THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Ecologie Fonctionnelle

Présentée et soutenue par :

Mme YOUSSRA MILOUD

le lundi 12 novembre 2018

Titre :

Etude du potentiel bénéfique des souches de Rhizobium pour Medicago truncatula: symbiose, solubilisation du phosphate et lutte contre la verticilliose.

Ecole doctorale :

Sciences de l'Univers de l'Environnement et de l'Espace (SDUEE)

Unité de recherche :

Ecologie Fonctionnelle (ECOLAB)

Directeur(s) de Thèse :

MME MARTINA RICKAUER

M. OMRANE BELHADJ

Rapporteurs :

M. CHRISTOPHE VERONESI, UNIVERSITE DE NANTES

M. MOKHTAR YOUCEF BENKADA, UNIVERSITE DE MOSTAGANEM

M. NACEUR DJEBALI, CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE BORJ CEDRIA

Membre(s) du jury :

M. MOKHTAR YOUCEF BENKADA, UNIVERSITE DE MOSTAGANEM, Président

Mme MARTINA RICKAUER, INP TOULOUSE, Membre

M. OMRANE BELHADJ, FACULTE DES SCIENCES DE TUNIS, Membre

M. YASSINE MABROUK, CNSTN TUNISIE, Membre

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet. En effet, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser sereinement.

Au tout début de ces remerciements, j'aimerais mentionner que cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un programme PHC-Utique (13G 0925) géré par le CMCU, et que sans les fianancements perçus par ce projet et par les bourses d'alternance du ministère de l'enseignement supérieur et de larecherche scientifique cette thèse n'aurait pas pu être accomplie.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Martina RICKAUER qui fut pour moi plus qu'une directrice de thèse. Malgré ses nombreuses charges, elle a toujours été attentive et disponible. J'aimerais la remercier pour tout le temps qu'elle m'a consacré tout au long de ces années, tant sur le plan personnel que scientifique. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur.

Mon directeur de thèse tunisien Omrane BELHADJ pour sa gentillesse et surtout de m'avoir permis de réaliser mon travail de paillasse dans les meilleures conditions possibles.

Mention spéciale à Yassine MABROUK qui m'a appuyé depuis le début de ma thèse. Très humblement, je voudrais te dire merci pour ton soutien et tes multiples encouragements répétés.

Je tiens à remercier tous les membres du jury et notamment Professeur Mokhtar YOUCEF BENKADA, Docteur Christophe VERONESI et Docteur Naceur DJEBALI qui ont accepté de lire et d'évaluer mon manuscrit et de participer à mon jury de thèse.

Je ne saurais terminer sans souligner le soutien amical et chaleureux de tous les collègues de mes deux laboratoires d'accueil, qui tous les jours m'ont soutenue durant ce parcours doctoral. Je m'abstiens de les nommer tellement la liste est longue. Cependant, je nommerai tout de même Yanis AMOKRANE, Abed Sbeiti et Maoulida TOUENI, que je remercie spécialement pour leurs aides et conseils au quotidien.

Dédicaces

Comme marque de reconnaissance, je dédie ce travail à :

A mes très chers parents Zeineb TOUZRI et Jamel MILOUD, Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. En témoignage de tant d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières, pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et tous vos efforts. EN CE JOUR, J'ESPERE REALISER L'UN DE VOS REVES.

A mes chères sœurs Safé, Amal et Eya. Des sœurs comme on ne peut trouver nulle part ailleurs, vous étiez à mes côtés pendant toutes les étapes de ce travail, j'en suis très reconnaissante. Je ne saurai traduire sur du papier l'affection que j'ai pour vous. Je vous espère un meilleur avenir.

A mon cher et adorable mari Gilen IRIART. Aucun mot ne peut exprimer mon amour pour toi. Depuis que je t'ai connu, tu n'as pas arrêté de me faire vivre les meilleurs moments de ma vie mais aussi de me soutenir dans les pires. Ton amour pour moi m'a rendu plus forte et a fait de moi la femme la plus heureuse au monde. Tu es mon rayon de soleil dans un pays où il pleut tout le temps. Je te remercie d'avoir croisé mon chemin un vendredi 4 mars 2016 et de m'avoir dit je t'aime en pleurant un samedi 5 aout 2017…

A mes beaux-parents Elisabeth et Alexis IRIART, à mon beau-frère et ma belle-sœur Xabi et Steph et leurs enfants. Merci de m'avoir accueilli dans votre famille avec autant d'amour, merci de m'avoir encouragé et d'avoir cru en moi.

A toute ma grande famille pour votre soutien. A ma chère grand-mère Soussia, à ma regréttée grand-mère Chadlia. A mes oncles et tantes, à mes cousins et cousines.

Et enfin à tous mes amis, tous ceux que j'aime et tous ceux qui m'aiment.

