en gras représentent des corrélations significatives au seuil de 1%.

En conditions control

	NF	MS	SF	TIGE	MF	PHAUT
NF	1,00	0,62	0,03	0,35	0,62	0,06
MS		1,00	0,33	0,62	0,95	0,31
SF			1,00	0,22	0,34	0,38
TIGE				1,00	0,59	0,14
MF					1,00	0,30
PHAUT						1,00

En présence de sel

	NF	MS	SF	TIGE	MF	PHAUT
NF	1,00	0,39	-0,17	0,15	0,48	-0,16
MS		1,00	0,32	0,50	0,93	0,42
SF			1,00	0,17	0,25	0,59
TIGE				1,00	0,42	0,12
MF					1,00	0,36
PHAUT						1,00

		en Absence de sel					
		NF	MS	SF	TIGE	MF	PHAUT
Avec sel	NF	0,36	0,26	-0,12	0,09	0,26	-0,02
	MS	0,30	0,40	0,20	0,36	0,41	0,10
	SF	-0,03	0,08	0,20	0,10	0,09	0,16
	TIGE	0,37	0,39	0,16	0,28	0,42	0,08
	MF	0,14	0,22	0,09	0,75	0,21	-0,01
	PHAUT	0,03	0,05	0,15	0,06	0,07	0,23

comparatifs entre le contrôle sans sel et le traitement salin (des réductions et des différences) (Tableau 28).

Les données brutes sont représentées par des valeurs de moyennes ajustées pour les 3 expériences. Ces moyennes tiennent compte de la variabilité entre les expériences et sont ajustées par rapport à celle là. La recherche QTL réalisée par CIM a permis de détecter plusieurs QTL pour différents caractères analysée (Tableau 29, Figure 50).

QTL feuilles

Deux QTL pour le nombre de feuilles en conditions contrôles et en présence de sel sont situés respectivement sur les chromosomes 4 et 5. En présence de sel, un autre QTL ayant un faible LOD est situé sur le chromosome 7.

Pour la réduction de ce paramètre deux QTL se trouvent en proximité des deux autres QTL des chromosomes 4 et 5. Donc le paramètre réduction du NF semble impliquer les deux régions génomiques responsables de la production du nombre de feuilles en présence et en absence de sel.

QTL Tiges

Des régions chromosomiques sur le chromosome 1 et 7 sont identifiées pour la longueur des tiges en absence et en présence de sel. Ces QTL sont à fortes valeurs de LOD. Un QTL de réduction de tiges est localisé sur le chromosome 1, non loin de celui responsable de la longueur des tiges en présence et en absence de sel. Ce dernier est responsable d'une forte réduction de la longueur des tiges.

Sur le chromosome 1 les régions chromosomiques permettent une augmentation de longueur des tiges dans les deux conditions testées alors que c'est l'inverse pour ceux du chromosome 7.

Pour la différence entre longueur des tiges, on retrouve une région sur le chromosome 2 qui permet une faible réduction et à faible LOD.

QTL Surface foliaire

La seule région sur le chromosome 6 est retrouvée pour la réduction de la surface foliaire sous l'effet du sel, et son effet est positif sur la surface foliaire.

Tableau 28: Liste des paramètres utilisés pour la détection de QTL.

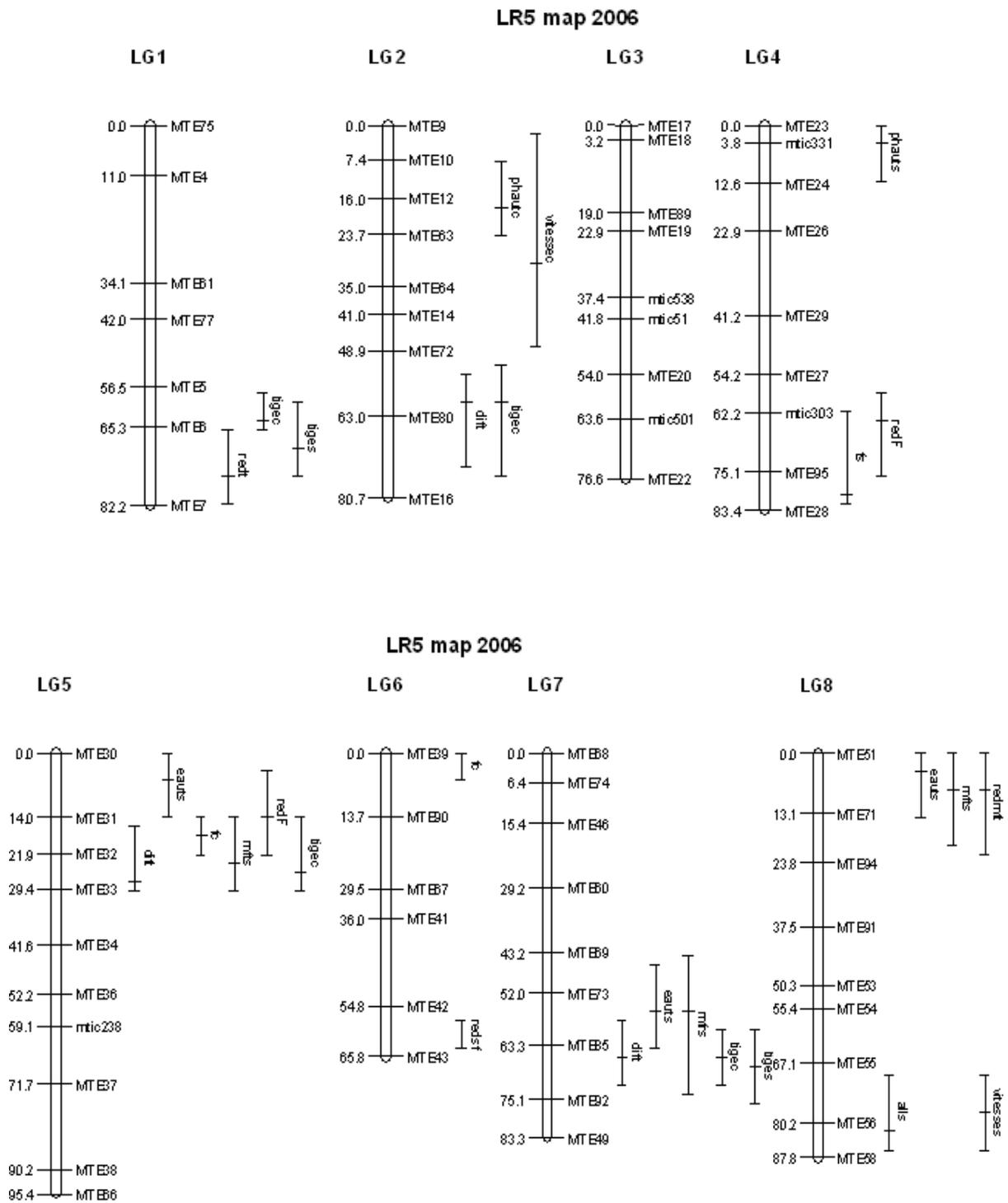
	Abréviation	caractère
Tiges	NFc	Nombre de feuilles en conditions contrôles
	NFs	Nombre de feuilles en conditions de stress salin
	Red NF	Réduction du nombre de feuilles sous l'effet du sel
	tigec	longueur des tiges en conditions contrôles
	tiges	longueur des tiges en conditions de stress salin
	Red t	Réduction de la longueur des tiges sous l'effet du sel
	Dif t	Différence de la longueur des tiges entre le contrôle et le sel
	Red sf	Réduction de la surface foliaire sous l'effet du sel
	phautc	longueur du pétiole en conditions contrôles
	phauts	longueur du pétiole en conditions de stress salin
Eauts	teneur en eau de la partie aérienne sous stress salin	
Racines	alls	allongement des racines sous sel
	mfrs	Matière fraîche des racines sous sel
	vitesses	Vitesse d'allongement des racines sous sel
	Red vit	réduction de la vitesse d'allongement des racines sous l'effet du sel
	Red all	réduction de l'allongement des racines sous l'effet du sel
	Dif all	différence d'allongement des racines entre le contrôle et le sel

Tableau 29: Synthèse des QTL détectés pour les différents caractères liés à la croissance aérienne et racinaire pour les LR5.

	caractère	QTL	Chrom	Position	M. gauche	CI	LOD	R ² %	add
TIGES	NFc	1	Chrom5	18	MTE31	8	9.51	30.0	-0.289
		2	Chrom6	0	MTE39	6	4.29	15.1	-0.174
	NFs	1	chrom4	80	MTE95	20	3.34	11.9	0.215
	Red NF	1	chrom4	64	mtic303	18	2.53	9.1	-3.185
		2	chrom5	14	MTE30	18	2.51	9.2	-3.019
	tigec	1	chrom1	64	MTE5	8	4.88	16.8	0.721
		2	Chrom2	60	MTE72	24	3.86	13.6	-0.686
		3	Chrom5	26	MTE32	16	3.62	12.7	-0.636
		4	chrom7	66	MTE85	12	6.99	23.0	-0.935
	tiges	1	chrom1	70	MTE6	16	7.30	24.3	0.506
		2	chrom7	68	MTE85	16	4.41	15.2	-0.371
	redt	1	chrom1	76	MTE6	16	3.50	12.6	-4.052
	dift	1	chrom2	60	MTE72	20	4.61	16.1	-0.575
		2	Chrom 5	28	MTE32	14	3.17	11.3	-0.438
		3	Chrom 7	66	MTE85	14	5.07	17.4	-0.602
	Red sf	1	chrom6	64	MTE42	6	3.31	12.1	-7.174
	phautc	1	chrom2	18	MTE12	16	4.08	14.4	-0.263
	phauts	1	Chrom4	4	mtic331	12	2.53	9.3	-0.289
	Eauts	1	chrom5	6	MTE30	14	4.41	15.5	-0.187
		2	chrom8	56	MTE73	18	2.66	9.5	0.145
3		chrom8	4	MTE51	14	2.50	9.1	0.140	
mfts	1	Chrom5	24	MTE32	16	2.50	9.0	-8.669	
	2	Chrom8	8	MTE51	20	4.28	15.0	12.590	
redmft	1	Chrom8	8	MTE51	22	2.49	9.1	-4.488	
RACINES	alls	1	chrom8	82	MTE56	16	3.24	12.2	-0.362
	vitessec	1	Chrom2	30	MTE63	46	2.39	11.1	0.051
	Vitesses	1	Chrom8	78	MTE55	16	3.03	11.1	-0.058
	mfrs	1	Chrom7	56	MTE73	30	2.59	9.4	-0.978

Add : effet de substitution allélique ; R²% : proportion de la variance phénotypique expliquée par le QTL

Figure 50: Localisation des QTL détectés sur la carte génétique de LR5



QTL Phaut

Pour la longueur du pétiole, deux QTL situées sur les chromosomes 2 et 4 sont retrouvées dans les deux conditions. Celui en présence de sel sur le chromosome 4 est proche de ceux de la réduction et du nombre de feuilles sous sel.

Teneur en eau

On a pu détecter 3 QTL pour la teneur en eau en présence de sel, deux sur le chromosome 8 et un sur le chromosome 5 au même endroit que celui de la réduction du nombre de feuilles.

QTL racines

Plusieurs QTL racinaires se retrouvent sur le chromosome 8: celui de l'allongement en présence de sel, la réduction et la différence d'allongement et la vitesse d'allongement en présence de sel.

Les deux QTL, allongement et vitesse en présence de sel se co-localisent vu que ces deux paramètres sont corrélés.

Un QTL a été localisé sur le chromosome 2 pour la matière fraîche en présence de sel et un autre sur le chromosome 1 pour la réduction de la vitesse d'allongement.

Discussions et conclusion générales

Il est clair que la tolérance au sel chez les plantes est un caractère multigénique à cause de la complexité des niveaux d'interaction entre le stress et la plante prise dans sa globalité (Zeng *et al.* 2004).

Une approche principale dans la sélection de plantes pour des caractères multigéniques est de maximiser la diversité génétique entre les génotypes parentaux par des croisements. La diversité génétique entre les génotypes parentaux est habituellement estimée par des mesures de physiologie et/ou des différences morphologiques pour des caractères économiquement importants. Cette approche présente des avantages et des inconvénients. Les inconvénients de cette l'approche sont le coût de temps et de travail pendant les mesures ainsi que les influences des facteurs environnementaux. Souvent, ces inconvénients sont aggravés lors de la culture: par exemple un changement dans l'environnement tel que la température, la lumière ou l'humidité peuvent nettement changer le flux d'ions lors de tests à la tolérance à la salinité (Yeo *et al.* 1990). Une première conséquence est l'importance souvent élevée du facteur environnement dans les calculs en génétique quantitative qui rend plus difficile l'identification de QTLs à faible effet. Une seconde conséquence est la nécessité d'augmenter le nombre de lignées étudiées et de répétitions afin d'augmenter le niveau du seuil de détection des QTLs.

Les avantages d'une approche de génétique quantitative basée sur des populations en ségrégation dépassent nettement les inconvénients. Pourquoi ?

Parce que :

- Les populations en ségrégation « recombinent » 2 génomes et créent des situations génétiques nouvelles riches d'informations.
- Chaque lignée est « fixée » et donc peut-être étudiée pour de nombreux phénotypes et permettre ainsi d'établir des corrélations entre des caractères parfois très différents *a priori* comme, par exemple, la tolérance à la sécheresse et la précocité de floraison.
- Partir de 2 parents à phénotype contrastant est une garantie d'avoir des résultats mais pas indispensable puisque la recombinaison peut créer des phénotypes dépassant les phénotypes parentaux: on parle alors de transgression qui peut aller dans les 2 sens vis à vis des phénotypes parentaux. Ce caractère de transgression est à la base de l'amélioration des plantes.

- La recombinaison aléatoire des génomes et la création de nouveaux génotypes/phénotypes fait qu'il n'est pas possible de prédire les résultats donc, en schématisant, deux analyses sur les mêmes caractères, mais avec deux populations différentes, ne détectera pas obligatoirement les mêmes QTLs (gènes).
- L'analyse quantitative permet d'estimer la contribution de chaque QTL (gène) à la réalisation d'un phénotype. En cela, l'analyse QTL donne des informations totalement complémentaires d'un programme de mutagenèse qui ne permet que de déterminer les gènes participants à un phénotype chez un génotype déterminé mais pas leur contribution.

Pour toutes ces raisons, l'analyse QTL de génétique quantitative est une méthode de choix pour la dissection génétique d'un caractère complexe. C'est pourquoi nous avons utilisé cette approche pour la connaissance des bases génétiques de la tolérance à la salinité de *Medicago truncatula*.

Dans ce chapitre, nous avons décrit la réponse de la population RILs LR5 (Jemalong x F83005.5) soumise à un stress salin. Nous avons montré l'existence d'un certain nombre de QTLs pour des caractères différents comme la longueur des tiges, la surface des feuilles ou la longueur des racines. Les conclusions principales que nous pouvons en tirer sont :

- Chaque caractère permet d'identifier plusieurs QTLs, chacun d'importance relative faible.
- Les QTLs identifiés sont différents pour chaque caractère, ce qui confirme le caractère polygénique de la tolérance au sel et surtout que chaque organe possède un déterminisme génétique distinct.
- Nous avons mis en évidence un phénomène de transgression phénotypique au sein de la population LR5 pour la croissance racinaire et la surface foliaire en présence ou en absence de sel. Cette observation ouvre la porte à une sélection de lignées à surface foliaire accrue et forte croissance racinaire.

Bien entendu toutes ces informations doivent être mises dans le contexte global de la tolérance à la salinité. Nous devons répondre aux questions suivantes (liste non limitative):

- Les QTLs seraient-ils les mêmes si la concentration en sel était différente pour les tiges et/ou les racines ?
- Les QTLs seraient-ils les mêmes si d'autres protocoles expérimentaux étaient utilisés (Voir un exemple d'autres conditions dans l'Annexe 7)?
- Les QTLs seraient-ils les mêmes si les plantes poussaient sous symbiose fixatrice ?

- Les QTLs seraient-ils les mêmes si une autre population en ségrégation était utilisée ?
- Les QTLs seraient-ils les mêmes si le NaCl était remplacé par un autre sel (KCl par exemple) ?

