

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المعهد القومي للعلوم الفلاحية
INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE
EL - HARRACH - ALGER

THESE

Présentée par

ABDELGUERFI-LAOUAR Meriem

En vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

**« Diversité Eco-Génétique chez les Fabacées et leurs Symbiotes :
Cas de la Section des *Intertextae* du Genre *Medicago* L. »**

Soutenue le :

Devant le Jury composé de :

Président :	Mme Nedjraoui D., Professeur – USTHB Alger Algérie
Directeur de thèse :	M. Huguct T., Professeur – ENSAT/INRA-CNRS Toulouse France
Co-Directeur :	M. Bouznad Z., Professeur – INA El Harrach Algérie
Examineurs :	M. Guittonneau G.G., Professeur – Univ. d'Orléans France
	M. Aouani M.E., Professeur – INRST Hammam Lif Tunisie
	Mme Louanchi M., Maître de Conférences - INA El-Harrach Algérie
Invité :	Mme Fyad F.Z., Maître de Conférences – Univ. d'Oran Es Senia Algérie

Année Universitaire : 2004/2005

Diversité éco-génétique chez les Fabacées et leurs symbiotes : Cas de la section des *Intertextae* du genre *Medicago* L.

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
 PREMIERE PARTIE : MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE ET PROBLEMATIQUE	
I. 1. Quelques contraintes écologiques de la région Méditerranéenne	9
I. 2. Intérêts agronomiques et environnementaux des légumineuses fourragères. Place de la section des <i>Intertextae</i>	10
I.2.1. Légumineuses fourragères et développement durable	10
I.2.2. La section <i>Intertextae</i> : quels intérêts agronomique et environnemental peut-elle apporter ?	13
I. 3. Taxinomie et phylogénie du genre <i>Medicago</i> : Statut de la section des <i>Intertextae</i>	16
I.3.1. Taxinomie du Genre <i>Medicago</i>	16
I.3.2. Section des <i>Intertextae</i> , problématique du complexe <i>M. ciliaris</i> - <i>M. intertexta</i>	18
I. 4. Géographie et écologie chez <i>Medicago</i>, focalisation sur la section des <i>Intertextae</i>	21
I.4.1. Origine géographique	21
I.4.2. Fréquence et distribution des espèces	23
I.4.3. Adaptation écologique	25
I.4.4. Spéciation et création d'espèces	29
I. 5. La symbiose Rhizobium-Légumineuses	31
I.5.1. Mécanismes de la symbiose	32
I.5.2. Classification et taxonomie des rhizobiums. Spécificité chez la section <i>Intertextae</i>	38
I. 6. <i>Medicago truncatula</i> et <i>Sinorhizobium meliloti</i>, des organismes modèles pour l'étude des interactions rhizobium-légumineuses	41
I. 7. Approche entreprise	42
 DEUXIEME PARTIE : AUTOECOLOGIE ET DISTRIBUTION	
II. 1. Introduction	45
II. 2. Etude du complexe <i>M. ciliaris</i>-<i>M. intertexta</i> en Algérie	47
II.2.1 Matériel et méthodes	47
II.2.2. Résultats	49
II.2.2.1. Comparaison entre les sites des deux taxons	49
II.2.2.2. Comparaison entre les sites de <i>M. ciliaris</i> seul, ceux de <i>M. intertexta</i> seuls et les sites mixtes	51
II.2.3. Discussion	55
II.2.3.1 Exigences écologiques. Spécificité ou similitude	55
II.2.3.2. Adaptation écologique de <i>M. ciliaris</i> et <i>M. intertexta</i>	56
II.2.3.3. Distribution éco-géographique et hypothèses de spéciation	58
II. 3. Exigences écologiques des <i>Intertextae</i> dans le Bassin Méditerranéen	59
II.3.1. Matériel et méthodes	59
II.3.2. Résultats	61
II.3.2.1 Fréquences et distribution des taxons	61