Résumé

En raison de leur capacité à former une symbiose avec des bactéries du sol appelées Rhizobium, ces bactéries fixent l'azote atmosphérique et leurs plantes-hôtes n'ont donc pas besoin de fertilisant azoté, les légumineuses jouent un rôle important dans l'agriculture. En outre, certaines souches de Rhizobium ont la capacité de solubiliser le phosphate, fournissant ainsi du phosphore assimilable aux plantes hôtes. Une aptitude à lutter contre certains agents pathogènes a aussi été démontrée dans plusieurs études. La présente étude évalue l'efficacité symbiotique de rhizobiums tunisiens, leur capacité à solubiliser le phosphate, et leur aptitude à lutter contre la verticilliose ainsi que d'autres champignons pathogènes chez *Medicago truncatula*.

Trente-six isolats de rhizobiums prélevés sur des nodules racinaires de *M. truncatula* provenant de différentes régions de Tunisie ont été obtenus pour ce travail.

Environ 60% de ces isolats étaient capables de solubiliser le phosphate *in vitro*. Dans une seconde étape, trois rhizobiums solubilisant le phosphate et un isolat incapable de solubiliser le phosphate *in vitro* ont été utilisés pour des essais en phytotron afin de voir l'effet de la présence des rhizobiums sur les paramètres de croissance des plantes en présence de phosphate inorganique sous forme de $CaHPO_4$ et rocheux sous forme brute. Les résultats de l'essai montrent que les plantes de la lignée A17 traitées au $CaHPO_4$, ont tendance à produire plus de nodules et de biomasse aérienne que la lignée F83005.5 et que la forme du phosphate utilisé, soluble ou non soluble, affecte les paramètres étudiés.

L'inoculation de quatre lignées de *M. truncatula* avec 16 isolats de rhizobium sélectionnés auparavant a montré une interaction significative entre les isolats et les lignées pour la symbiose visible par la formation de nodules. Tous les isolats de rhizobium testés ont augmenté la biomasse aérienne des plantes, réduit la biomasse racinaire et entraîné une teneur plus élevée en azote mais l'effet dépendait de l'isolat de rhizobium et de la lignée de *M. truncatula* utilisés.

Enfin, ces isolats ont été testés pour leur capacité à protéger des plantes de *M. truncatula* contre une maladie racinaire, la verticilliose. Des activités antagonistes in vitro contre divers champignons pathogènes dont Verticillium et Fusarium ont également été recherchées permettant d'identifier un isolat efficace pour la lutte biologique.

Les résultats de cette étude suggèrent que des isolats de rhizobium sélectionnés pourraient être utilisés comme biofertilisants dans les sols pauvres pour réduire l'utilisation d'engrais chimiques azotés et phosphorés mais pas pour lutter contre la verticilliose.

Mots clés : Biodiversité, légumineuses, Fixation de l'azote, Bactéries favorisant la croissance des plantes, Rhizobium, verticilliose.

Abstract

Because of their ability to form a symbiosis with soil bacteria called Rhizobium, legumes play an important role in agriculture. These bacteria fix atmospheric nitrogen; hence their host plants do not need nitrogen fertilizers. In addition, some strains of Rhizobium have the ability to solubilize phosphate, thus providing phosphorus to host plants. An ability to control certain pathogens has also been demonstrated in several studies. The present study evaluates the symbiotic efficiency of Tunisian rhizobia, their ability to solubilize phosphate, and their ability to control Verticillium wilt and other pathogenic fungi in *Medicago truncatula*.

Thirty-six rhizobial isolates were obtained from root nodules of *M. truncatula* from different parts of Tunisia were used in this work.

About 60% of these isolates were able to solubilize phosphate *in vitro*. In a second step, three phosphate solubilizing rhizobia and one isolate unable to solubilize phosphate in vitro were used for phytotron assays to see the effect of the presence of rhizobia on plant growth parameters in the presence of soluble and insoluble forms of phosphate. The results of the experiment show that A17 plants treated with $CaHPO_4$, tend to produce more nodules and shoot biomass than F83005.5 and that the phosphate form used, soluble or non-soluble, affects parameters studied.

Inoculation of four *M. truncatula* lines with 16 previously selected rhizobial isolates showed significant interaction between isolates and lines for symbiotic abilities as visualised by nodule formation. All rhizobial isolates tested increased above-ground biomass, reduced root biomass, and increased nitrogen content with strains effects of plant genotype and bacterial isolate.

Finallly, these isolates were tested for their ability to protect *M. truncatula* plants against Verticillium wilt, and to inhibit the growth of pathogenic fungi such as Verticillium and Fusarium *in vitro*. However, no isolate could be identified as effective for biological control.

The results of this study suggest that selected rhizobial isolates could be used as biofertilizers in poor soils to reduce the use of nitrogen and phosphorus fertilizers but not to control Verticillium wilt.

Keywords: Biodiversity, Legume plants, Nitrogen fixation, Plant growth promoting bacteria, Rhizobia, Verticilliose.