A toutes ces questions, il est clair qu'il faudra donner des réponses en faisant les expériences. Nous pourrions alors avoir une meilleure compréhension des bases génétiques de la tolérance à la salinité.

Synthèse générale et perspectives

Synthèse générale

L'objectif général de cette thèse était de fournir des clés pour aider à l'amélioration des légumineuses fourragères soumises aux conditions environnementales Méditerranéennes. Pour ce faire, je me suis appuyée sur une collection de lignées de *Medicago truncatula* provenant de 10 populations naturelles croissant dans des conditions éco-environnementales caractéristiques de la Tunisie. J'ai étudié la diversité génétique et phénotypique de cette collection de lignées, particulièrement par rapport à la diversité de tolérance de *M. truncatula* à la salinité. Enfin, j'ai utilisé les méthodologies de la génétique quantitative pour identifier des gènes végétaux impliqués dans la tolérance à la salinité. Cette thèse comprend donc des approches à des niveaux très différents : plantes individuelles, populations, génétique des populations, génétique quantitative et physiologie. Cette diversité des approches m'a permis d'avoir une vue large mais demandait un nombre de données qui sont difficiles à obtenir pendant la durée d'une thèse. Nous avons rencontré cette difficulté et nous en avons discuté dans ce mémoire. J'ai essayé dans ce dernier chapitre de regrouper les conclusions des 3 parties de cette thèse afin d'avoir une vue plus globale.

Dans le premier chapitre, j'ai analysé la diversité génétique de 136 lignées tirées des 10 populations Tunisiennes de *M. truncatula* en utilisant les marqueurs moléculaires microsatellites. J'ai choisi ces marqueurs en raison de leur disponibilité et de leur relative facilité d'emploi mais surtout parce que les microsatellites étaient considérés comme des marqueurs neutres, c'est à dire non influencés par l'environnement, ce qui est essentiel pour une étude de diversité. Les tests de neutralité que nous avons effectués ont montré qu'il n'en était rien puisque 7 microsatellites sur 18 se sont révélés non-neutres. J'ai donc du séparer l'analyse des 11 marqueurs neutres de celle d'avec les 7 marqueurs non-neutres. A quelles conclusions sommes-nous arrivés ?

- Une grande diversité génétique est observable entre et à l'intérieur des populations de *M. truncatula*.
- Les marqueurs neutres nous ont permis d'identifier la Dorsale Tunisienne comme le principal responsable de la structuration génétique des lignées de *M. truncatula*. Cette Dorsale sépare la Tunisie en deux parties climatiquement bien distinctes.
- Des voies de migration des allèles ont été mises en évidence.
- Les marqueurs non-neutres nous ont permis d'identifier la pluviométrie comme facteur de sélection principal ce qui conforte les résultats obtenus avec les marqueurs neutres. Par contre, la salinité du sol ne semble pas intervenir. C'est surprenant. Cela pourrait signifier

que la salinité n'a d'importance que par rapport à son effet osmotique et non pas par rapport à l'effet chimique des ions.

- Le concept de marqueur neutre pour les microsattellites doit donc être pris avec précaution et vérifié chaque fois, (ce qui n'était pas le cas dans la plupart des publications précédentes) sachant que la neutralité d'un marqueur ne dépend que des populations étudiées.

Dans le second chapitre, nous avons abordé la question de la diversité de la tolérance à la salinité chez *Medicago truncatula*. En raison de la complexité du problème, nous n'avons pu qu'effleurer cette question. En effet, à quel niveau réaliser cette étude et quelle stratégie appliquer ?

- Extraire des lignées « représentatives » et étudier leur tolérance au sel ? Choisir des populations croissant en sols salins ou non-salins et les comparer ? Mais quelle sera la généralité des conclusions ?
- Prendre des lignées au hasard et étudier la diversité de leur tolérance au sel ? Mais la quantité de travail à réaliser devient rapidement énorme.
- Quelles études réaliser ? Quels sont les stades physiologiques pertinents ? Les tests *in vitro* sont ils représentatifs du comportement *in situ* des lignées ?
- Comment choisir les sites salins (ions, concentration, variation de la salinité au cours de l'année, répartition de la salinité sur le site, impact des autres plantes halophytes...) ? Comment échantillonner les plantes en fonction de ces caractéristiques ?
- Quel est l'impact de la nutrition azotée (assimilation ou fixation symbiotique) sur la tolérance à la salinité ?
- Quel est l'impact de souches symbiotiques ? Y a-t-il une spécificité plante-souche bactérienne vis à vis de la tolérance à la salinité ?

A toutes ces questions, dont la liste n'est pas limitative, il n'est pas possible d'apporter 1 réponse globale. Il est nécessaire de décomposer la « tolérance à la salinité » en une série de composantes puis de regrouper les réponses deux à deux. Dans un premier temps, nous avons utilisé certaines lignées tunisiennes décrites au chapitre I, ou bien des lignées utilisées dans d'autres programmes de génétique, que nous avons testées par rapport à leur tolérance à la salinité en condition d'assimilation ou de fixation avec diverses souches de *Rhizobium*. Deux caractères physiologiques ont été étudiés : l'allongement des tiges car c'est le caractère le plus affecté par la salinité et la formation de biomasse aérienne car c'est un critère essentiel de

productivité pour des légumineuses fourragères. Ensuite, dans un second temps, nous avons voulu nous placer à un niveau plus général en étudiant 20 à 25 lignées prises au hasard dans chacune des populations étudiées au chapitre I. Il aurait été préférable de travailler directement sur les lignées étudiées dans le chapitre I mais le nombre de lignées disponibles était trop faible pour pouvoir faire des études significatives.

A quelles conclusions sommes nous arrivés ?

- Nous avons montré que le caractère « allongement » est beaucoup plus sensible au sel que la MSA avec des réductions de longueur pouvant aller jusqu'à la suppression de l'allongement des tiges. Il faut remarquer que cette observation rejoint celles faites sur la plupart des plantes cultivées soumises à l'effet de la salinité.
- Nous avons montré que les deux caractères « allongement » et MSA ne sont pas corrélés puisque toutes les combinaisons de tolérance - sensibilité se rencontrent.
- Nous avons montré que les deux caractères « allongement » et MSA ont des sensibilités au sel significativement différentes et que cette sensibilité est différente selon la nature de l'alimentation azotée. La symbiose étant plus sensible au sel que l'assimilation.
- Nous avons montré que des lignées tolérantes au sel se rencontrent aussi dans des populations croissant sur de sols non salins. Comment interpréter cette observation ? Cela pourrait signifier qu'il n'y a pas eu de pression de sélection sur ce caractère. Par contre, la présence de lignées sensibles dans les populations croissant sur terrains salins est moins facilement interprétable. Plusieurs hypothèses sont possibles dans ce cas: on sait que la concentration en sel du sol n'est pas toujours la même sur toute la surface couverte par la population, les plantes sensibles viendraient de ces zones. Autre hypothèse : la concentration en sel n'est pas la même au long de l'année: en fonction de la pluviométrie, les plantes sensibles feraient leur cycle vital pendant une période différente des lignées tolérantes au sel.
- Nous avons montré que la plante est le partenaire le plus important vis à vis de la tolérance au sel mais le couple lignée – souche possède une importance significative.

Dans le troisième chapitre, nous avons entrepris une étude des bases génétiques de la tolérance à la salinité chez *M. truncatula*. Une telle étude demande des outils génétiques performants et d'obtention difficile : 1) une population de lignées recombinantes obtenues à partir de lignées parentales contrastantes et 2) une carte génétique saturée. Lors de notre thèse,

nous avons choisi le couple présentant le différentiel de tolérance le plus important : Jemalong – F83005.5 dont la population de lignées recombinantes LR5 était immédiatement disponible ainsi que sa carte génétique. Une étude de génétique quantitative correspond à mettre en correspondance, pour chaque lignée, des valeurs phénotypiques et génotypiques. Pour le choix des données phénotypiques nous avons utilisé les caractères étudiés au chapitre II : la longueur des tiges et la masse sèche aérienne dans les mêmes conditions expérimentales. Nous avons ajouté un autre dispositif expérimental afin d’avoir accès à un organe essentiel pour les plantes : les racines qui sont en interface directe avec le stress salin. A quelles conclusions sommes nous arrivés ?

- Nous avons mis en évidence un nombre significatif de QTLs impliqués dans plusieurs réponses au stress salin: l’allongement des tiges, le nombre de feuilles, la teneur en eau, la vitesse de croissance des racines...
- Chaque caractère est gouverné par plusieurs QTLs, chacun n’expliquant qu’une faible partie de la variation phénotypique. Ce qui signifie que chaque caractère est polygénique.
- L’allongement des tiges, des pétioles et des racines en conditions salines, n’est pas gouverné par les mêmes gènes (QTLs).

Perspectives

Au terme de cette thèse, nous avons obtenu une quantité importante d’informations sur la diversité génétique et phénotypique des lignées naturelles Tunisiennes de *M. truncatula*. Notre travail est déjà utilisé en référence dans plusieurs projets qui utilisent la diversité de *M. truncatula*.

- Projet NSF en collaboration avec la Tunisie et la France sur les bases génétiques de la tolérance au stress salin.
- Projet de génétique d’association qui utilisera toutes nos lignées décrites dans cette thèse.
- Criblage de nombreuses lignées pour y déceler des caractères de résistance à diverses maladies ou bien de tolérance à des stress abiotiques.
- Clonage positionnel de QTLs impliqués dans la tolérance aux stress salin.
- Etc....

Nous avons pu démontrer que les populations tunisiennes de *M. truncatula* sont un matériel de choix pour faire de la biologie intégrative c’est à dire mettre en parallèle la

biologie de la plante, son environnement, sa génétique et sa génomique afin de comprendre comment les plantes fonctionnent et permettre d'identifier des gènes d'intérêt. Notre travail a donné des clés mais il reste à remettre en ordre les données obtenues et surtout identifier les questions restantes :

- L'analyse génétique du chapitre I a mis en évidence des voies de migration des allèles. Il faudrait augmenter le nombre de populations étudiées afin de vérifier les hypothèses émises.
- Nous avons mis en évidence une structuration génétique par la pluviométrie mais pas par la salinité. Il faudrait compléter cette analyse en augmentant le nombre de sites salins, et ayant plus d'informations sur ces sites, afin de confirmer ce point qui est essentiel pour les stratégies de sélection.
- La symbiose fixatrice d'azote est elle plus efficace si la lignée végétale et la souche bactérienne proviennent du même sol ? De la réponse à cette question va dépendre la stratégie de sélection: faut-il sélectionner les plantes et leurs Rhizobium associés ?
- Les QTLs mis en évidence sont-ils impliqués dans toutes les conditions biologiques ou bien ne sont-ils que le reflet des conditions expérimentales utilisées.
- Etc....

Que faudrait-il faire si nous devons reprendre cette étude dans une optique de biologie intégrative? Il faudrait refaire des collectes en marquant l'emplacement exact avec prélèvement d'échantillons de sols et mesure des caractéristiques du sol et analyse du milieu biotique (isolement de souches de Rhizobium, recherche de pathogènes...). Chaque lignée serait génotypée comme nous l'avons fait au chapitre I et multipliée afin de pouvoir la tester ultérieurement pour plusieurs phénotypes. Par ailleurs, une stratégie basée sur des essais multilocaux serait réalisée en mettant des lignées à pousser sur des sols autres que sur des sols d'origine. De cette manière nous pourrions espérer mieux comprendre les mécanismes qui permettent l'adaptation d'une plante à son environnement biotique et abiotique.

Références Bibliographiques

- Abdelkefi A, Biborchi A, Boussaid M, Marrakchi M (1997). Marqueurs isoenzymatiques et structures génotypiques de populations spontanées d'espèces du genre *Medicago*. 6ème journées scientifiques du réseau biotechnologies végétales AUPELF UREF, Orsay.
- Ahmad MH, Rafique Uddin M, McLaughlin W (1984) Characterization of indigenous rhizobia from wild legumes. *FEMS Microbiol. Lett.* 24: 197-203
- Al-Doss AA, Smith SE (1998) Registration of AZ-97MEC and AZ-97MEC-ST very non-dormant alfalfa germplasm pools with increased shoot weight and differential response to saline irrigation. *Crop Science* 38: 568-568
- Alonso-Blanco C, Mendez-Vigo B, Koornneef M (2005) From phenotypic to molecular polymorphisms involved in naturally occurring variation of plant development. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 717-732
- Amor BB, Shaw SL, Oldroyd GE, Maillet F, Penmetsa RV, Cook D, Long SR, Denarie J, Gough C (2003) The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J* 34: 495-506
- Andersson MS, Schultze-Kraft R, Peters M, Hincapie B, Lascano CE (2006) Morphological, agronomic and forage quality diversity of the *Flemingia macrophylla* world collection. *Field Crops Research* 96: 387-406
- Ane JM, Levy J, Thoquet P, Kulikova O, de Billy F, Penmetsa V, Kim DJ, Debelle F, Rosenberg C, Cook DR, Bisseling T, Huguët T, Denarie J (2002) Genetic and cytogenetic mapping of DMI1, DMI2, and DMI3 genes of *Medicago truncatula* involved in Nod factor transduction, nodulation, and mycorrhization. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 1108-18
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WS, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258
- Arcade A, Labourdette A, Falque M, Mangin B, Chardon F, Charcosset A, Joets J (2004) BioMercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. *Bioinformatics* 20: 2324-2326
- Aydi S, Drevon JJ, Abdely C (2004) Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiol Biochem* 42: 833-840
- Badri Y, Zribi K, Badri M, Huguët T, Aouani ME (2003) *Sinorhizobium meliloti* nodulates *Medicago laciniata* in Tunisian soils. *Czech J. Genet Plant Breed.* 39: 178-183
- Bajracharya J, Steele KA, Jarvis DI, Sthapit BR, Witcombe JR (2006) Rice landrace diversity in Nepal: Variability of agro-morphological traits and SSR markers in landraces from a high-altitude site. *Field Crops Research* 95: 327-335
- Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Essad S, Flament P, Gallusci P, Génier G, Guy G, Muel X, Tourneur J, Dénarié J, Huguët T (1990) *Medicago truncatula*, a

- model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol.Biol.Reporter* 8: 40-49
- Barth C, De Tullio M, Conklin PL (2006) The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *J. Exp. Bot.* 57: 1657-1665
- Bataillon T, David JL, Schoen DJ (1996) Neutral genetic markers and conservation genetics : simulated germplasm collections. *Genetics* 144: 409-417
- Bekki A, Trinchant J-C, Rigaud J (1987) Nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum* 71: 61-67
- Ben Khaled L, Morte Gómez A, Honrubia M, Oihabi A (2003) Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le *Rhizobium*. *Agronomie* 23: 553-560
- Béna G, Lyet A, Huguet T, Olivieri I (2005) *Medicago* – *Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of *Medicago*. *J. EVOL. BIOL.*
- Benson DR, Silvester WB (1993) Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev.* 57: 293-319
- Bent AF (2000) Arabidopsis in plant transformation. Uses, mechanism and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol* 124: 1540–1547
- Berger JD, Ali M, Basu PS, Chaudhary BD, Chaturvedi SK, Deshmukh PS, Dharmaraj PS, Dwivedi SK, Gangadhar GC, Gaur PM (2006) Genotype by environment studies demonstrate the critical role of phenology in adaptation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to high and low yielding environments of India. *Field Crops Research* 98: 230-244
- Bewley JD, Black M (1994) *Seeds: Physiology of development and germination*, Plenum Press, New York,
- Biondi EG, Pilli E, Giuntini E, Roumiantseva ML, Andronov EE, Onichtchouk OP, Kurchak ON, Simarov BV, Dzyubenko NI, Mengoni A, Bazzicalupo M (2003) Genetic relationship of *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* strains isolated from Caucasian region. *FEMS Microbiology Letters* 220: 207-213
- Blondon F, Marie D, Brown S, Kondorosi A (1994) Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* species. *Genome* 37: 264-270
- Blumwald E (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr cell Biol* 12: 431-434
- Bohnert HJ, Sheveleva E (1998) Plant stress adaptations, making metabolism move. *Curr. Opinion Plant Biol.* 1: 267-274
- Bonnin I, Huguet T, Gherardi M, Prosperi JM, Olivieri I (1996) High level of polymorphism and spartial structure in a selfing plant species *Medicago truncatula* (Leguminosae) using RAPD markers. *American J.of Botany* 83: 843-855
- Borevitz JO, Chory J (2004) Genomics tools for QTL analysis and gene discovery. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 132–136
- Breto MP, Asins MJ, Carbonell EA (1994) Salt tolerance in *Lycopersicum* species. III. Detection of quantitative traits loci by means of molecular markers. *Theor Appl Genet* 88: 395–401
- Brewin NJ (2004) Plant cell wall remodelling in the rhizobium legume symbiosis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23: 293–316
- Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) . model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55–128
- Brown AHD (1989a) The case for core collections In: A.H.D. Brown OHF, D.R. Marshall and J.T. Williams, eds. (eds) *The Use of Plant Genetic Resources*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.. pp 136-156
- Brown AHD (1989b) Core collection: a practical approach to genetic resources management. *Genome* 31: 818-824
- Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991) Plant Genetic Control of Nodulation. *Annual Review of Microbiology* 45: 345-382