II.3.2.2. Variabilité inter-taxons	63
II.3.3. Discussion	69
II. 4. Conclusion	70

TROISIEME PARTIE : TYPOLOGIE ET ANALYSE DE LA VARIABILITE MORPHO-PHENOLOGIQUE

III. 1. Introduction	72
III. 2. Diversité du complexe <i>M. ciliaris</i>-<i>M. intertexta</i> d'origine algérienne	74
III.2.1. Matériel et méthodes	74
III.2.2. Résultats	78
III.2.2.1. Diversité intra-taxon et recherche de polymorphisme	78
III.2.2.2. Relation entre les données morpho-phénologiques et éco-géographiques	85
III.2.2.3. Différences ou ressemblances inter-taxon. Sur quels caractères se baser ?	86
III.2.2.4. Les populations sympatriques de <i>M. ciliaris</i> et <i>M. intertexta</i> . Quelles relations morpho-phénologiques ?	92
III.2.2.5. Position de la population « particulière » dans le complexe <i>M. ciliaris</i> - <i>M. intertexta</i>	92
III.2.2.6. Diversité des marques foliaires chez le complexe <i>M. ciliaris</i> - <i>M. intertexta</i>	96
III.2.3. Discussion	99
III. 3. Positionnement du complexe <i>M. ciliaris</i>-<i>M. intertexta</i> dans la section des <i>Intertextae</i>	103
III.3.1. Matériel et méthodes	103
III.3.2. Résultats	105
III.3.2.1. Diversité des taxons au niveau méditerranéen	105
III.3.2.2. Typologie des taxons : quel statut taxinomique intra section ?	112
III.3.3. Discussion	118
III. 4. Conclusion	120

QUATRIEME : CARACTERISATION PAR MARQUAGE MOLECULAIRE

IV. 1. Introduction	122
IV. 2. Structuration du complexe <i>M. ciliaris</i>-<i>M. intertexta</i> par marquage PCR-ISSR	125
IV.2.1. Matériel et méthodes	125
IV.2.2 Résultats	127
IV. 3. Marquage codominant (SSRs) pour l'étude des <i>Intertextae</i>	129
IV.3.1. Portabilité de 50 marqueurs SSRs cartographiés chez <i>M. truncatula</i> sur les légumineuses	129
IV.3.1.1. Matériel et méthodes	132
IV.3.1.2. Résultats	134
IV.3.2. Diversité des taxons à partir de marqueurs SSRs polymorphes	138
IV.3.1.1. Matériel et méthodes	138
IV.3.1.2. Résultats	142
IV. 4. Discussion et conclusion	146

CINQUIEME PARTIE : UTILISATION DE L'OUTIL DE SPECIFICITE SYMBIOTIQUE POUR LA STRUCTURATION DE LA SECTION DES *INTERTEXTAE*

V. 1. Introduction	149
V. 2. Matériel et méthodes	151
V. 3. Résultats et discussion	155

V.3.1. Constitution de la collection de souches de rhizobiums chez la section des <i>Intertextae</i>	155
V.3.2. Détermination taxinomique des Rhizobiums. A quelle espèce (<i>Sinorhizobium meliloti</i> et/ou <i>S. medicae</i>) appartiennent les souches de Rhizobiums purifiés?	157
V.3.3. Réponses symbiotiques de la section des <i>Intertextae</i> aux inoculations de différentes souches de <i>Sinorhizobium</i> . Existe-t-il des spécificités symbiotiques ?	158
V.3.4. Marquage moléculaire (REP et BOX) et diversité génétique des Rhizobiums	163
V. 4. Conclusion	165
SYNTHESE ET CONCLUSION GENERALE	166
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	172
ANNEXES ET MANUSCRITS	
RESUMES	

Le genre *Medicago* est particulièrement important pour le développement des productions fourragères et pastorales. Il est représenté par quatre sous-genres dont *Spirocarpos* qui renferme la section des *Intertextae* avec quatre taxons : *M. ciliaris*, *M. intertexta*, *M. granadensis* et *M. muricoleptis*. Dans cette section, et particulièrement entre *M. ciliaris* et *M. intertexta*, des controverses de classification existent. En outre, dans ce complexe d'espèces, des populations « particulières » ont été déterminées à partir de la morphologie de leurs gousses qui sont différentes de celles de *M. ciliaris* et de *M. intertexta*.