Table des matières

Remerciements....1
Dédicaces....2
Table des matières....5
Liste des figures....9
Liste des tableaux....12
A. Introduction....15
I. Les Légumineuses....19
1. Importance et rôle des légumineuses....19
1. 1. Alimentation humaine et animale....19
1. 2. Importance dans les systèmes de culture, les écosystèmes naturels et l'agroforesterie....21
1. 3. Intérêt industriel et médical....23
2. *Medicago truncatula* en tant que plante modèle....23
2. 1. Intérêts agronomiques....25
2. 2. Caractéristiques et intérêts génétiques et génomiques....25
II. La symbiose fixatrice d'azote....27
1. Cycle de l'azote....27
2. Interaction Rhizobium-légumineuses....31
3. Les Rhizobium....35
4. Nodulation et fixation symbiotique d'azote....35
III. Autres associations bénéfiques avec des rhizobactéries....39
1. Bénéfices par action directe sur les plantes....39
2. Rôle du phosphore dans la plante....39
2. 1. Problématique du phosphore....41
2. 2. Cycle du phosphore....43
2. 3. Mécanismes de solubilisation de phosphates chez les rhizobactéries....45
IV. Les maladies fongiques chez les légumineuses....47
1. Quelques exemples de maladies fongiques....49
2. *Verticillium* sp : agent causal de la verticilliose....51
3. Mécanismes de défense chez la plante....53
B. Matériel et Méthodes....59

I. Matériel biologique....61
1. Matériel végétal : *Medicago truncatula*....61
2. Les souches de champignons....61
3. Les isolats de rhizobium....61
II. Méthodes....61
1. Germination des graines....61
2. Culture des champignons et production de spores....63
3. Isolements des isolats de rhizobium à partir de nodules....63
4. Evaluation de la performance des rhizobiums pour la fixation symbiotique de l'azote....65
4.1. Test de nodulation in vitro....65
4.2. Tests de nodulation en pots....67
a. Inoculation des plantules....67
b. Les trois essais de nodulation en pots....67
c. Dosage d'azote....69
5. Evaluation de la performance des Rhizobium pour la solubilisation du phosphate....69
5. 1. Solubilisation du phosphate in vitro....69
5. 2. Solubilisation du phosphate et effet sur la croissance des plantes....71
a. Solubilisation du phosphate en pots : différences entre phosphate soluble et phosphate inorganique insoluble....71
b. Solubilisation du phosphate en pots : différences entre phosphate rocheux et phosphate soluble....71
6. Essai de biocontrôle....73
6. 1. Test d'antagonisme in vitro....73
6. 2. Inoculation et notation de symptômes....73
7. Analyse statistique des données....75
C. Résultats....77
I. Obtention d'isolats de Rhizobium dans le centre de la Tunisie....78
II. La symbiose....79
1. Etude du pouvoir nodulant *in vitro* de deux lignées de *M. truncatula* inoculées avec 36 isolats de rhizobium....79
2. Effet de douze isolats de rhizobiums sur la croissance et le développement des plantes en pot, en serre et en phytotron....83
2. 1. La nodulation de quatre lignées de M. truncatula est très affectée par l'interaction du génotype et de l'isolat....83

2. 2. Le nombre de feuilles sur les plantes inoculées en phytotron est plus élevé que sur les plantes inoculées en serre 85

2. 3. Effet de la symbiose sur la biomasse aérienne fraîche 87

2. 4. Effet de la symbiose sur la biomasse aérienne sèche 91

3. Effet symbiotique de quatre isolats de Rhizobium tunisiens sur quatre accessions de *Medicago truncatula* 93

3. 1. L'inoculation de quatre lignées de Medicago truncatula par différents isolats de Rhizobium montre une forte interaction du génotype et de l'isolat sur la nodulation. 93

3. 2. L'inoculation de quatre lignées de Medicago truncatula par différents isolats de Rhizobium augmente le poids des parties aériennes 95

a. Biomasse aérienne fraîche 95

b. Biomasse aérienne sèche 97

3. 3. L'inoculation de quatre lignées de Medicago truncatula par différents isolats de Rhizobium diminue le poids de la racine 99

a. Biomasse racinaire fraîche 99

b. Biomasse racinaire sèche 101

3. 4. Les parties aériennes se développent au dépend des racines sous l'effet de l'inoculation 102

3. 5. La symbiose du rhizobium entraîne une augmentation de la teneur en azote de la plupart des plantes 103

III. Capacité des Rhizobia à solubiliser le phosphate et effet sur la croissance des plantes 107

1. Solubilisation du phosphate sous forme de $CaHPO_4$ *in Vitro* 107

2. Effet de la présence des rhizobiums sur la croissance des plantes dans un substrat où la source de phosphate est insoluble 111

2. 1. Nodulation des plantes de M. truncatula sous $CaHPO_4$ comme seule source de Phosphate 111

2. 2. Effet de la présence de Rhizobium en condition de phosphate insoluble sur la biomasse aérienne 113

2. 3. L'inoculation des rhizobiums en présence de $CaHPO_4$ comme source de phosphore n'affecte pas la biomasse racinaire 114

3. Effet des rhizobiums sur la croissance des plantes en culture avec le phosphate rocheux comme seule source du phosphate 115