- Caetano-Anolles G, Paparozzi ET, Gresshoff PM (1991) Mature nodules and root tips control nodulation in soybean. *Journal of Plant Physiology* 137: 389-396
- Capela D, Barloy-Hubler F, Gouzy J, Bothe G, Ampe F, Batut J, Boistard P, Becker A, Boutry M, Cadieu E, Dreano S, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Kahn D, Kiss E, Lelaure V, Masuy D, Pohl T, Portetelle D, Puhler A, Purnelle B, Ramsperger U, Renard C, Thebault P, Vandebol M, Weidner S, Galibert F (2001) Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9877-9882
- Cermola M, Fedorova E, Taté R, Riccio A, Favre R, Patriarca EJ (2000) Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli* *Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 733-741
- Chabaud M, de Carvalho-Niebel F, Barker DG (2003) Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Rep* 22: 46-51
- Chabaud M, Larsonneau C, Marmouget C, Huguet T (1996) Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promoter fused to the gus reporter gene. *Plant Cell Rep.* 15: 305-310
- Chalck PM (1998) Dynamics of biologically fixed N in legume-cereal rotations: a review. *Aust. J. Res* 49: 303-316
- Charcosset A, Gallais A (1996) Estimation of the contribution of quantitative trait loci (QTL) to the variance of a quantitative trait by means of genetic markers. *Theor. Appl. Genet.* 88: 717-721
- Choi HK, Kim D, Uhm T, Limpens E, Lim H, Mun JH, Kalo P, Penmetsa RV, Seres A, Kulikova O, Roe BA, Bisseling T, Kiss GB, Cook DR (2004a) A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics* 166: 1463-502
- Choi H-K, Mun J-H, Kim D-J, Zhu H, Baek J-M, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB, Young ND, Cook DR (2004b) Estimating genome conservation between crop and model legume species. *PNAS* 101: 15289-15294
- Churchill GA, Doerge RW (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963-971
- Claussen M, Luthen H, Blatt M, Bottger M (1997) Auxin induced growth and its linkage to potassium channels. *Planta* 201: 227-234
- Cook DR (1999) *Medicago truncatula*--a model in the making! *Curr Opin Plant Biol* 2: 301-4
- Cordovilla MP, Libero F, Lluch C (1995) Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in Faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress. *Plant Soil* 172: 289-297
- Covitz PA, Smith LS, Long SR (1998) Expressed sequence tags from a root-hair-enriched *Medicago truncatula* cDNA library. *Plant Physiol* 117: 1325-1332
- Craig GF, Atkins CA, Bell DT (1991) Effect of salinity on growth of *Rhizobium* and their infectivity and effectiveness on two species of *Acacia*. *Plant Soil* 133: 253-262
- Cronk QC (2001) Plant evolution and development in a post-genomic context. *Nat. Rev. Genet.* 2: 607-619
- Cui Z, Carter TE, Jr., Burton JW, Wells R (2001) Phenotypic Diversity of Modern Chinese and North American Soybean Cultivars. *Crop Sci* 41: 1954-1967
- d'Erfurth I, Cosson V, Eschstruth A, Lucas H, Kondorosi A, Ratet P (2003) Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* 34: 95-106
- Danso SKA (1995) Assessment of biological nitrogen fixation. *Fertilizer research* 42: 33-41

- Darvasi A, Soller M (1995) Advanced Intercross Lines, an Experimental Population for Fine Genetic Mapping. *Genetics* 141: 1199-1207
- De Vienne D (1998) les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales, Science Publishers,
- De Vienne D, Causse M (1997) La cartographie et la caractérisation des locus contrôlant la variation des caractères quantitatifs In: De Vienne D (eds) Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologie végétales. INRA éditions, pp 89-118
- Decroocq V, Fave MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theor Appl Genet* 106: 912-922
- Dénarié J, Debelle F, Prome JC (1996) Rhizobium lipo-chitooligo-saccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* 65: 503±535
- Diwan N, McIntosh MS, Bauchan GR (1995) Methods of developing a core collection of annual *Medicago* species. *Theor. Appl. Genet.* 90: 755-761
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C-J, Reddy MSS, Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence: a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* 3: 371-390
- Doerge RW (2002) Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev Genet* 3: 43-52
- Downie JA (2005) Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol* 15: 6
- Doyle JJ, Luckow MA (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131: 900-910
- Edwards MD, Stber CW, Wendel JF (1987) Molecular-markers facilitated investigations of QTL in maize. I. Number, genomic distribution and types of gene action. *genetics* 116: 113-125
- El Gazzah M, Chalbi N (1995) Ressources génétiques et amélioration des plantes In: (eds) Quel avenir pour l'amélioration des plantes ? Paris. pp 123-129
- Esseling JJ, Lhuissier FGP, Emons AMC (2003) Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiology* 132: 1982-1988
- FAO (1996) Tunisie: Rapport de pays pour la conférence technique internationale de la FAO sur les ressources phytogénétiques, Ministère De L'Agriculture Tunis
- Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler ES (2003) Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54: 357-374
- Flowers TJ (2004) Improving crop salt tolerance. *journal of experimental botany* 55: 307-319
- Flowers TJ, Koyama ML, Flowers SA, Sudhakar C, Singh KP, Yeo AR (2000) QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. *J Exp Bot* 51: 99-106
- Flowers TJ, Yeo AR (1995) Breeding for salinity resistance in crop plants-where next? *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 875-884
- Foolad MR, Lin GY, Chen FQ (1999) Comparison of QTLs for seed germination under non-stress, cold stress and salt stress in tomato. *Plant Breeding* 118: 167-173
- Foolad MR, Stoltz T, Dervinis C, Rodriguez RL, Jones RA (1997) Mapping QTLs conferring salt tolerance during germination in tomato by selective genotyping. *Mol Breed* 3: 269-277
- Foucher F, Kondorosi E (2000) Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* 43: 773 - 786
- Foury A (1954) Les légumineuses fourragères au Maroc In: (eds) Les Cahiers de la Recherche Agronomique. Rabat. pp 289-656
- Frugoli J, Harris J (2001) *Medicago truncatula* on the move! *Plant Cell* 13: 458-63

- Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 280–300
- Gale MD, Devos KM (1998) Plant comparative genetics after 10 years. *Science* 282: 656–659
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter F-J, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh K-C, Batut J (2001) The Composite Genome of the Legume Symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293: 668–672
- Gallais A, Rives M (1993) Detection, number and effects of QTLs for a complex character. *Agronomie* 13: 723–738
- Gamas P, Niebel FDC, Lescure N, Cullimore JV (1996) Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* 9: 233–242
- Gepts P (2004) Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breed Rev* 24: 1–44
- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND (2005) Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* 137: 1228–1235
- Gomez OJ, Blair MW, Frankow-Lindberg BE, Gullberg U (2004) Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *Crop Sci* 44: 1412–1418
- Graham PH, Vance CP (2003) Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131: 872–877
- Gupta PK, Rustgi S, Sharma S, Sing R, Kumar N, Balyan HS (2003) Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol Genet Genomics* 270: 315–323
- Haley CS, Knott SA (1992) A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315–324
- Hall MA, Smith AR (1995) Ethylene and responses of plants to stress. *BULG. J. PLANT PHYSIOL.* 21: 71–79
- Handberg K, Stougaard J (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J* 2: 487–496
- Hernandez JA, Ferrer MA, Jiménez A, Barcelo AR, Sevilla F (2001) Antioxydant systems and O₂-/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. It's relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol* 127: 817–831
- Huyghe C (2005) Prairies et cultures fourragères en France entre logiques de production et enjeux territoriaux, INRA,
- Hyne V, Kearsey MJ (1995) QTL analysis: further uses of 'marker regression'. *Theor. Appl. Genet.* 91: 471–476
- Jackson SA, Cheng Z, Wang ML, Goodman HM, Jiang J (2000) Comparative fluorescence in situ hybridization mapping of a 431-kb *Arabidopsis thaliana* bacterial artificial chromosome contig reveals the role of chromosomal duplications in the expansion of the *Brassica rapa* genome. *Genetics* 156: 833–838
- Jansen RC (1993) Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135: 205–211

- Jebara M, Mhamdi R, Aouani ME, Ghrir R, Mars M (2001) Genetic diversity of Sinorhizobium populations recovered from different medicago varieties cultivated in Tunisian soils. *Can J Microbiol* 47: 139-47
- Jeffrey R, Seemann, Christa Critchley (1985) Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 164: 51–162
- Jenczewski E, Prosperi JM, Ronfort J (1999) Evidence for gene flow between wild and cultivated *Medicago sativa* (Leguminosae) based on allozyme markers and quantitative traits. *Am J Bot* 86: 677
- Jha PK, Nair S, Gopinathan MC, Babu CR (1995) Suitability of rhizobia-inoculated wild legumes *Argyrolobium flaccidum*, *Astragalus graeolens*, *Indigofera gangetica* and *Lespedeza stenocarpa* in providing a vegetational cover in an unreclaimed lime stone quarry. *Plant Soil* 177: 139- 149
- Jia W, Wang H, Zhang CH, Zhang J (2002) Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J Exp Bot* 53: 2201-2206
- Journet EP, Carreau V, Gouzy J, Thoquet P, Rosenberg C, Barker D, Huguet T, Denarie J, Gamas P (2001). La légumineuse modèle *Medicago truncatula* : approches génomiques et perspectives. Ecole thématique Biologie végétale.
- Kao CH (2000) On the Differences Between Maximum Likelihood and Regression Interval Mapping in the Analysis of Quantitative Trait Loci. *Genetics* 156: 855–865
- Kao C-H, Zeng Z-B, Teasdale RD (1999) Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152: 1203–1216
- Kashi Y, King D, Soller M (1997) Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet* 13: 74-78.
- Kharrat M, Ben Salah H, Halila HM (1991). Faba bean status and prospects in Tunisia. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires - n°: 10.*
- Knapp SJ, Bridges WC (1990) Using molecular markers to estimate quantitative trait loci parameters: power and genetic variances for unreplicated and replicated progenies. *Genetics* 126:
- Knott SA, Haley CS (1992) Aspects of maximum likelihood methods for the mapping of quantitative trait loci in line crosses. *Genet Res* 60: 139-151
- Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M (2002) Hd3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant Cell Physiol* 43: 1096-1105
- Korol AB, Ronin YI, Itskovitch AM, Peng J, Nevo E (2001) Enhanced efficiency of quantitative trait loci mapping analysis based on multivariate complexes of quantitative traits. *Genetics* 157: 1789-1803
- Labadi M, L.D. R, Singh KB, Charrier A (1996) Genetic diversity and phylogenetic relationships among the annual *Cicer* species as revealed by isozyme polymorphisms. *Euphytica* 88: 181-188
- Lal B, Khanna S (1995) Selection of salt tolerant Rhizobium isolates of *Acacia nilotica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 637-639
- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199
- Laranjo M, Branco C, Soares R, Alho L, Carvalho MDE, Oliveira S (2002) Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *J. Appl. Microbiol.* 92: 1–8
- Lee GJ, Boerma HR, Villagarcia MR, Zhou X, Carter Jr TE, Li Z, Gibbs MO (2004) A major QTL conditioning salt tolerance in S-100 soybean and descendent cultivars. *Theor Appl Genet* 109: 1610–1619

- Lesins K, Lesins I (1979) Genus *Medicago* (Leguminosae). A taxonomic study., Junk, The Hague, Netherlands.,
- Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet EP, Ané JM, Lauber E, Bisseling T, Dénarié J, Rosenberg C, Debelle F (2004) A Putative Ca²⁺ and Calmodulin-Dependent Protein Kinase Required for Bacterial and Fungal Symbioses. *Science* 303: 1361 - 1364
- Ligero F, Caba JM, Lluch C, Olivares J (1991) Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiol.* 97: 1221–1225
- Limpens E, Bisseling T (2003) Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 343–350
- Link J, Graeff S, Batchelor WD, Claupein W (2006) Evaluating the economic and environmental impact of environmental compensation payment policy under uniform and variable-rate nitrogen management. *Agricultural Systems* 91: 135-153
- Lodwig EM, Hosie AHF, Bourdès A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA, Poole PS (2003) Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume–*Rhizobium* symbiosis. *Nature* 422: 722-726
- Loudet O, Saliba-Colombani V, Camilleri C, Calenge F, Gaudon V, Koprivova A, North KA, Kopriva S, Daniel-Vedele F (2007) Natural variation for sulfate content in *Arabidopsis* is highly controlled by APR2. *Nature Genetics* 39: 896-900
- Maiti RK, Amaya LED, Cardona SI, Dimas AMO, DelaRosaIbarra M, Castillo HD (1996) Genotypic variability in maize cultivars (*Zea mays* L) for resistance to drought and salinity at the seedling stage. *Journal of plant physiology* 148: 741-744
- Mangin B, Goffinet B, Rebaï A (1994) Constructing confidence intervals for QTL location. *Genetics* 138: 1301-1308
- Mantel NA (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220
- May GD, Dixon RA (2004) *Medicago truncatula*. *Curr Biol* 14: 180-1
- Mayak S, Tirosh T, Glick BR (2004) Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 565-572
- Messina MJ (1999) Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr* 70: 439S–50S
- Mezni M, Albouchi A, Bizid A, Hamza M (2002) Effet de la salinité des eaux d'irrigation sur la nutrition minérale chez trois variétés de luzerne pérenne (*Medicago sativa*). *Agronomie* 22: 283-291
- Mhadhbi H, Jebara M, Limam F, Huguet T, Aouani ME (2005) Interaction between *Medicago truncatula* lines and *Sinorhizobium meliloti* strains for symbiotic efficiency and nodule antioxidant activities. *Physiologia Plantarum* 124: 4–11
- Mohammad RM, Akhavan-Kharazian M, Campbell WF, Rumbaugh MD (1991) Identification of salt-and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant and Soil Biol Biochem* 134: 271–276
- Moschetti G, Peluso A, Protopapa A, Anastasio M, Pepe O, Defez R (2005) Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 619-631
- Mouradov A, Cremer F, Coupland G (2002) Control of Flowering Time: Interacting Pathways as a Basis for Diversity. *Plant Cell* 14: S111-130
- Muller SH, Pereira PAA (1995) Nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by mineral nitrogen supply at different growth stages. *Plant and Soil* 177: 55–61

- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25: 239–250
- Munns R, Schachtman DP, Condon AG (1995) The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 561–569
- Munns R, Termaat A (1986) Whole-plant responses to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 143–160
- Ndakidemi PA, Dakora FD (2003) Review: legume seed flavonoids and nitrogenous metabolites as signals and protectants in early seedling development. *Funct Plant Biol* 30: 729–745
- Nei TM (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590
- Nordborg M, Borevitz JO, Bergelson J, Berry CC, Chory J, Hagenblad J, Kreitman M, Maloof JN, Noyes T, Oefner PJ, Stahl EA, Weigel D (2002) The Extent of Linkage Disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 30: 190–193
- Nordborg M, Hu TT, Ishino Y, Jhaveri J, Toomajian C, Zheng H, Bakker E, Calabrese P, Gladstone J, Goyal R, Jakobsson M, Kim S, Morozov Y, Padhukasahasram B, Plagnol V, Rosenberg NA, Shah C, Wall JD, Wang J, Zhao K, Kalbfleisch T, Schulz V, Kreitman M, Bergelson J (2005) The Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology* 3: 196
- Nordborg M, Tavaré S (2002) Linkage disequilibrium: what history has to tell us. *Trends in Genetics* 18: 83–90
- Ober ES, Sharp RE (1994) Proline accumulation in maize (*Zae Mays L.*) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased levels of abscisic acid. *Plant Physiol* 105: 981–987
- Oka-Kira E, Kawaguchi M (2006) Long-distance signaling to control root nodule number. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 496–502
- Oldroyd G (2001) Dissecting symbiosis: developments in Nod factor signal transduction. *Annals of Botany* 87: 709–718
- Oldroyd GE, Engstrom EM, Long SR (2001) Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 13: 1835–49
- Ouk M, Basnayake J, Tsubo M, Fukai S, Fischer KS, Cooper M, Nesbitt H (2006) Use of drought response index for identification of drought tolerant genotypes in rainfed lowland rice. *Field Crops Research* 99: 48–58
- Owen PA, Nickell CD, Noel GR, Thomas DJ, Frey K (1994) Registration of 'saline' soybean. *Crop Science* 34: 1689
- Parinov S, Sundaresan V (2000) Functional genomics in *Arabidopsis*: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 157–161
- Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Paterson S, Lincoln SE, Tanksley SD (1988) Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335: 721–726
- Payakapong W, Tittabutr P, Teaumroong N, Boonkerd N, Singleton PW, Borthakur D (2006) Identification of Two Clusters of Genes Involved in Salt Tolerance in *Sinorhizobium* sp. Strain BL3. *Symbiosis* 41: 47–51
- Penmetsa RV, Cook DR (2000) Production and Characterization of Diverse Developmental Mutants of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 123: 1387–1398
- Peoples MB, Herridge DF, Ladha JK (1995) Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant Soil* 174: 3–28

- Pilot G, Gaymard F, Mouline K, Cherel I, Sentenac H (2003) Regulated expression of Arabidopsis shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Plant Mol Biol* 51: 773-787
- Prasad KVSK, Sharmila P, Kumar PA, Saradhi PP (2000) transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern with bacterial cod A gene enhances its tolerance to salt stress. *Molecular Breed* 6: 489-499
- Prell J, Poole P (2006) Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology* 14: 161-168
- Prosperi JM, Angevain M, Genier C, Olivieri I, Mansat P (1993) Sélection de nouvelles légumineuses fourragères pour les zones difficiles méditerranéennes. *Fourrages* 135: 343-354
- Rafalski A, Morgante M (2004) Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size. *Trends in Genetics* 20: 103-111
- Rai R, Singh RP (2000) Effect of salt stress on interaction between lentil (*Lens culinaris*) genotypes and Rhizobium spp. strains: symbiotic N₂ fixation in normal and sodic soils. *Biol. Fertil. Soils* 29: 187-190
- Rao DLN, Giller KE, Yeo AR, Flowers TJ (2002) The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann. Bot.* 89: 563-570
- Rebaï A, Goffinet B, Mangin B (1995) Comparing power of different methods for QTL detection. *Biometrics* 51: 87- 99
- Remington DLa (2001) Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the Maize genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 11479-11484
- Ronin YI, Korol AB, Nevo E (1999) Single- and Multiple-Trait Mapping Analysis of Linked Quantitative Trait Loci: Some Asymptotic Analytical Approximations. *Genetics* 151: 387-396
- Russelle M (2001) Alfalfa. *Am Sci* 89: 252-259
- Sagan M, Morandi D, Tarengi E, Duc G (1995) Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after g-ray mutagenesis. *Plant Sci* 111: 63-71
- Sahgal M, Johri BN (2003) The changing face of rhizobial systematics. *Current Science* 84: 43-48
- Sahgal M, Johri BN (2006) Taxonomy of rhizobia: Current status. *Current Science* 90: 486
- Sandberg A-S (2002) Bioavailability of minerals in legumes. *British Journal of Nutrition* 88,Suppl. 3: S281-S285
- Sax K (1923) the association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8: 552-560
- Schmidt R (2000) Synteny: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 97-102
- Seklani H, Hassen H (1990) contribution à l'étude des espèces spontanées du genre medicago en Tunisie In: (eds) *Anales INRAT*. pp 3-15
- Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ (1997) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol* 113: 1177-1183
- Shimamoto K, Kyojuka J (2002) Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 399-419
- Shirokova Y, Forkutsa I, Sharafutdinova N (2000) Use of electrical conductivity instead of soluble salts for soil salinity monitoring in Central Asia. *Irrigation and Drainage Systems* 14: 199-205
- Si ziani Y, Abdelguerfi A (1995). Comportement de populations de *Medicago truncatula* Gaertn. dans deux zones différentes; relation avec les facteurs du milieu d'origine.

- Réunion du Groupe de Travail Méditerranéen du Réseau Interrégional FAO/CIHEAM de Recherche et Développement sur les Pâturages et les Cultures Fourragères, Avignon (France), Cahiers Options Méditerranéennes.
- Sibole JV, Cabot C, Poschenrieder C, Barcelo J (2003) Efficient leaf ion partitioning, an overriding condition for abscisic acid-controlled stomatal and leaf growth responses to NaCl salinization in two legumes. *Journal of Experimental Botany* 54: 2111-2119
- Skinner D, Bauchan G, Auricht G, Hughes S (1999) A method for the efficient management and utilization of large germplasm collections. *Crop Sci* 39: 1237-1242
- Soltani A, Hammer GL, Torabi B, Robertson MJ, Zeinali E (2006) Modeling chickpea growth and development: Phenological development. *Field Crops Research* 99: 1-13
- Soussi M, Ocana A, Lluch C (1998) Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* 49: 1329-1337
- Spollen WG, LeNoble ME, T.D. S, Bernstein N, Sharp RE (2000) Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiol* 122: 967-976
- Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J, D May G (2006) Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 110-121
- Sulas L, Re GA, Caredda S (1999) Hard seed breakdown pattern of sulla (*Hedysarum coronarium* L.) in relation to its regeneration capacity and persistence. *Cahiers Options méditerranéennes* 39: 79-82
- Tanksley SD (1993) Mapping polygenes. *Ann. Rev. Genet.* 27: 205-233
- Tanksley SD, Medina-Filho H, Rick CM (1982) use of naturally occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *Heredity* 49: 11-25
- Temple-Boyer E (2006) Aménagement et ménagement du paysage dans la Dorsale Tunisienne, École normale supérieure Lettres et sciences humaines (Lyon).
- Teulat B, Merah O, Souyris I, This D (2001) QTLs for agronomic traits from a Mediterranean barley progeny grown in several environments. *Theor Appl Genet* 103: 774-787
- Thoday JM (1961) Location of polygenes. *Nature* 19: 368-370
- Thomas MR, Rose RJ, Nolan KE (1992) Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and Ti plasmids. *Plant Cell Rep.* 11: 113-117
- Tilak KVBR, Ranganayaki N, Pal KK, De R, Saxena AK, Shekhar Nautiyal C, Mittal S, Tripathi AK, Johri BN (2005) Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science* 89: 136-150
- Timothy FS, Bernhard H, Thomas M-O (2000) Genetic isolation by distance in *Arabidopsis thaliana*: biogeography and postglacial colonization of Europe. *Molecular Ecology Notes* 9: 2109-2118
- Tirichine L, de Billy F, Huguet T (2000) Mtsym6, a gene conditioning *Sinorhizobium* strain-specific nitrogen fixation in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 123: 845-51
- Tozlu I, Guy CL, Moore GA (1999) QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC1 progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and non-saline environments. *Genome* 42: 1020-1029
- Udvardi M (2002) Legume genomes and discoveries in symbiosis research. *Genome Biology* 3: reports 4028.1 - reports 4028.3
- Utz HF, Melchinger AE (1996) PLABQTL: A program for composite interval mapping of QTL. Stuttgart, Institute of Plant Breeding, Seed Science, and Population Genetics, University of Hohenheim, D-70593 Stuttgart, Germany)
- Vales MI, Schon CC, Capettini F, Chen XM, Corey AE, Mather DE, Mundt CC, Richardson KL, Sandoval-Islas JS, Utz HF, Hayes PM (2005) Effect of population size on the

- estimation of QTL: a test using resistance to barley stripe rust. *Theor Appl Genet* 111: 1260-70
- Van Ooijen JW (1992) Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theor Appl Genet* 84: 803-831
- Vanhala TK, van Rijn CPE, Buntjer J, Stam P, Nevo E, Poorter H, van Eeuwijk FA (2004) Environmental, phenotypic and genetic variation of wild barley (*Hordeum spontaneum*) from Israel. *Euphytica* 137: 297-309
- Veatch ME, Smith sE, Vandemark G (2004) Shoot biomass production among accessions of *Medicago truncatula* exposed to NaCl. *Crop Science* 44: 1008-1013
- Vedele F, Loudet O (2001). Un exemple de la dissection génétique d'un caractère complexe : lignées recombinantes et recherche de QTLs. Ecole thématique Biologie végétale.
- Vincent JM (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria, IBP handbook, N° 75, Blackwells, Oxford,
- Visscher PM, Thompson R, Haley CS (1996) Confidence Intervals in QTL Mapping by Bootstrapping. *Genetics* 143: 1013-1020
- Voorrips RE (2002) MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* 93: 77-78
- Walling GA, Archibald AL, Cattermole JA, Downing AC, Finlayson HA, Nicholson D, Walker CA, Haley CS, Visscher PM (1998) Mapping of quantitative trait loci on porcine chromosome 4. *Animal Genetics* 29: 415-424
- Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, crosby W, Fowke LC (1993) ICK1, a cyclin dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *plant J* 15: 501-510
- Wang TL, Domoney C, Hedley CL, Casey R, Grusak MA (2003) Can we improve the nutritional quality of legume seeds? *Plant Physiol* 131: 886-891
- Winicov II, Bastola DR (1999) Transgenic overexpression of the transcription factor alfin1 enhances expression of the endogenous MsPRP2 gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants. *Plant Physiol* 120: 473-80
- Wu RL (1999) Mapping Quantitative Trait Loci by Genotyping Haploid Tissues. *Genetics* 152: 1741-1752
- Wu Y, Spollen WG, Sharp RE, Hetherington PR, Fry SC (1994) Root growth maintenance at low water potentials increased activity activity of xyloglucan endotransglycosylase and it's possible regulation by abscisic acid. *Plant Physiol* 106: 607-615
- Xu S (1998) Further investigation on the regression method of mapping quantitative trait loci. *Heredity* 80: 364-373
- Yeo AR, Flowers TJ (1986) Salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) and pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. *Aust J Plant Physiol* 13: 163-173
- Yeo AR, Yeo ME, Flowers SA, Flowers TJ (1990) Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance, and their relationship to overall performance. *Theor Appl Genet* 79: 377-384
- Young ND, Shoemaker RC (2006) Genome studies and molecular genetics Part 1 Model legumes Exploring the structure, function and evolution of legume genomes. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 95-98
- Young ND, Steven BC, Shusei S, Dongjin K, Douglas RC, Chris DT, Bruce AR, Satoshi T (2005) Sequencing the Genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 137: 1174-1181
- Zahran HH (1991) conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biol. Fertil. Soils* 12: 73-80
- Zahran HH (1997) Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol. Fertil. Soils* 25: 211-223

- Zahran HH (1999a) *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 968-989
- Zahran HH (1999b) *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 968-989
- Zahran HH (2001) Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology* 91: 143–153
- Zahran HH, Sprent JI (1986) Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 167: 303–309
- Zeng L, Kwon T-R, Liu X, Wilson C, Grieve CM, Gregorio GB (2004) Genetic diversity analyzed by microsatellite markers among rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with different adaptations to saline soils. *Plant Science* 166: 1275-1285
- Zeng Z-B (1993) Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10972-10976
- Zeng Z-B (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457–1468
- Zeng ZB, Kao CH, Basten CJ (1999) Estimating the genetic architecture of quantitative traits. *Genetical Research* 74: 279-289
- Zhang HX, Blumwald E (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotech* 19: 765-768
- Zhang HX, Hodson JN, Williams JO, Blumwald E (2001) 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* 98: 12832-12836
- Zhang Q, Wang H, Hu Z (1999) RAPD markers associated with salt tolerance in wild soybean populations. *Soybean Genet Newsl*
- Zhu B, Su J, Chang MC, Verma DPS, Fan YL, Wu R (1998) Overexpression of a pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci* 139: 41-48
- Zhu H, Choi H-K, Cook DR, Shoemaker RC (2005) Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiology* 137: 1189–1196
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol* 53: 247-273
- Zhu JK (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in plant biology* 6: 441-445
- Zhu J-K (2000) Genetic Analysis of Plant Salt Tolerance Using Arabidopsis. *Plant Physiol.* 124: 941-948
- Zhu J-K (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71
- Zhuang JY (1997) Analysis of QTL x environment interaction for yield components and plant height in rice. *Theor Appl Genet* 95: 799-808
- Zoghalmi A, Hassen H (1999) Observations on the distribution and ecology of Annual Medicago Species in Northern Tunisia In: (eds) Genetic Resources of Mediterranean Pasture and Forage Legumes. Kluwer Academic Publishers, pp 235-238
- Zou N, Dort PJ, Marcar NE (1995) Interaction of salinity and rhizobial strains on growth and nitrogen fixation by *Acacia ampliceps*. *Soil Biol. Biochem* 27: 409-413
- Zribi K, Mhamdi R, Huguet T, Aouani ME (2004) Distribution and genetic diversity of rhizobia nodulating natural populations of *Medicago truncatula* in Tunisian soils. *Soil Biol Biochem* 36: 903–908

ANNEXES

Annexe 1: Relief de la Tunisie

La Tunisie possède un relief contrasté, entre une partie septentrionale et occidentale montagneuse, une partie orientale plane et une partie méridionale désertique.

• Nord et ouest :

La Tunisie du nord-ouest se situe dans l'extension du massif montagneux de l'Atlas qui naît au sud du Maroc en 2 grands alignements orientés Ouest - Est : l'Atlas tellien qui suit le littoral méditerranéen et l'Atlas saharien qui s'abaisse vers le cap Bon et le golfe d'Hammamet.

Entre le littoral nord et la vallée de la Medjerda s'étire l'Atlas tellien (aussi appelé Tell septentrional ou monts de la Medjerda) en 3 grands alignements de moins en moins élevés : les montagnes de Kroumirie culminant à 1000 mètres, les monts Nefza culminant à 600 m, et les Mogods culminant à 500 m jusqu'à atteindre le littoral oriental (entre le cap Blanc et Ghar El Melh).

Au sud se déroule la riche plaine alluviale de la Medjerda alimentée par de nombreux cours d'eau (Oueds Mellègue, Tessa, Béja et Zarga) à laquelle succède une zone de collines irrégulières, les monts de Tébourouk (entre la ville du Kef et le golfe de Tunis). Il s'agit du Haut Tell.