Ce travail porte sur l'évaluation de la diversité éco-génétique des taxons de la section des *Intertextae* et de leurs symbiotes et est basé sur une approche multidisciplinaire (écologie, morpho-phénologie, marqueurs moléculaires et microbiologie). L'étude a porté sur des populations algériennes de *M. ciliaris* et *M. intertexta*, puisque seuls ces deux taxons sont natifs du Maghreb, mais aussi sur l'ensemble des *Intertextae* au niveau Méditerranéen.

M. ciliaris présente la plus large distribution géographique, avec la plus grande variabilité écologique de toute la section des *Intertextae*. Ce taxon est moins exigeant en pluviosité, supporte des taux de calcaires plus élevés et est peu affecté par le froid en comparaison avec *M. intertexta*. *M. muricoleptis* est le plus exigeant des taxons en pluviosité. Des sites sympatriques où coexiste *M. ciliaris* avec *M. intertexta* ont été étudiés.

Pour la plupart des caractères morphologiques ainsi qu'avec les marqueurs moléculaires ISSR, les deux taxons, *M. ciliaris* et *M. intertexta*, sont différents. Un nouveau caractère morphologique les différenciant a été trouvé : le nombre de dents sur les stipules. Cependant, pour certains caractères morphologiques, tels que le nombre de fleurs par inflorescence, et en utilisant les marqueurs microsatellites, une certaine continuité de variation a été remarquée entre les taxons. Cette continuité de variation pourrait être le résultat d'échanges génétiques, ce qui indiquerait que la spéciation est en cours et ce qui expliquerait les ambiguïtés de classification de *M. ciliaris* et *M. intertexta*. Cette spéciation serait mixte, sympatrique et allopatrique, en raison de l'existence de deux types de séparations génétiques l'une à travers des barrières de croisement (décalage de floraison) entre ces deux taxons dans certains sites mixtes et l'autre par la séparation géographique entre *M. ciliaris* (Nord-Ouest) et *M. intertexta* (Nord-Est). Taxinomiquement, *M. ciliaris* et *M. intertexta* présentent assez de caractères contrastés pour être classés en espèces différentes. *M. intertexta* confirme son taux important d'allogamie par rapport aux autres taxons de la section des *Intertextae*.

En se basant sur la morphologie des gousses, trois types ont été déterminés chez *M. muricoleptis*. *M. granadensis* est le plus éloigné morphologiquement et génétiquement des trois autres taxons de la section des *Intertextae*. L'analyse de la diversité des quatre taxons ensemble montre que *M. muricoleptis* et *M. granadensis* sont différents et ne permettent aucune confusion avec les autres espèces. Pour ces quatre taxons nous confirmons leur capacité à n'entrer en symbiose qu'avec *Sinorhizobium medicae*. Nous avons montré que *M. muricoleptis* et *M. granadensis* qui sont cantonnés à des aires géographiques déterminées et sont absents en Algérie arrivent à réaliser des symbioses efficaces avec des souches de *S. medicae* algériennes.

Les populations « particulières », bien qu'elles se positionnent phéno-morphologiquement et génétiquement (ISSR et SSR) entre *M. ciliaris* et *M. intertexta*, ne correspondent pas à l'hybride en raison de l'absence de caractères ou marqueurs hétérozygotes entre ces deux taxons. Nous suggérons donc que ces populations constituent un nouveau taxon qui pourrait être l'ancêtre de *M. ciliaris* et *M. intertexta*. Cette hypothèse est appuyée par le fait que ces populations présentent une capacité symbiotique spécifique avec *Sinorhizobium meliloti* alors que les quatre autres taxons de la section des *Intertextae* auraient perdu cette aptitude. Compte tenu de ces différences morphologiques (morphologie des gousses et marque foliaire), génétiques et symbiotiques, nous proposons de classer ce taxon comme une nouvelle espèce dans la section des *Intertextae*.