3. 1. La nodulation par rhizobium est supérieure quand la source de phosphate est le phosphate rocheux 117

3. 2. La source du phosphate influence les paramètres de croissance des plantes 117

IV. Etude de la possibilité de biocontrôle par les isolats tunisiens de rhizobium 123

1. Effet des Rhizobium sur l'infection de *M. truncatula* par *V. alfalfae* 123
1. 1. Essai de protection contre V. alfalfae avec plantes âgées de 10 jours 123
1. 2. Essai de protection contre V. alfalfae avec plantes âgées de 13 jours 125
a. préinoculation avec les isolats tunisiens de Rhizobium 125
b. Pré-inoculation avec des mutants de la souche de Rhizobium RCR2011 125
1. 3. Comparaison entre inoculation à des plantes jeunes et des plantes âgées 127
2. Essais d'antagonisme *in vitro en utilisant les isolats de rhizobium et des champignons pathogènes* 127
2. 1. Antagonisme contre V31.2 sur milieu PDA 129
2. 2. Essais d'antagonisme contre d'autres espèces de champignons 131
a. Antagonisme contre la souche LPP0323 de *Verticillium. non-alfalfae* 131
b. Antagonisme contre la souche JR2 de *Verticillium dahliae* 131
c. Antagonisme contre Fusarium 131
D. Discussion 135
I. Constitution d'une collection d'isolats de rhizobium 136
II. Evaluation de la performance symbiotique des isolats de rhizobium 136
1. Infectivité 136
2. La nodulation et la fixation symbiotique d'azote sont fortement corrélées et dépendent du génotype de la plante et de la bactérie symbiotique 137
3. Fort effet du génotype et de l'isolat de rhizobium sur l'efficacité symbiotique 140
III. Efficacité des isolats de rhizobium pour la solubilisation du phosphate 142
1. Capacités des isolats de rhizobium à solubiliser le phosphate *in vitro* 142
2. Réponse des plantes de *Medicago truncatula* à la carence en phosphate soluble et effet de la présence de Rhizobia sur la croissance des plantes 144
IV. Antagonisme et protection des plantes 145
E. Conclusion et Perspectives 149
References bibliographiques 154
Annexes 170

Liste des figures

Figure 1. Un rameau de Medicago truncatula; fleur; gousse; graines. (Lahrech, 2011).....22
Figure 2. Phylogénie des légumineuses. 24
Figure 3. Répartition géographique du genre Medicago.....26
Figure 4. Processus majeurs du cycle de l'azote dans un écosystème forestier. 26
Figure 5. Comparaison des phylogénies moléculaires bactériennes et des légumineuses. 32
Figure 6. Structure du complexe enzymatique de la nitrogénase. 32
Figure 7. Voies de signalisation symbiotique et immunité des plantes impliquées dans la reconnaissance de la spécificité dans les interactions légumineuses-rhizobium (indiquées par les étoiles rouges) (Wang et al., 2018).....34
Figure 8. Diagramme de développement d'un nodule indéterminé. 36
Figure 9. Les mécanismes possibles impliqués dans l'amélioration de la croissance des plantes par les PSM. (Sharma et al., 2013). 38
Figure 10. Cycle simplifié du phosphore montrant la répartition du stock total de P du sol entre les différents pools de P. (Plassard et al., 2015). 42
Figure 11. Représentation schématique des mécanismes de solubilisation, minéralisation et immobilisation du phosphore dans le sol avec les PSM (Phosphate Solubilizing Microorganisms). (Sharma et al., 2013) 46
Figure 12. Cycle de la maladie de Verticillium sp. Le cycle d'infection est très similaire chez V. albo-atrum, V. longisporum et V. dahliae. (Berlanger and Powelson 2000).....52
Figure 13. Un modèle en zigzag illustrant la résistance quantitative du système immunitaire de la plante. PTI =PAMP-triggered immunity; ETS = effector-triggered susceptibility ; ETI = effector triggered immunity. (Jones and Dangl 2006). 56
Figure 14. Origine des rhizobiums collectés au centre la Tunisie : (A) Sidi Bouzid, (B) Sidi Ali Ben Aoun, (C) Bir El Haffey, (D) Bir Ouled Mnasser, (E) Thélepte, (F) Oued Miou.....60
Figure 15. Dégoussage, Scarification, repiquage et germination des graines de *M. truncatula*. 62
Figure 16. Purification des isolats de rhizobiums : 64
Figure 17. Etapes de l'essai de nodulation in vitro. 64
Figure 18. Représentation schématique de la méthode de strie utilisée pour les tests d'antagonisme. 72
Figure 19. Échelle de symptômes pour la notation de l'indice de l'avancement de la verticilliose chez Medicago truncatula. 72
Figure 20. Nodulation des accessions de Medicago truncatula (A17 ; F83005.5) inoculées avec les 36 isolats de Rhizobium tunisien. 80
Figure 21. Nodulation des accessions de *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4). .....**Erreur ! Signet non défini.**
Figure 22. Production de feuilles des accessions de Medicago truncatula (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4). 84