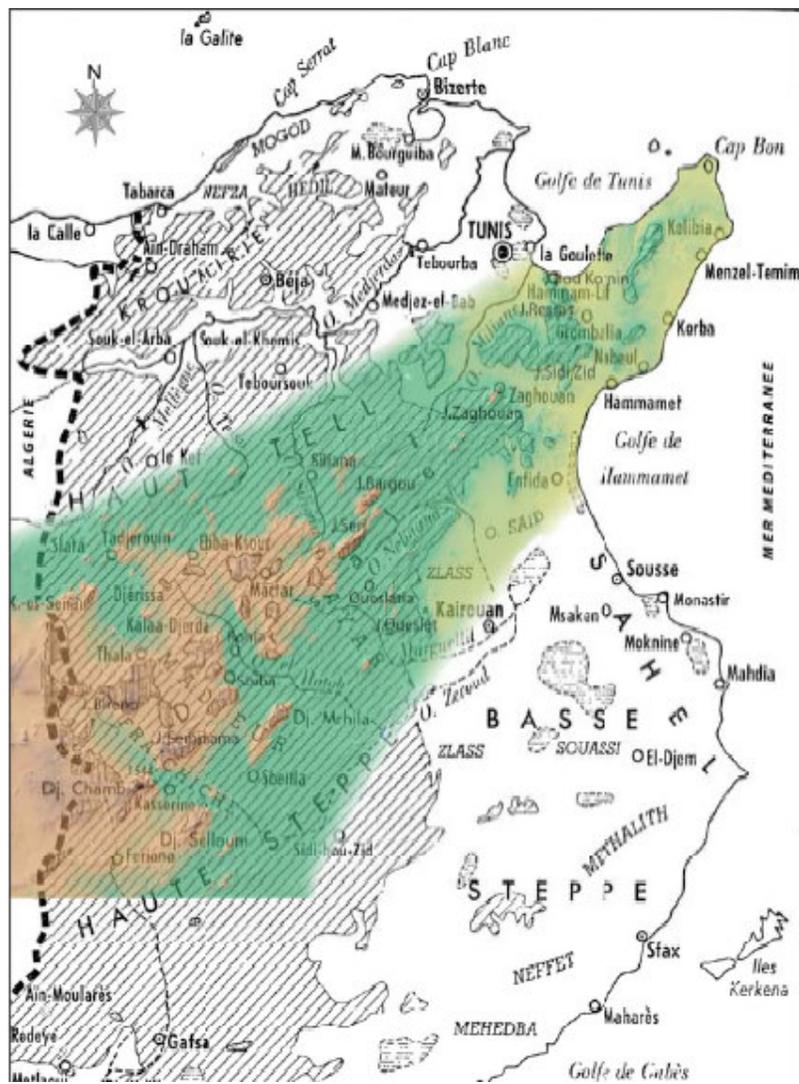
La dorsale tunisienne (Figure annexe 1), chaîne calcaire, s'étend des monts de Tébessa (Algérie) vers la péninsule du cap Bon. Elle se compose de groupes montagneux alternant avec des plateaux escarpés et des dépressions : monts de Tébessa (1385 m), Djebel Chambi (1544 m), Djebel Semmama (1314 m), Djebel Serj (1347 m), Djebel Zaghouan (1295 m) et Djebel Sidi Abd er-Rahmane dans le cap Bon (637 m). Vers le sud, l'Atlas se réduit à des îlots montagneux (Cherb) disséminés au-dessus de hautes plaines: Djebel Mhrila (1378 m) et Djebel Selloum (1373 m).

Une région plane de hautes steppes, à l'ouest, et de basses steppes, plus à l'est, s'intercale avec le sud désertique, sillonnée par quelques alignements montagneux résiduels (orientés ouest - est) : Djebel Majoura (874 m), Djebej Bou Hedma (790 m), Djebel Orbata (1165 m) et Djebel Asker (608 m).

• Est :

La partie orientale du pays est formée de grandes plaines s'étendant d'Hammamet à Ben Gardane. La plus importante, entre Hammamet et Sfax, est désignée sous le nom de Sahel. Des plaines latérales comme celle de Kairouan la rejoignent au centre de la Tunisie. Elle est prolongée au sud de Sfax jusqu'à la frontière avec la Libye par la plaine de la Djeffara.

Figure annexe 1 : Esquisse de la Dorsale Tunisienne (Source: thèse Temple-Boyer (2006))



En couleur, la Dorsale Tunisienne et le Cap Bon

1. En jaune, les régions au-dessous de 200 mètres

2. En vert, les régions comprises entre 200 et 1000 mètres

3. En rose, les régions au-dessus de 1000 mètres

C'est une région peu accidentée formant par endroit des cuvettes: les sebkhas (Kelbia, Sidi El Hani, En Noual et El Melah pour les plus étendues).

• Sud :

Au-delà des chaînes de montagnes, c'est le début du désert : d'abord une succession de chotts, vastes dépressions blanchies par les efflorescences salines (Chott el-Gharsa, Chott el-Jérid, Chott el-Fejaj). Ils sont bordés au sud et à l'est par des plateaux rocheux (hamadas) s'élevant en pente douce vers des cuvettes pierreuses et sableuses (serirs) bordées de petites chaînes de montagnes : Djebel Tebaga (469 m), monts de Matmata (713 m) et Dahar (689 m). Enfin, plus au sud, s'étendent les dunes du Grand Erg Oriental.

Le Littoral se déroule sur 1300 kilomètres dont 575 de plages sablonneuses. La côte, assez découpée mais relativement basse, est parsemée de tombolos (Monastir ou Téboulba) et de lagunes (Hergla, Moknine ou encore Zarzis). Quelques îles en émergent dont les Kerkennah et Djerba sont les principales.

La dorsale tunisienne est donc un espace de transition entre le nord de la Tunisie d'une part, le centre et le sud de la Tunisie d'autre part. En effet, le nord, ou Tell, se caractérise par un climat plus humide, tandis que le centre et le sud sont concernés par le climat aride ou semi-aride. L'isohyète de 400 mm (de précipitations par an) traverse la dorsale tunisienne et permet de différencier notamment les végétations de montagne. Ainsi, au nord et à partir des altitudes 950-1050 m, la végétation est dominée par la forêt avec pour espèces les plus répandues le chêne kermès, le chêne-liège et le chêne vert tandis que le sud est dominé par la végétation steppique. Par ailleurs les altitudes sont insuffisamment élevées pour retrouver le domaine végétal caractéristique de l'Atlas.

Annexe 2 : photos des sites de la collection tunisienne de *M. truncatula*.



Enfidha



Jelma



Amra



Deguache



Majel Bel
Abbes



Thala



El Kef



Soliman



Bulla Regia



Rhayet

Annexe 3: Fréquence allélique pour 18 microsatellites avec les 10 populations tunisiennes de *M. truncatula*.

LOCUS	POPULATION										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Effectif	14	14	14	10	15	16	13	13	13	13	
MTIC511	155	0.2857	0.9286	0.8571	0	0.9333	0.75	0	0.1538	0.3077	0.3077
	162	0.7143	0.0714	0.1429	1	0.0667	0.25	1	0.8462	0.6923	0.6538
	165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0385
MTIC559	88	0.3571	0	0	0	0	0.1875	0	0	0	0.1154
	90	0.2143	0	0	0	0	0	0.2143	0	0	0.8846
	100	0.4286	0	0.0769	0	0	0.1875	0.7857	0.8462	0.4615	0
	108	0	1	0	1	0.8	0.625	0	0.1538	0.5385	0
	110	0	0	0.7692	0	0.2	0	0	0	0	0
	119	0	0	0.1538	0	0	0	0	0	0	0
MTIC770	220	0.5714	0.1667	0.0769	0.3333	0	0.3125	0.1429	0	0	0
	250	0.0714	0.8333	0.3846	0.2222	0.3333	0.3125	0.2857	0.8462	0.6154	0.7692
	258	0.2857	0	0.3077	0	0.5333	0.125	0	0.1538	0.2308	0.1538
	295	0.0714	0	0.2308	0.4444	0.1333	0.25	0.5714	0	0.1538	0.0769
MTIC535	110	0	0.0714	0	0	0	0	0	0	0	0
	128	0.0714	0.2143	0.1538	0	0	0	0	0	0	0
	132	0	0.7143	0.7692	0.1	0.0667	0	0	0.0909	0.3077	0.3077
	138	0.7857	0	0	0.9	0.9333	0.875	0.8571	0.3636	0.6923	0.6923
	142	0.1429	0	0.0769	0	0	0.125	0.1429	0.5455	0	0
MTIC563	202	0.3571	1	0.3333	0.4	0.0769	1	1	1	1	1
	208	0.6429	0	0.6667	0.6	0.9231	0	0	0	0	0
MTIC 80	103	0.1429	0	0	0.5	0.8	0.2	0	0.1538	0.4615	0.2692
	108	0.5714	0.7857	0.4615	0.1	0	0.6667	1	0.5385	0.1538	0
	110	0.2857	0	0.1538	0.4	0.1	0.0667	0	0.0769	0.3077	0.7308
	118	0	0.2143	0.3846	0	0.1	0.0667	0	0.2308	0.0769	0
MTIC503	135	0.8182	0.7692	0.75	0.2	0.9286	0.0667	0.4615	0.5	0.0769	0.25
	145	0.0909	0	0	0.1	0	0.8667	0.3846	0.0833	0.2308	0.2083
	150	0.0909	0.2308	0.0833	0.7	0.0714	0.0667	0.0769	0	0.3077	0.2917
	160	0	0	0.1667	0	0	0	0.0769	0.4167	0.3846	0.25

MTIC1172	<i>123</i>	0	0.8182	0.0714	0	0.2	0	0	0	0	0
	<i>130</i>	0	0.1818	0.8571	1	0.7333	0.5	0.0769	0	0	0
	<i>138</i>	0.5385	0	0	0	0.0667	0.1875	0.3846	0.0769	0.0833	0
	<i>140</i>	0.4615	0	0.0714	0	0	0.3125	0.5385	0.9231	0.6667	0.2308
	<i>145</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0.7692
MTIC640	<i>170</i>	0	0	0.9286	1	0.6	0	0	0.0909	0.3846	0.0769
	<i>184</i>	0	1	0	0	0.0667	0	0	0.2727	0.0769	0.6154
	<i>190</i>	0	0	0	0	0	0.6667	0.0714	0.5455	0.4615	0.2308
	<i>198</i>	0.1667	0	0	0	0.3333	0.1333	0.0714	0.0909	0.0769	0.0769
	<i>201</i>	0.5	0	0	0	0	0.2	0.1429	0	0	0
	<i>208</i>	0.3333	0	0.0714	0	0	0	0.7143	0	0	0
MTIC268	<i>100</i>	0.7857	1	0.5	1	1	1	1	0.9231	0.8462	1
	<i>103</i>	0.2143	0	0.5	0	0	0	0	0.0769	0.1538	0
MTIC243	<i>110</i>	1	0.0714	0.3571	0.2	0	0.1875	0	0	0	1
	<i>118</i>	0	0.9286	0.6429	0.8	1	0.8125	1	1	1	0
MTIC307	<i>152</i>	1	0	0	0	0	0.25	0.9231	0	0	0
	<i>157</i>	0	1	1	1	1	0.75	0.0769	1	1	1
MTIC564	<i>150</i>	0	0	0	0.9	0.1538	0.8	0	0	0	0
	<i>152</i>	0	0	0.3846	0	0.6154	0	0	0	0	0
	<i>154</i>	0	1	0.5385	0.1	0.2308	0	0.5714	0.4615	0	0
	<i>168</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2308	0.5
	<i>193</i>	0.6429	0	0.0769	0	0	0.0667	0.1429	0.3077	0.2308	0
	<i>196</i>	0.2143	0	0	0	0	0	0.2143	0.1538	0.5385	0.0769
	<i>200</i>	0	0	0	0	0	0	0.0714	0	0	0.3846
	<i>220</i>	0.0714	0	0	0	0	0	0	0.0769	0	0.0385
	<i>223</i>	0.0714	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>300</i>	0	0	0	0	0	0.1333	0	0	0	0
MTIC67	<i>122</i>	0	0	0	0	0	0.75	0	0	0.0769	0.0417
	<i>125</i>	0.7857	1	1	1	0.9286	0	0.2143	0	0.0769	0
	<i>132</i>	0	0	0	0	0.0714	0.0625	0	0	0.3846	0.9167
	<i>144</i>	0.2143	0	0	0	0	0.125	0.0714	0	0.0769	0.0417
	<i>148</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.1538	0.3077	0
	<i>173</i>	0	0	0	0	0	0.0625	0.7143	0.6923	0.0769	0

MTIC297	<i>178</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.1538	0	0
	<i>108</i>	0	0	0	0	0	0.625	0	0	0	0
	<i>115</i>	0	0.5385	0.0714	0	0	0.125	0.5385	0	0.2308	0
	<i>118</i>	0.3571	0.4615	0.2857	0	0	0	0.3846	0.6364	0.6154	0
	<i>120</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.3636	0.0769	0.8462
	<i>122</i>	0	0	0	0.2	0.2857	0	0	0	0.0769	0.1538
	<i>124</i>	0.6429	0	0.6429	0.1	0.2143	0.0625	0.0769	0	0	0
	<i>126</i>	0	0	0	0.7	0.5	0.1875	0	0	0	0
MTIC308	<i>134</i>	0.7143	0.5385	0.9286	0.8	0.8667	0.3125	1	1	1	1
	<i>136</i>	0.2857	0.4615	0.0714	0.2	0.1333	0.6875	0	0	0	0
MTIC128	<i>145</i>	0	0	0.6154	0.3	0.7333	0	0.2308	0	0.2308	0
	<i>158</i>	0	0	0	0	0	0.125	0.7692	1	0.3846	1
	<i>160</i>	1	1	0.3846	0.7	0.2667	0.875	0	0	0.3846	0
MTIC126	<i>98</i>	0	0	0.9231	0.8	1	1	1	1	1	1
	<i>103</i>	1	1	0.0769	0.2	0	0	0	0	0	0

Annexe 4: Données quantitatives phénotypiques des lignées de référence de *M. truncatula* pour l'ensemble des caractères morphologiques analysés.

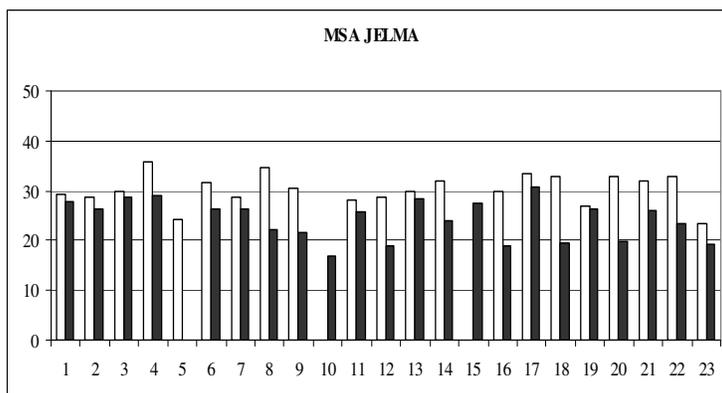
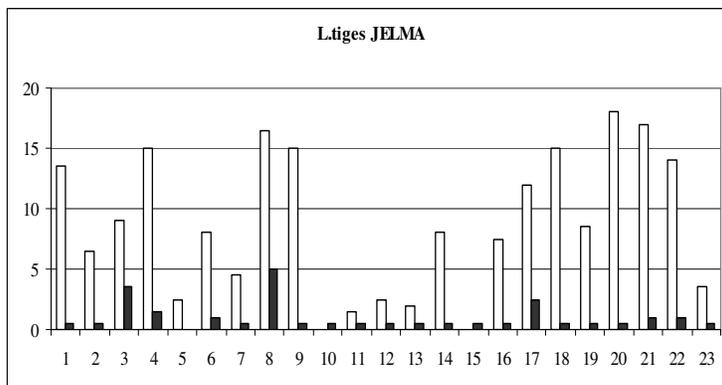
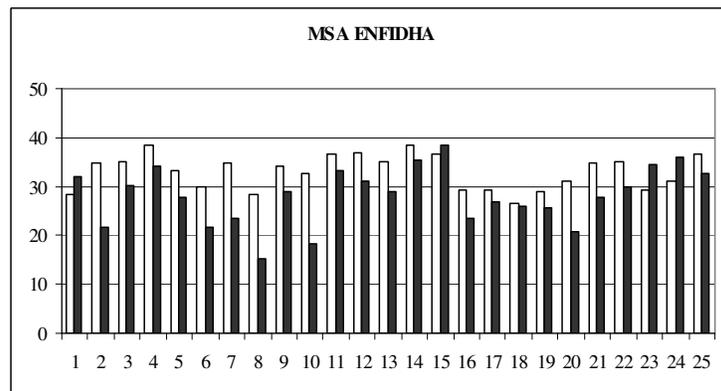
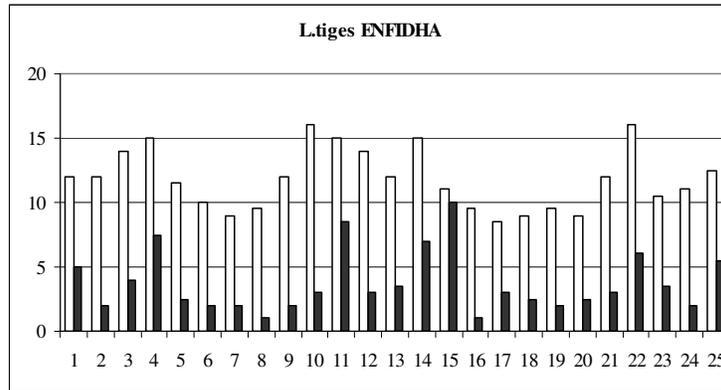
	Pp	Vp	Mf	Cf	Ap	Rl	Flor	If	Fn	Gs	Ge	PfP	Ao
A20	2	1	2	1	2	5	28	3	4	4	1	50	60
DZA315.16	2	1	2	1	2	0	50	3	4	4	1	100	32
F83005.5	2	1	1	1	2	2	46	3	3	4	2	80	40
F83005.9	2	1	2	1	2	1	41	2	3	4	2	70	50
J6	2	1	2	1	2	2	31	dm	dm	dm	dm	dm	dm
A48	2	1	2	1	2	1	35	1	3	4	1	100	40
R108	2	1	2	1	2	3	39	1	3	4	1	60	52

Dm = Données manquantes

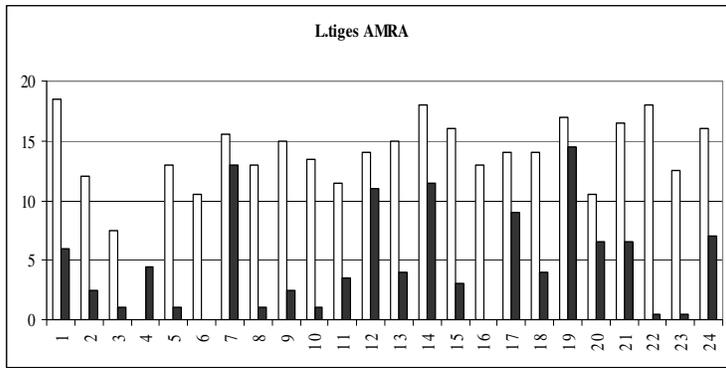
POPULATION 1

Annexe 5 : représentation des données brutes de la longueur des tiges (mm) et la matière sèche aérienne (MSA) (mg) en conditions contrôles et en présence de 60 mM de sel dans le milieu pour les individus des populations tunisiennes de *M. truncatula*.