Mots clés : *Medicago*, Section des *Intertextae*, Taxonomie, Spéciation, Diversité Génétique, Ecologie, Morpho-phénologie, Marqueage Moléculaire, Spécificité Symbiotique.

Summary

Eco-Genetic Diversity of *Fabaceae* and Theirs Symbionts : Case of *Intertextae* Section of the Genus *Medicago* L.

The *Medicago* genus is of special interest for fodder and pastorales productions. It is represented by four sub-genera of which the *Spirocarpos* which contains the section of *Intertextae* with four taxons: *M. ciliaris*, *M. intertexta*, *M. granadensis* and *M. muricoleptis*. In this section and especially between *M. ciliaris* and *M. intertexta* there is a controversy about classification. In this complex of species, "particular" populations were determined based on the morphology of their pods different from those of *M. ciliaris* and *M. intertexta*.

This work, based on a multidisciplinary approach (ecology, morpho-phenology, molecular markers and microbiology), concerns the evaluation of the eco-genetic diversity of taxon of the *Intertextae* section and their symbiotes. Since, only *M. ciliaris* and *M. intertexta* are native of the Maghreb; this study relate on Algerian *M. ciliaris* and *M. intertexta* and to *Intertextae* on the Mediterranean basin.

M. ciliaris has the broadest ecological distribution with the greatest ecological variability of all the section of *Intertextae*. This taxon is less demanding in rainfall, supports higher limestone rates and is less affected by the cold than *M. intertexta*. *M. muricoleptis* is the most demanding taxon in rainfall. Sympatric sites where *M. ciliaris* coexists with *M. intertexta* have been studied.

The number of teeth on stipule has been identified as a new morphological character which differentiate between *M. ciliaris* and *M. intertexta*. For most of the morphological characters, as for markers ISSR, these two taxons are different. On the other hand, for some morphological characters, such as the number of flowers by inflorescence, and from the microsatellites markers, a continuous variation was detected between taxons. This genetic variation is the result of genetic exchange which could indicate that speciation is on hand. This would be the cause of the ambiguities of classification of *M. ciliaris* and *M. intertexta*. This speciation is mixed, sympatric and allopatric, owing to the fact that there are two types of genetic separations one through barriers of crossing (different flowering times) between these two taxons in certain sites and the other by geographical separation between *M. ciliaris* (North-Western) and *M. intertexta* (North-Eastern). Taxinonically, *M. ciliaris* and *M. intertexta* present enough contrasted characters to be classified in different species.

M. intertexta confirms his high rate of cross-fertilization compared to the others taxons of the *Intertextae* section.

Based on the morphology of their pods, three types were observed in *M. muricoleptis*. *M. granadensis* is the most distant morphologically and genetically from the three others taxons of *Intertextae* section. The analysis of the diversity of the four taxons together shows that *M. muricoleptis* and *M. granadensis* are different and do not allow any confusion with the other species. For these four taxons we have confirmed their capacity to enter in symbiosis only with *Sinorhizobium medicae*. We showed that *M. muricoleptis* and *M. granadensis* which are confined in geographical areas, and are absent in Algeria, manage to carry out effective symbioses with strains of Algerian *S. medicae*.

The particular populations, although they locate, pheno-morphologically and genetically (ISSR and SSK) between *M. ciliaris* and *M. intertexta*, do not correspond to an hybrid owing to the fact that they do not present traits or markers heterozygotes between these two taxons. We suggest that these populations are a new taxon which could be the ancestor of *M. ciliaris* and *M. intertexta*. This hypothesis is supported by its symbiotic capacity to nodulate with *Sinorhizobium meliloti* whereas the four taxons of the *Intertextae* section would have lost this aptitude. Taking into account these morphological (morphology of the pods and foliar mark), genetics and symbiotic differences, we classify this taxon as a new species in the section of *Intertextae*.

Key words: *Medicago*, Section of *Intertextae*, Taxonomy, Speciation, Genetic Diversity, Ecology, Morpho-phenology, Molecular Marker, Symbiotic Specificity.