Figure 23. Production de biomasse aérienne de *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4). 86
Figure 24. Production de biomasse aérienne de *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4). 90
Figure 25. Nodulation des accessions de *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13). 92
Figure 26. Biomasse aérienne fraîche des accessions Medicago truncatula (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13). 94
Figure 27. Différence de croissance et de couleur des feuilles entre les plantes inoculées et non inoculées. 96
Figure 28. Biomasse sèche des accessions *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13). 98
Figure 29. Biomasse fraîche racinaire des accessions *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13). 98
Figure 30. Biomasse sèche racinaire des accessions *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13 ; O.Mn13).....102
Figure 31. Rapport poids sec aérien sur poids sec racinaire des accessions *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13 ; O.Mn13). 102
Figure 32. Teneur en azote (‰) des accessions de *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13). 104
Figure 33. Solubilisation du Phosphate *in vitro* par des isolats tunisiens de Rhizobium. L'indice de solubilisation a été déterminé après 7 et 15 jours d'incubation sur milieu avec $CaHPO_4$ comme source de phosphate insoluble. Seuls les 22 isolats qui solubilisent $CaHPO_4$ sont représentés. Les valeurs sont obtenues à partir de 3 expériences indépendantes avec 4 répétitions pour chacune d'entre elles. 108
Figure 34. Nodulation des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13). 110
Figure 35. Biomasse fraîche aérienne des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13). 112
Figure 36. Biomasse aérienne sèche des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13).....112

Figure 37. Biomasse racinaire fraîche des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13).....114
Figure 38. Biomasse racinaire sèche des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13).....114
Figure 39. Culture de plantes de M. truncatula dans l'armoire phytotron. (A):Disposition des pots dans l'armoire phytotron. (B): Aspect des plantes à la récolte.....116
Figure 40. Nodulation des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) en présence de deux formes différentes de phosphates.....116
Figure 41. Nombre de feuilles produites des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13) en présence de deux formes différentes de phosphates.....118
Figure 42. Biomasse aérienne des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13) en présence de deux formes différentes de phosphates. 119
Figure 43. Biomasse racinaire des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13) en présence de deux formes différentes de phosphates. 120
Figure 44. Evolution des symptômes de la maladie chez la lignée F83005.5 inoculée avec 35 isolats de rhizobium à 2 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 10 jours après le semis en culture sur Jiffy.....122
Figure 45. Evolution des symptômes de la maladie chez la lignée F83005.5 inoculée avec 35 isolats de rhizobium à 6 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 13 jours après le semis en culture sur Jiffy.....124
Figure 46. Evolution des symptômes de la maladie chez la lignée F83005.5 inoculée avec 44 mutant de RCR2011 à 6 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 13 jours après le semis en culture sur Jiffy.....124
Figure 47. Confrontation directe entre la souche JR2 de *V. dahliae* et des isolats de rhizobium. A : boîte témoin ; B : H2 vs JR2 (le mycélium s'arrête au contact du rhizobium) ; C : Aspect d'une souche non antagoniste (le mycélium dépasse le strie de la bactérie). 132
Figure 48. Confrontation directe avec Fusarium sp de Port la nouvelle.....132
Figure 49. Confrontation directe avec Fusarium spp.....133

Liste des tableaux

Tableau 1. Pertes économiques causées par la verticilliose.....50
Tableau 2. PAMPs et DAMPs identifiés et reconnaissance par les plantes (Postel et Kemmerling, 2009).....56
Tableau 3. Origine des accessions de Medicago truncatula utilisées et leurs sensibilités à Verticillium alfalfae V31.2.....60
Tableau 4. Sites d'échantillonnage et nombre d'isolats gardés pour chaque site.....64
Tableau 5. Composition du milieu M modifié.....66
Tableau 6. Origine des isolats de Rhizobium.....78
Tableau 7. Nombre de nodules sur des racines de M. truncatula cultivées in vitro et inoculées avec des isolats de Rhizobium de Tunisie.....81
Tableau 8. Production biomasse aérienne fraîche de 4 lignées de Medicago truncatula inoculées avec 12 isolats de Rhizobium de Tunisie cultivées en serre et au phytotron.....88
Tableau 9. Nombre de nodules sur des racines de M. truncatula inoculées avec des isolats de Rhizobium de Tunisie.....94
Tableau 10. Ratios de plantes inoculées/plantes témoins.....96
Tableau 11. Biomasse racinaire fraîche de 4 lignées de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium de Tunisie (O.Mn13, J13, B.oun2, II3.23/4).....100
Tableau 12. Biomasse racinaire sèche de 4 lignées de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium de Tunisie (O.Mn13, J13, B.oun2, II3.23/4).....100
Tableau 13. Teneur en azote de 4 lignées de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium de Tunisie (O.Mn13, J13, B.oun2, II3.23/4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison isolat/lignée (3 plantes par pot) dans chaque expérience. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en incluant les témoins. Les combinaisons lignée*isolat avec la même lettre sont dans le même groupe.....105
Tableau 14. Teneur en azote de 4 lignées de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium de Tunisie (O.Mn13, J13, B.oun2, II3.23/4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison isolat/lignée (3 plantes par pot) dans chaque expérience. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec les tests SNK, HSD et LSD en excluant les témoins et les plantes de la lignée F83005.5 inoculées avec B.oun2. Les isolats avec la même lettre sont dans le même groupe.....106
Tableau 15. Indice de solubilisation de phosphate *in vitro* par des isolats de Rhizobium tunisien à 7 jours d'incubation. Seuls les 22 isolats qui solubilisent $CaHPO_4$ sont représentés. Les valeurs ont été obtenues à partir de 3 expériences indépendantes avec 4 répétitions pour chacune d'entre elles. Les groupes de moyennes représentés par des lettres sont obtenus à partir du test Student-Newman-Keuls (SNK). Les isolats avec la même lettre sont dans le même groupe.....108
Tableau 16. Lien entre le site d'origine des Rhizobium et la solubilisation du Phosphate à 7 et à 15 jours d'incubation.....110