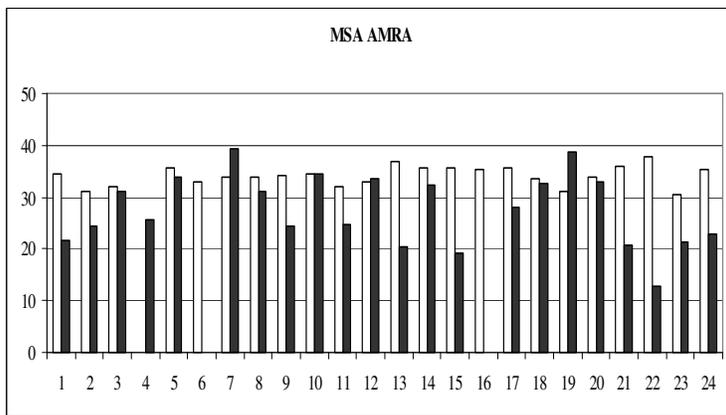
En abscisses sont représentés les numéros de plantes de chaque population



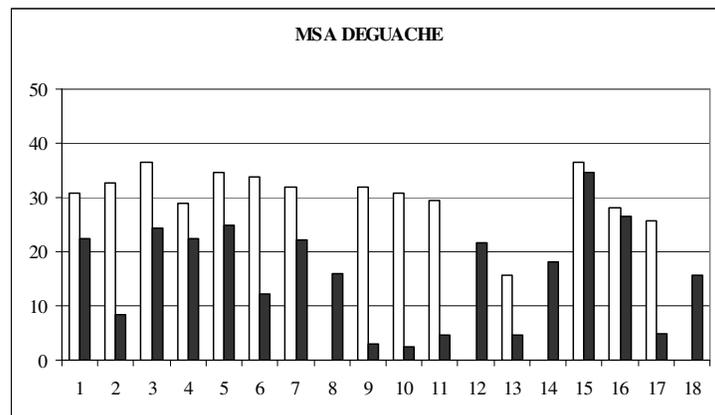
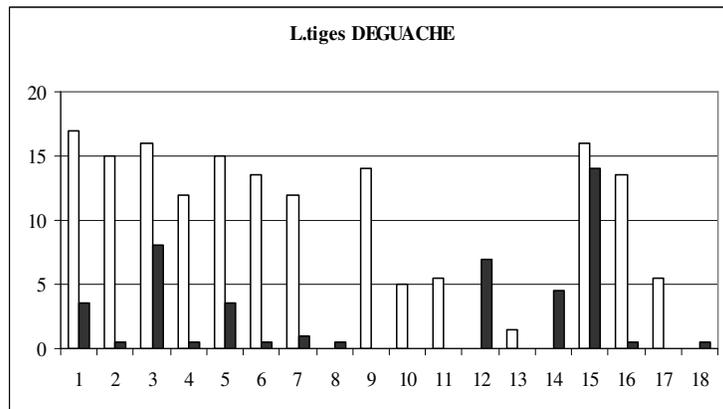
POPULATION 2

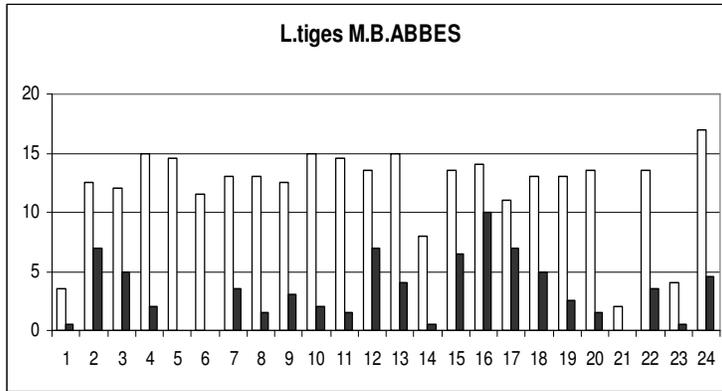


POPULATION 3

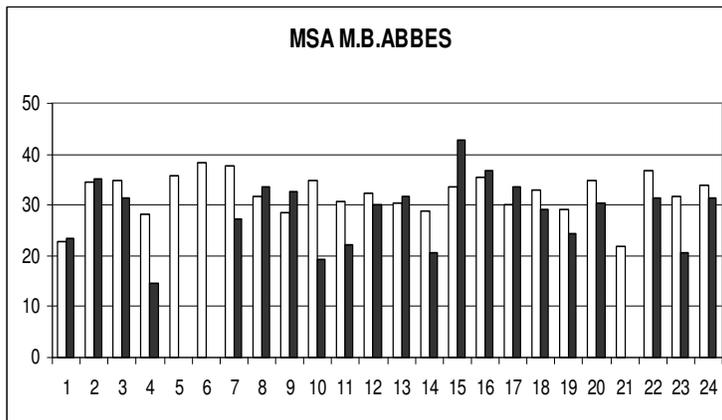


POPULATION 4

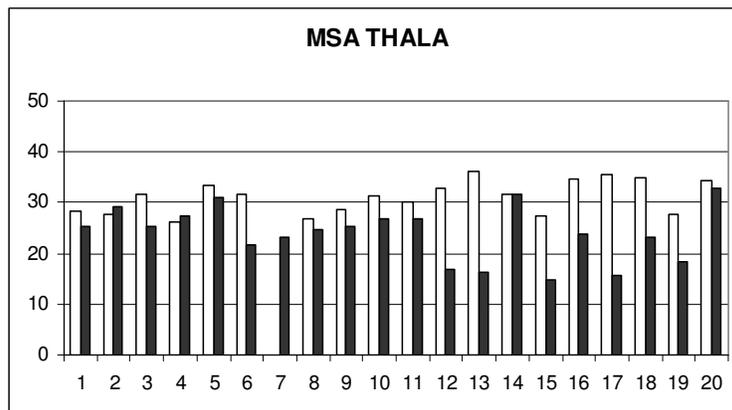
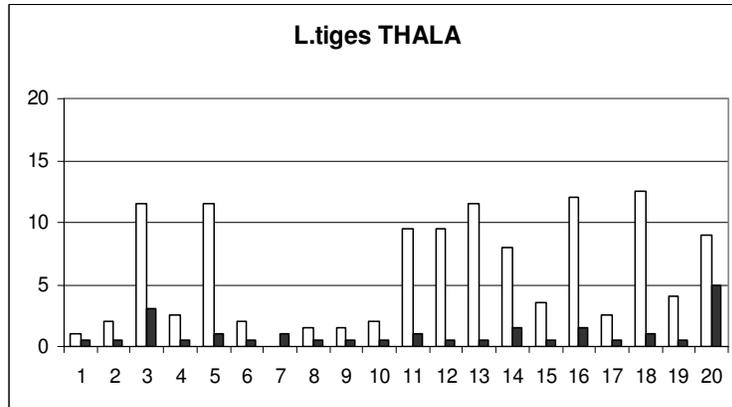


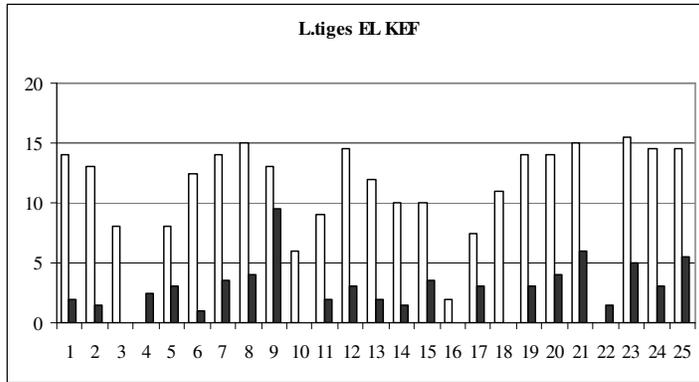


POPULATION 5

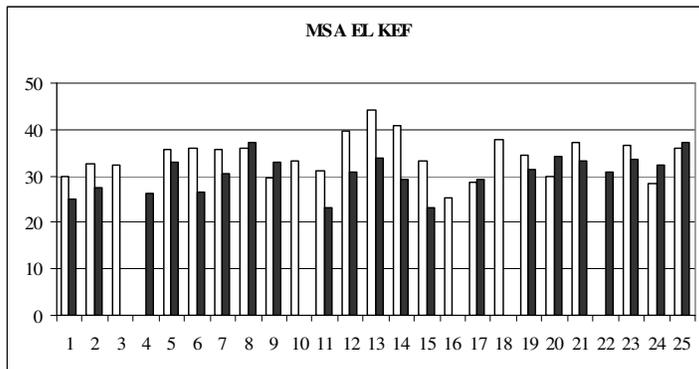


POPULATION 6

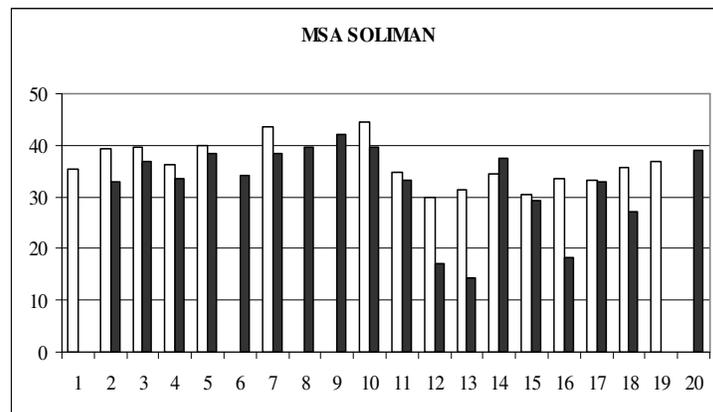
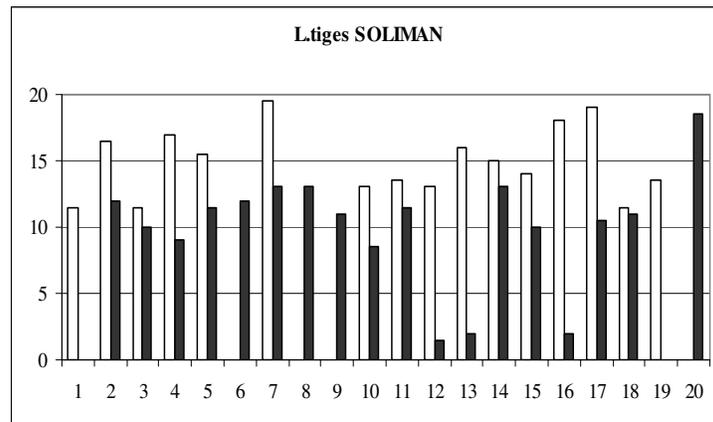


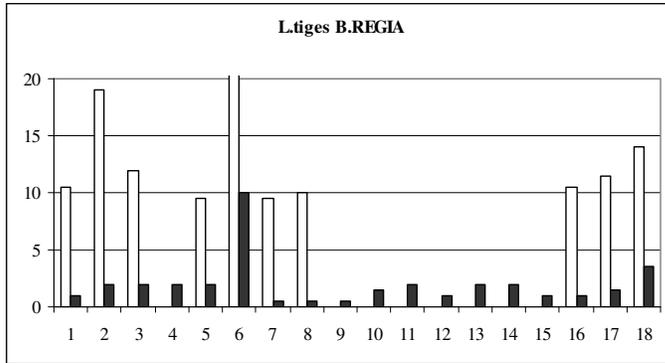


POPULATION 7

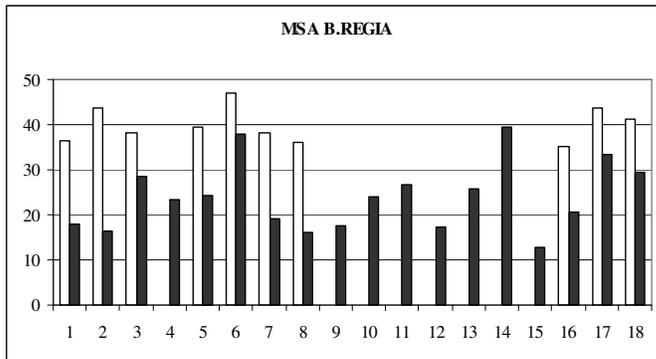


POPULATION 8

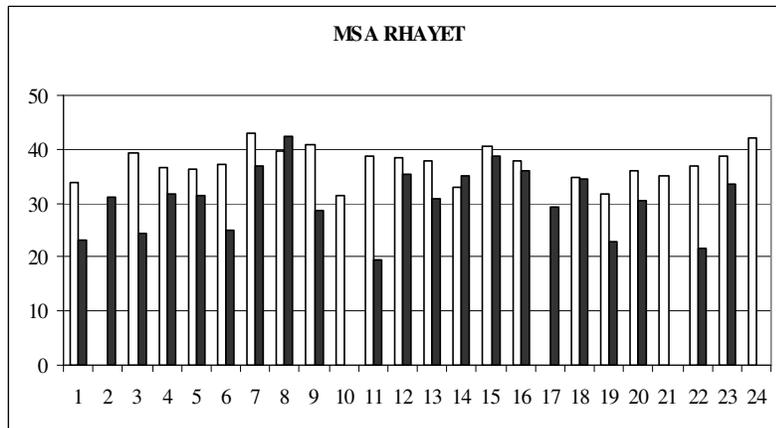
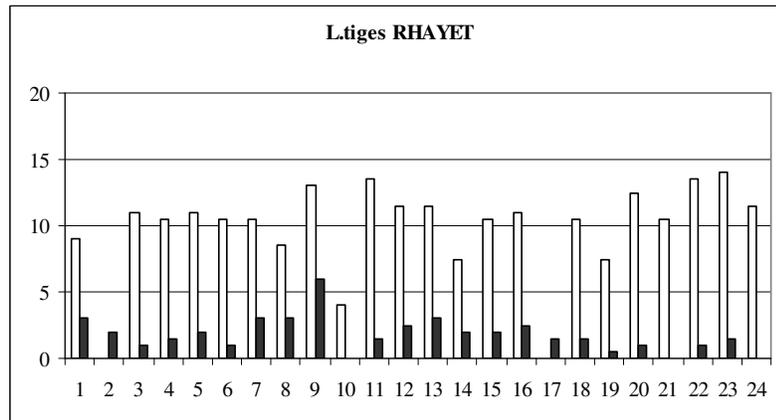




POPULATION 9



POPULATION 10



Annexe 6 :

**Article rédigé pour les journées de l'ATBT (Tunisie) publié en
2004**

**REPONSE AU STRESS SALIN DE LIGNEES TUNISIENNES
DE *MEDICAGO TRUNCATULA***

REPONSE AU STRESS SALIN DE LIGNEES TUNISIENNES DE *MEDICAGO TRUNCATULA*

Fatma LAZREK^{1,2}, Thierry HUGUET² et Mohamed Elarbi AOUBANI^{1*}. ¹Institut National de la Recherche Scientifique et Technique, Laboratoire d'Interactions Légumineuses Micro-organismes, BP 95, 2050 Hammam-lif, Tunisie. ²Centre National de la Recherche Scientifique – Institut National de la Recherche Agricole, Laboratoire d'Interactions Plantes Micro-organismes, BP27, 31326 Castanet - Tolosan Cedex, France. *Auteur pour correspondance : mohamedelarbi.aouani@inrst.mrt.tn

Résumé- En Tunisie, la salinité des sols représente un facteur limitant de la production végétale des légumineuses. La plante modèle des légumineuses *M. truncatula* est retrouvée dans des sols fortement salins. L'étude de la réponse au stress salin chez *M. truncatula* fournira une meilleure compréhension des mécanismes de tolérance au sel. L'objectif de ce travail était d'estimer la variabilité de réponse au stress salin de divers génotypes de *M. truncatula*. Des lignées ayant pour origine deux sols salins, Enfidha et Soliman ont été analysées aux premiers stades du cycle végétatif (début d'enracinement, allongement des racines) sous 75 mM de NaCl afin de distinguer des lignées contrastantes. Selon le critère de vitesse d'allongement des racines, les lignées de Soliman sont plus tolérantes que celles d'Enfidha. Parmi les lignées étudiées, certaines ont une sensibilité au sel différente selon le stade de développement considéré. Le sel influence l'épaisseur des racines, le nombre et la densité des poils absorbants.

M. truncatula / stress salin / élongation racinaire / éthylène / AVG / diversité.

Abstract- Response of *Medicago truncatula* lines to salt stress. In Tunisia, the salinity of soils represents an inhibiting factor for legumes production. The plant model *M. truncatula* is adapted to highly saline areas. The study of saline stress response in *M. truncatula* will provide a better understanding of salt tolerance mechanisms. The aim of this work was to estimate the response variability to saline stress of a wide range of genotypes of *M. truncatula*. Lines from two saline areas, Enfidha and Soliman were analyzed at the early stages of the vegetative cycle (beginning of rooting, root elongation) under 75 mM of NaCl in order to distinguish contrasting lines. According to the speed of root elongation, the lines of Soliman are more tolerant than those of Enfidha. Among the studied lines, some have a different salt sensitivity according to the development stage considered. Salt influences the thickness of the roots, the number and the density of the root hairs.

M. truncatula / salinity / root elongation / ethylene / AVG / diversity.

1. INTRODUCTION

La salinité du sol est un facteur de stress osmotique très limitant pour les plantes, il est estimé qu'elle affecte au moins 20% des terres arables et plus de 40% des terres irriguées à des degrés variables [15]. Dans plusieurs régions, ce stress abiotique devient de plus en plus un problème sérieux touchant la productivité des légumineuses à cause de l'accumulation du sel suite à l'irrigation des terres cultivées [6].

La compréhension des mécanismes adoptés par les plantes pour la tolérance au sel, nécessite l'utilisation d'une espèce végétale qui présente de la diversité pour ce caractère et qui soit accessible aux études génétiques. La plante *Medicago truncatula* qui a émergé comme plante modèle pour les légumineuses depuis plusieurs années [2], est une bonne candidate pour une analyse génétique et moléculaire [10].

En Tunisie, cette espèce est ubiquiste et pousse sous différentes conditions pédo-climatiques où elle fixe l'azote en symbiose avec les bactéries du genre *Sinorhizobium*. La nodulation de cette espèce dans les sebkhas suggère qu'elle soit tolérante à la salinité et que l'efficacité de la symbiose peut représenter une caractéristique biologique adaptative dans ces milieux. La recherche de gènes symbiotiques ou impliqués dans la tolérance à la salinité chez *M. truncatula* représente un enjeu principal des recherches réalisées sur cette plante. En plus, les résultats obtenus dans ce domaine peuvent avoir des retombées sur des légumineuses cultivées en raison de leur synténie avec cette espèce [7].

La tolérance des plantes à la salinité représente un caractère complexe qui a été qualifié par plusieurs auteurs comme polygénique [6]. La diversité des mécanismes adaptatifs impliqués dans la réponse des plantes [9] rend difficile le choix d'un seul caractère comme cible pour la manipulation de tolérance des plantes.

Parmi les réponses induites par la salinité chez les plantes on note l'émission de signaux secondaires : les phytohormones (ex : éthylène) [18]. L'éthylène, hormone impliquée dans la croissance végétale, est aussi impliquée dans le système de régulation des signaux émis par les rhizobiums [11]. En effet, cette hormone inhibe la différenciation des poils absorbants racinaires [12] lors de l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote. L'inhibiteur de biosynthèse d'éthylène, l'AVG (aminoéthoxyvinylglycine) permet l'augmentation du nombre de nodules quand il est appliqué après l'initiation de l'infection [11]. En effet l'application de ce composé à des plantes poussant sur milieu salin permet de rétablir la nodulation.

Chez les légumineuses, la production d'éthylène est induite par l'infection par les rhizobiums et semble impliquée dans la régulation par le nitrate de la nodulation [16, 17]. Cela suppose que cette hormone est un signal secondaire régulant la nodulation en réponse au statut azoté de la plante. Tout en inhibant les stades précoces et tardifs de la symbiose fixatrice d'azote : initiation du cordon d'infection ainsi que son développement [12].

En effet, deux mutants hypermodulants de *M. truncatula* ont été utilisés pour comprendre les mécanismes de contrôle de la nodulation : le mutant *sickle* [12] et le mutant *Sunn* [12]. Ces mutants ont révélé deux voies différentes de régulation [13] et ils aideront à la recherche de la nature de l'interaction entre la symbiose fixatrice d'azote et les mécanismes hormonaux contrôlant la croissance et le développement des plantes.

Dans une étape préliminaire, on a initié une étude basée sur les premiers stades de développement des plantes concernant l'allongement des racines. En effet le développement et l'élongation racinaire permettent non seulement la sélectivité de l'exploitation de domaines spécifiques des sols pour l'utilisation de nutriments et des ressources d'eau mais aussi la capacité de reconnaître et répondre à divers signaux de micro-organismes du sol.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Deux populations de *M. truncatula* ont été collectées dans deux sebkhas du nord tunisien. Des gousses en provenance de ces régions ont été ramenées du champ en juillet 1999. Cette collecte a été faite au hasard dans les localités prospectées. Les plantes ont subi deux ou trois autofécondations successives dans le but d'obtenir des lignées pures en diminuant le pourcentage d'hétérozygotie résiduelle.

Le présent travail, étudie la réponse au stress salin à la concentration de 75 mM de NaCl (concentration discriminante pour les lignées de *M. truncatula*) pour des lignées collectées. Il s'agit des lignées de Soliman (TN8.5, TN8.15, TN8.20, TN8.21, TN8.27, TN8.29) et d'Enfidha (TN1.1, TN1.6, TN1.8, TN1.11a), tout en intégrant quatre lignées de référence de différents origines: Jemalong J6, DZA45.5, DZA315.16 et F83005.5. Quelques unes de ces lignées ont été analysés pour leur tolérance au sel à des stades plus avancés du développement végétal (Lazrek et al., unpublished data). Les deux régions étudiées présentent des caractéristiques pédologiques différentes, avec des teneurs en sel de 8,65 g/l dans la solution du sol pour la localité d'Enfidha et de 4,40g/l pour Soliman.

Les graines sont stérilisées et scarifiées par immersion d'environ 6 mn dans l'acide sulfurique concentré. Ensuite, les graines sont lavés 8 à 10 fois dans de l'eau distillée stérile, puis sont laissées à imbiber durant 30 mn. Elles sont mises ensuite dans des boîtes de Pétri sur de l'Agar 0,9 % à 4°C pendant 48 heures. Elles sont mises à germer dans l'obscurité à 15°C, température optimale pour la germination des graines de *M. truncatula* (Huguet, comm. Pers.).

2.1. Conditions de cultures:

Dans la première expérience, les plantes sont cultivées sur milieu Farhaëus [5] avec ou sans 75 mM de NaCl dans des boîtes de Pétri carré de 12 cm de côté. Des mesures de l'élongation racinaire journalière sont faites entre T = 7 jours (j) et T = 13j (Figure 1) ont été effectuées à l'aide d'un curvimètre.

La 2^{ème} expérience est refaite avec les mêmes lignées mais en ajoutant à chacun de l'AVG (aminoethoxyvinylglycine), inhibiteur de synthèse d'éthylène, à une concentration finale de 2 micromolaires dans le milieu (Figure 2). Ce composé inhibera la synthèse l'éthylène due aux conditions de culture et permettra à la plante de mieux exprimer ses capacités intrinsèques d'allongement et de développement racinaires. Les mesures ont été effectuées entre T = 1j et T = 5j.

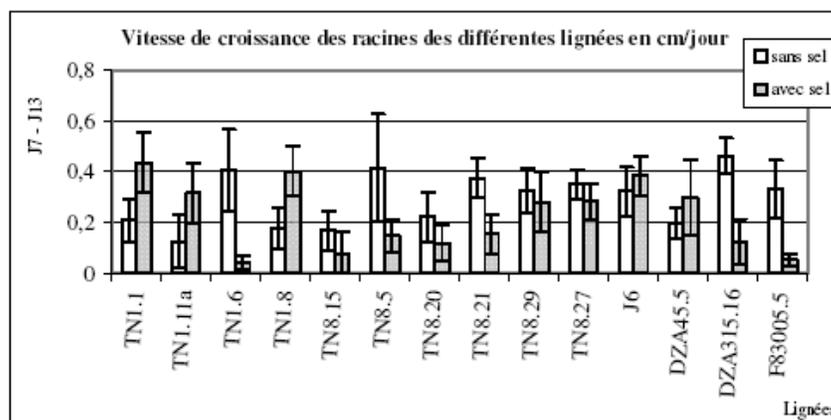


Figure1: Vitesse de croissance des racines des différentes lignées étudiées de l'âge de 7 à 13 jours, avec un traitement témoin sur milieu Farhaëus and un traitement de 75 mM de NaCl.

Les résultats sont présentés par des moyennes \pm l'intervalle de confiance au seuil de 95%

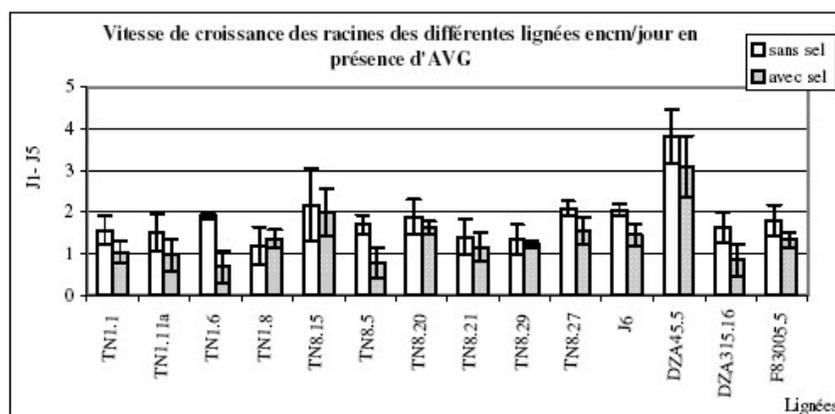


Figure2: Vitesse de croissance des racines des différentes lignées étudiées de l'âge de 1 à 5 jours, avec un traitement témoin sur milieu Farhaëus and un traitement de 75 mM de NaCl en présence d'AVG (2 micromolaires). Les résultats sont présentés par des moyennes \pm l'intervalle de confiance au seuil de 95%

La formule utilisée pour la mesure de la vitesse l'allongement des racines entre deux temps t1 et t2 était la suivante:

Vitesse = (longueur de la racine à t2 - longueur de la racine à t1) / (t2-t1)

Pour chaque génotype, 10 répétitions ont été faites et la variation de vitesse est exprimée par une moyenne et un intervalle de confiance au seuil de 95%.

Les résultats sont présentés par des moyennes \pm l'intervalle de confiance au seuil de 95%

2.3. Observations des racines:

Les racines ont été observées et photographiées à la loupe binoculaire, à un agrandissement de 10 fois.

3. RESULTATS

3.1. Etude comparative des lignées

Dans la première expérience réalisée, on a pu ressortir que les lignées en provenance de Soliman, sont surtout tolérantes (figure1). Celles d'Enfidha, montrent une variabilité de réponse extrême. Ainsi la lignée TN1.6 ne se développe pas sous sel, alors que les autres semblent tolérantes et poussent à des vitesses supérieures au témoin. Cette variabilité de comportement a été observée aussi entre les lignées des deux populations étudiées. Parmi les lignées de référence, DZA315.16 et F83005.5 semblent très sensibles au sel pour le caractère étudié.

La deuxième expérience est refaite avec les mêmes lignées mais en ajoutant à chacun de l'AVG, qui est un inhibiteur dans la chaîne de synthèse de l'éthylène (Figure2). La synthèse d'éthylène s'intensifie avec l'application du stress salin. En présence de l'AVG, les racines poussent plus vite et ceci nous permet d'explorer le degré d'action du sel sur la formation des nodules en réponse au stress salin. Cette expérience menée à un stade avancé par rapport à la première expérience a révélé un comportement différent pour certaines lignées. En présence d'AVG, la lignée de référence DZA45.5 est la plus tolérante au sel pour l'ensemble des génotypes étudiés.

Ceci montre que les plantes auraient des phases différentes de développement qui sous stress salin réagiraient différemment au démarrage de l'enracinement et au cours de l'élongation.

3.2. Effet du NaCl sur la morphologie des racines

Une observation de la morphologie racinaire a montré un effet notable du sel sur le nombre et le développement des poils absorbants, lieu d'infection ou d'absorption. Des photos prises à la loupe binoculaire (Figure3) nous ont permis d'observer une grande différence de morphologie des racines pour la lignée de référence Jemalong. En effet le traitement salin de 75mM diminue énormément le nombre de poils absorbants ainsi que leur taille.

4. DISCUSSION

L'intérêt de la mesure de la croissance racinaire des différentes lignées découle du fait que la capacité de la plante à développer son système racinaire est en relation avec ses aptitudes à l'infection en présence des souches de *Sinorhizobium* et ses capacités à interagir avec les signaux biotiques émis par les micro-organismes du sol.

Par le présent travail, on a noté une diversité de réponse au sel pour les premiers stades de développement des lignées de *M. truncatula*: initiation et élongation racinaire. Les populations naturelles de *M. truncatula* provenant des deux localités (Enfidha et Soliman) sont aussi polymorphes pour le caractère germination des graines sous différentes concentrations de sel [4].