Tableau 17. Nombre de nodules moyen produit par deux accessions de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13) et traitées avec deux formes différentes de phosphate, l'une soluble et l'autre insoluble.....118
Tableau 18. AUDPC de *M. truncatula* inoculées avec 11 isolats de Rhizobium (H4, B1, II3.23/4, 10.23/R29, H3, O.M6, B.oun5, O.M2, B.oun2, O.M3, Mt13) en plus du contrôle positif. 126
Tableau 19. Pourcentages d'inhibition de la souche V31.2 à partir de culture solide de rhizobium. 128
Tableau 20. Pourcentages d'inhibition de la souche V31.2 à partir de culture liquide de Rhizobium. 130

Introduction générale

Grâce à leur capacité à établir des symbioses avec des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique au niveau de leurs racines (Rhizobia), les légumineuses revêtent une importance agronomique considérable. D'une part elles constituent une source importante de protéines pour l'alimentation humaine et animale sans avoir besoin d'engrais azotés, et d'autre part elles enrichissent le sol en azote assimilable par d'autres plantes. Malgré ces valeurs agronomiques et nutritionnelles les superficies de cultures de légumineuses sont en régression, due essentiellement aux maladies fongiques, virales, bactériennes et aux attaques par des parasites.

Depuis quelques années, *Medicago truncatula* a été établie comme la légumineuse modèle et de nombreux données et outils génomiques et moléculaires sont aujourd'hui disponibles.

Beaucoup d'études ont été réalisées avec cette espèce notamment sur des aspects de symbiose et de réponses aux agents pathogènes.

Le projet de cette thèse proposé au départ était d'identifier un moyen de biocontrôle afin de protéger les légumineuses contre les maladies racinaires, pour lesquels il n'existe pas de moyen de lutte efficace. Il repose sur le fait que dans certains cas les Rhizobiums ont été reportés de protéger contre une maladie.

Il fallait d'abord constituer une collection des souches de *Rhizobium* performantes pour *M. truncatula* et étudier leurs pouvoirs antagonistes à *Verticillum alfalfae* (*Va*), un champignon du sol cause le flétrissement et dessèchement des parties aériennes chez *Medicago truncatula*.

Des essais de confrontation de Rhizobium et *Va in vitro* mais aussi *in planta* en étudiant les cinétiques d'infection des plantes de *M. truncatula* par *Va* sous infestation artificielle, n'ont pas été concluants et cette piste de recherche a donc été abondonnée.

Il a ensuite décidé de donner à cette étude un aspect plus agronomique en la focalisant sur les effets des Rhizobium sur l'assimilation de l'azote et du phosphore, deux éléments essentiels apportés généralement par des engrais, et sur la production de biomasse végétale. Les spécificités des isolats et des effets de génotype de plante ont été considérés également. La collection des souches de Rhizobium a été inoculé à différents accessions de *Medicago truncatula* et différents paramètres de biomasse ont été étudiés, ainsi que les teneurs en azote et la solubilisation de phosphore minéral.

A. Introduction

I. Les Légumineuses

La famille des légumineuses, estimée à environ 20 000 espèces, se compose essentiellement de 3 sous familles, à savoir les *Mimosoideae*, les *Caesalpinioideae*, comprenant chacune approximativement 3000 espèces et les *Papilionoideae* qui comprend environ 14 000 espèces (Doyle, 2003) ce qui en fait la troisième plus large famille des plantes supérieures (Gepts, 2005). Les légumineuses, largement définies par leur structure florale inhabituelle, leurs fruits et leur capacité à former des nodules avec des Rhizobia, viennent en deuxième place parmi les plantes cultivées après les graminées (Graham et Vance, 2003).