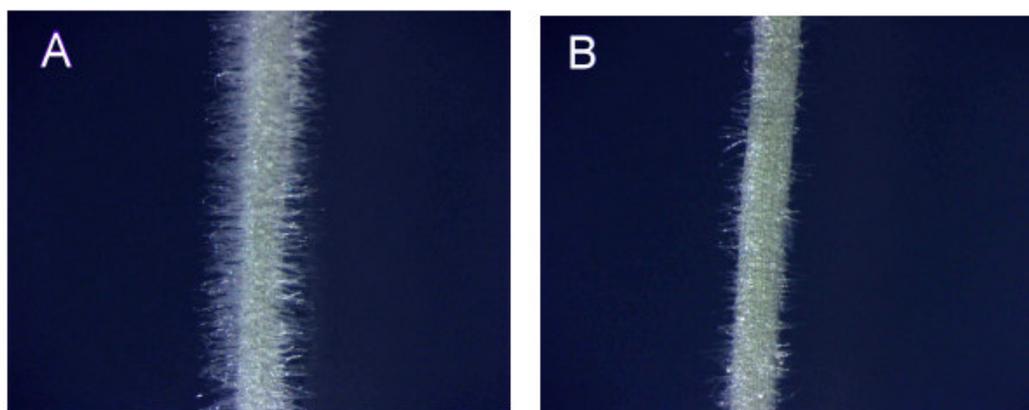


Figure 3 : Effet notable du NaCl sur l'apparition and la croissance des poils absorbants au niveau des racines de lignée de référence Jemalong à l'âge de 12 jours.

A: Racines poussant sur milieu Farhåeus présentant des poils absorbants abondants et assez allongés (Agrandissement 10x). B: Racines poussant milieu Farhåeus + NaCl à 75mM avec très peu de poils et encore non allongés (Agrandissement 10x).

On n'a pas pu comparer les deux expériences menées en absence et en présence d'AVG, vu qu'elles étaient menées deux temps différents à partir de la germination des graines. Une comparaison des lignées au même stade développement racinaire permettra de distinguer différents taux de production d'éthylène sous conditions de stress salin. On note que l'éthylène est un gaz qui joue le rôle d'hormone végétale dont la synthèse s'amplifie dans le cas de stress environnemental [1].

La diminution du nombre de poils absorbants ainsi que leur taille pourrait être défavorable à l'installation de symbiose en plus de la diminution des compétences de la plante à survivre dans un milieu salin. Ceci représente | contre une forme d'évitement qui permet à la plante d'échapper à l'effet néfaste du sel, par diminution de la surface contact avec le milieu salin.

Chez *Arabidopsis thaliana*, des travaux ont révélé que le contrôle génétique de la tolérance à NaCl durant germination et la croissance végétative sont indépendants [14]. Pour cela il sera nécessaire de compléter par une étude physiologique comparative qui apportera d'importantes informations. Comme cela a été réalisé pour des espèces telles que le maïs [3], le riz [19] et le blé [8].

D'autre part, pour accéder à une analyse génétique, il faut réaliser des croisements entre lignées contrastantes et suivre la transmission aux générations suivantes des caractères liés à la tolérance au sel. Pour cela il faudra explorer la réponse au sel avec d'autres populations provenant de sols à faibles taux de salinité afin de rechercher des lignées qui soient sensibles à une concentration de 75 mM de sel.

Remerciements : Ce travail a été financé par le projet Tunisien SERST pour la Fixation de l'Azote et par coopération France-Tunisie CMCU 00F0909 : " Identification des mécanismes développés par la symbiose *Rhizobium* légumineuses pour une interaction optimale sous contraintes environnementales: modèle *Medicago truncatula* *rhizobium* associés " .

REFERENCES

- [1] Abeles F., Morgan P., Saltveit M., Ethylene in plant biology, Academic press, San Diego, CA.
- [2] Barker D.G., Bianchi S., Blondon F., Dattée Y., Duc G., Essad S., Flament P., Gallusci P., Genier G., Guy P., M X., Tourneur J., Dénarié J., Huguet T., *Medicago truncatula*, a model for studying the molecular genetics of *Rhizobium*-legume symbiosis, Plant Mol Biol Rep 8 (1990) 40- 49.
- [3] Cerda A., Pardines J., Botella M.A., Martinez V., Effect of potassium on growth, water relations, the inorganic & organic solute contents two maize cultivars grown under saline conditions, Journal of Plant Nutrition 18 (1995) 8: 851.
- [4] Chakhari A., Mise au point des conditions de culture pour l'étude de la variabilité de réponse au sel de *M. truncatula* au stade germination et en symbiose avec la souche 2011 de *Sinorhizobium meliloti*, Faculté des Sciences de Tunis Mars 2002.
- [5] Farhåeus G., The infection of White clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple slide technique, J C Microbiol 16 (1957) 374- 381.
- [6] Flowers T.J., Koyoma S.A., Flowers S.A., Chinta S., Singh K.P. Yeo A.R., QTL: their place in engineer tolerance of rice to salinity, journal of experimental Botany 51 (2000) 99-106.
- [7] Frugoli J., Harris J., *Medicago truncatula* on the move !, Plant cell (2001) 458-463.
- [8] Gorham J., Bridges J., Dubcovsky J., Dvorak J., Hollington P.A., Luo M.C., Khan J.A., Genetic analysis & physiology of a trait for enhanced K^+/Na^+ discrimination in Wheat, New Phytologist 137 (1997) 109-116.

Actes du Symposium Franco Maghrébin : Applications Biotechnologiques de la Fixation de l'Azote. Hammamet, Tunisie, 15-18 Dec 2002

- [9] McCue K.F., Hanson A.D., drought and salt tolerance: towards understanding and application, trends biotechnol 8 (1990) 358-362.
- [10] Oldroyd G.E., Geurts R., *Medicago truncatula*, going where no plant has gone before, Trends Plant Sci 6 (2001) 552-554.
- [11] Oldroyd G.E., Eric M.E., Sharon R.L., Ethylene inhibits the nod factor transduction pathway of *Medicago truncatula*, The Plant cell 13 (2001) 1835-1849.
- [12] Penmetsa R.V., Cook D.R., A legume Ethylene insensitive mutant hyperinfected by its Rhizobial symbiont, Science 275 (1997) 527-530.
- [13] Penmetsa R.V., Frugoli J.A., Smith L.S., Long S.R., Cook D.R., Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*, Plant Physiology 131 (2003) 998-1008.
- [14] Quesada V., Garcia-Martinez S., Piqueras P., Ponce M.R., Micol J.L., Genetic architecture of NaCl tolerance in Arabidopsis, Plant Physiology 130 (2002) 951-963.
- [15] Rhoades J.D., Loveday J., Salinity in irrigated agriculture. In: American Society of civil Engineers, irrigation of agricultural crops, Steward B.A. and Nielsen D.R.(eds), AM.soc. Agronomists, Monograph 30, 1990, pp. 1089-1142.
- [16] Suganuma N., Yamauchi H., Yamamoto K., Enhanced production of Ethylene by soybean roots after inoculation with *Bradyrhizobium japonicum*, Plant Sci 111 (1995) 163-168.
- [17] Van Spronsen P.C., van Brussel A.A.N., Kijne J.W., Nod factors produced by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* induce Ethylene-related changes in root cortical cells of *Vicia sativa* ssp. *Nigra*. Eur, J cell boil 68 (1995) 463-469.
- [18] Xiong L., Zhu J.-K., Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress, Plant cell and environment 25 (2002) 131-139.
- [19] Yeo A.R., Yeo M.E., Flowers S.A., Flowers T.J., Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance, and their relationship to overall performance, Theoretical and applied genetics 79 (1990) 377-384.

Annexe 7 : Mise au point des conditions de culture pour l'étude de la partie aérienne de *M. truncatula* dans des GIFI

Une expérience de mise au point d'un autre système de culture des plantes dans des GIFI : contenant uniquement du terreau, a été réalisée pour savoir le comportement des parents dans d'autres conditions que celle In Vitro (des tubes).

Cette expérience consistait à mettre les plantules dans les GIFI et les placer dans deux récipients avec deux conditions différentes: eau de robinet sans sel et avec sel (100 mM NaCl).

La récolte des parties aériennes est faite après un mois. Des paramètres de croissance sont mesurés: longueur de la tige principale, nombre de ramifications à partir de l'axe principal, nombre total des feuilles la matière fraîche et la matière sèche.

D'après les résultats obtenus (Figure annexe 7), le seul paramètre qui montre une différence de réponse au sel entre les deux parents est la longueur des tiges. On remarque que Jemalong, en conditions contrôles, produit des ramifications secondaires alors que F83005.5 ne les produit pas.

Sous sel les étages foliaires de F83005.5 sont entassés, et la longueur des entre nœuds est très faible. De même cette plante produit plus de feuilles en présence de sel qu'en contrôle, mais ces feuilles sont de petites tailles.

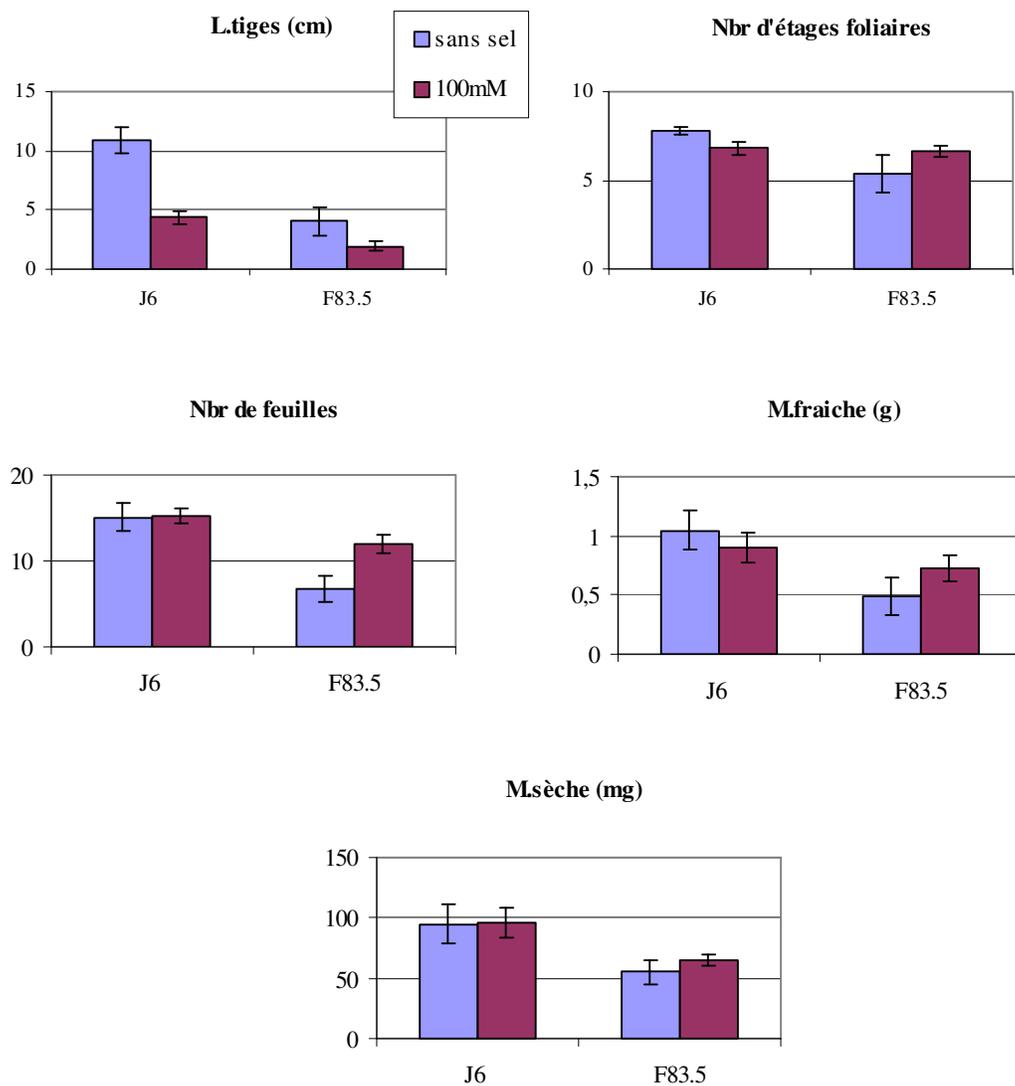
Dans ce système de culture il ressort plus de différences entre les deux plantes testées en conditions contrôles que sous stress salin.

D'après la morphologie des plantes, ce couple présente bien une différence de réponse au sel. En effet Jemalong se montre plus sensible au sel que F83005.5 puisque sa croissance est la plus réduite.

D'après cette expérience, le changement des conditions de culture montre une différence de comportement des lignées de *M. truncatula*. De même que la notion de tolérance au sel est variable selon le paramètre considéré.

Figure annexe 7: Comportement des parents Jemalong (J6) et F83005.5 (F83.5) pour différents paramètres de croissance en GIFL.

Les barres des histogrammes représentent les intervalles de confiance au seuil de 5%.



AUTEUR : FATMA LAZREK - BEN FRIHA

TITRE : Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin

DIRECTEURS DE THESE : THIERRY HUGUET / MOHAMED ELARBI AOUANI

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : TOULOUSE, le 29 Septembre 2008

RESUME

L'objectif de cette thèse est l'étude de la diversité génétique au sein de 136 lignées appartenant à 10 populations naturelles tunisiennes de *M. truncatula*. Ces populations proviennent de différentes conditions pédoclimatiques représentatives du territoire tunisien. La première partie consiste à une analyse à l'échelle moléculaire par l'utilisation de 18 microsatellites répartis sur les différents groupes de liaison. Cela a permis de structurer les populations selon un axe nord / sud séparé par la dorsale tunisienne. Le paramètre pluviométrie est le principal facteur influençant cette structuration. De même l'utilisation de marqueurs morphologiques a permis d'approfondir la caractérisation des populations et de la comparer à celle obtenue par les microsatellites.

Dans une seconde partie, on a poursuivi l'analyse de la diversité par l'étude de la variabilité de croissance d'un certain nombre de lignées, sous alimentation azotée et en symbiose avec différentes souches de *Rhizobium*, en absence ou en présence de stress salin. A partir de cette analyse, on a pu sélectionner des couples de lignées contrastants pour leur réponse au sel dans ces deux conditions étudiées qui nous ont permis d'identifier des critères de tolérance au sel.

La dernière partie concerne une analyse quantitative visant essentiellement à identifier des marqueurs impliqués dans la tolérance à la salinité chez le partenaire végétal. On a utilisé la descendance d'un croisement disponible au laboratoire entre deux lignées de référence Jemalong et F83005.5. L'analyse a concerné des caractères de croissance de la partie aérienne et racinaire chez *M. truncatula* et a permis de localiser plusieurs QTL majeurs. Ce travail a permis de constituer la première collection de *M. truncatula* dédiée à l'étude de l'adaptation des plantes aux conditions environnementales stressantes.

MOTS-CLES : populations naturelles, diversité, microsatellites, flux génique, isolation par la distance, pluviométrie, tolérance au sel, recherche QTL.

Genetic and symbiotic diversity for tunisian natural populations of *Medicago truncatula*

ABSTRACT

The objective of this thesis is to study genetic diversity within 136 lines belonging to Tunisian 10 natural populations of *M. truncatula*. These populations come from different soil and climatic conditions, representative of the Tunisian territory.

The first part consists of an analysis at the molecular level by the use of 18 microsatellites spread over different linkage groups. That helped to structure populations depending to a north / south axis separated by the Tunisian Dorsale. The parameter rainfall is the most important factor influencing this structure. Similarly, using morphological markers, we tried to deepen the characterization of populations and to make comparison with that obtained by microsatellites.

In the second part, we continued the analysis of the diversity by the study of the variability of a number of lines under nitrogen assimilation or in symbiosis with different strains of Rhizobium, in the presence or absence of salt stress. Based on this analysis, it was possible to select pairs of contrasting lines for their response to salt in those two conditions studied, which have enabled us to identify criteria for salt tolerance.

The last part involves a quantitative analysis which aimed primarily to identify markers involved in salt tolerance in the plant partner. We used the progeny of a cross available at the laboratory between two reference lines F83005.5 and Jemalong. The analysis covered characters of growth for root and shoots in *M. truncatula* and helped in locating several major QTL.

This study helped to establish the first collection of *M. truncatula* dedicated to the study of plant adaptation to environmental stress.

KEY-WORDS: Natural populations, diversity, microsatellites, gene flow, isolation by distance, rainfall, salt tolerance, QTL.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Biotechnologies

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), CNRS-INRA, BP27, 31326 Castanet - Tolosan Cedex, France.