1. Importance et rôle des légumineuses

L'importance des légumineuses découle principalement de leur pouvoir à établir une association symbiotique fixatrice de l'azote atmosphérique (N_2) -par association avec des bactéries rhizosphériques, appelées rhizobiums- au sein de structures racinaires appelées nodules ou nodosités (Graham et Vance, 2003). Ceci les rend indépendantes de source d'azote sous forme de nitrates ou d'ammoniaque présents dans le sol, ou apportés par des engrais. On estime la quantité de N_2 fixé par les légumineuses à intérêts agronomiques à environ 40 à 60 millions de tonnes métriques (Mt) chaque année, avec 3 à 5 millions de tonnes supplémentaires fixées par des légumineuses dans des écosystèmes naturels (Smil, 1999).

Au cours de la première phase de la croissance, les légumineuses doivent cependant s'appuyer principalement sur l'absorption de N du sol similaire aux espèces non légumineuses, avant de pouvoir initier la nodulation et de développer des nodules efficaces infectés par les Rhizobiums. En outre, les légumineuses à graines peuvent compter aussi sur la réserve d'azote de semences pendant un temps important, en raison des grandes graines avec une teneur en azote relativement élevée (Herdina, 1990).

1. 1. Alimentation humaine et animale

En agriculture, les légumineuses sont soit cultivées pour leurs graines riches en protéines (fève, fèverole, soja, pois sec, lentille, haricot…) qui sont utilisées en alimentation humaine et animale, soit pour leur appareil végétatif (luzerne, trèfles, sainfoin) utilisé comme ressource fourragère (Cavaillès, 2009), soit pour l'industrie agroalimentaire. Grace à leur richesse en protéines azotées, les légumineuses fournissent au moins 33% des besoins de l'humanité en protéines. Cette part est essentiellement fournie par le haricot, le petit pois, le pois chiche et la fève (Vance et al., 2000). Certaines de ces légumineuses,

principalement le soja et l'arachide, fournissent environ 35% de l'huile végétale transformée pour la consommation humaine et sont également des sources riches en protéines alimentaires pour les industries du poulet et du porc (sous forme de tourteau).

En industrie agroalimentaire, certaines légumineuses peuvent être transformées en farine, utilisée pour faire du pain, des beignets, chips, pâtes à tartiner etc., ou même utilisée sous forme liquide pour produire des laits, yaourts, et les préparations pour nourrissons (García et al., 1998). Les produits à base de soja sont souvent utilisés en tant que substitut à la viande dans des régimes végétariens, ou pour remplacer les produits laitiers en cas d'allergie contre le lactose.

Les légumineuses fourragères ont été la fondation pour les produits laitiers et la production de viande (Russelle, 2001). Même dans les élevages intensifs et la production laitière, où les cultures de céréales sont les sources d'alimentation principale, les légumineuses fourragères demeurent nécessaires pour maintenir la santé animale (Wattiaux et Howard, 2001).

1. 2. Importance dans les systèmes de culture, les écosystèmes naturels et l'agroforesterie

La culture des légumineuses est utilisée comme jachères, en interculture, ou en rotation de culture dans les systèmes céréaliers. L'utilisation des légumineuses en interculture, ou sur la jachère, répond aux objectifs généraux des plantes de couverture, rompt la monoculture, produit un fourrage directement pâturable par des petits ruminants, et cherche à valoriser la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique de la légumineuse pour en faire bénéficier la céréale suivante (Chalk, 1998).

Les résultats de plusieurs travaux ont montré que les rotations comportant des légumineuses améliorent la nutrition azotée et les rendements des cultures subséquentes en augmentant l'azote disponible dans le sol et le recouvrement de l'azote apporté par l'engrais. En 2002, Bado a montré qu'un précédent niébé ou arachide équivaut à une application de 25 Kg d'azote par hectare d'engrais minéral pour la culture succédant à la légumineuse.

D'autre part, l'azote constitue le principal nutriment limitant la croissance des plantes dans la plupart des écosystèmes naturels. Grâce à leurs capacités symbiotiques, les légumineuses peuvent jouer un rôle important dans la colonisation des écosystèmes perturbés. Les taux de fixation de N_2 dans de tels environnements sont souvent faibles, mais peuvent encore satisfaire une grande partie des besoins de la plante (Arianoutsou et Thanos, 1996).

Outre l'importance des légumineuses dans les systèmes de cultures et les écosystèmes naturels, les légumineuses ligneuses comme l'acacia jouent un rôle important en

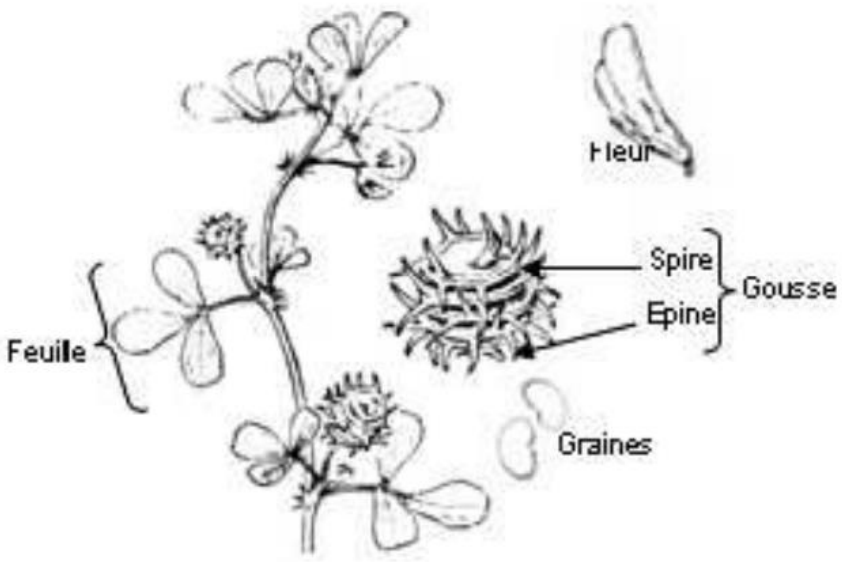


Figure 1. Un rameau de *Medicago truncatula*; fleur; gousse; graines. (Lahrech, 2011)

agroforesterie. Ainsi, la production de bois de feuillu représente la principale utilisation économique de ces légumineuses ligneuses, bien qu'elles puissent avoir d'autres rôles dans la fourniture d'abris et la conservation des terres (Sprent et Parsons, 2000).

1. 3. Intérêt industriel et médical

Plusieurs légumineuses ont été utilisées dans la médecine populaire. Les isoflavones du soja et autres légumineuses ont été suggérées à la fois pour limiter les risques du cancer et afin de réduire le taux de cholestérol sérique (Kennedy, 1995).

Les phytoestrogènes de soja ont été suggérées comme alternatives possibles à l'hormonothérapie substitutive pour les femmes ménopausées (Graham et Vance, 2003).

Industriellement, les légumineuses ont été utilisées pour préparer les plastiques biodégradables (Paetau et al., 1994), les huiles, les gommes, les colorants et les encres (Morris, 1997). Grâce à sa faible contribution au réchauffement climatique par rapport aux combustibles fossiles, le biodiesel à base de soja est un bon carburant alternatif qui a pris sa place dans plusieurs pays.

2. *Medicago truncatula* en tant que plante modèle

Le genre Medicago, légumineuse fourragère importante, et appartenant à l'ordre des Fabales, superfamille des légumineuses, famille des Fabaceae, sous-famille des Faboideae comporte 34 espèces annuelles et 22 espèces pérennes (Lesins et Lesins, 1979). *Medicago truncatula* communément appelé luzerne tronquée est l'une des espèces sauvages annuelles du pourtour méditerranéen. Elle présente une grande synthénie avec beaucoup de légumineuses cultivées tels que le pois et la luzerne pérenne (Zhu et al., 2005).

M. truncatula est une légumineuse annuelle herbacée et prolifique -vu que chaque plante peut produire jusqu'à 500 à 1000 graines- et ayant un cycle de vie relativement court qui varie entre 2 et 3 mois. La plante fait généralement entre 15 et 80 cm de hauteur. Ses feuilles sont trifoliées (**Figure 1**) et ses fleurs sont jaunes. L'autofécondation donne des gousses cylindriques dures contenant chacune 3 à 12 graines avec une durée de vie supérieures à 40 ans. Ces gousses sont formées de spires jointives serrées portant des épines recourbées perpendiculaires au plan des spires (Lesins et Lesins, 1979). Les pétales forment deux ailes libres.

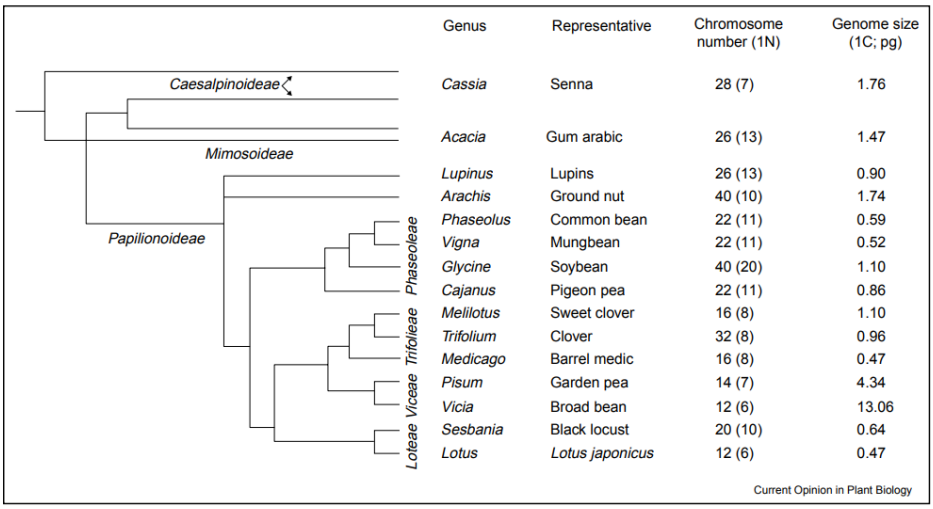


Figure 2. Phylogénie des légumineuses.

Les trois grandes sous-familles des légumineuses sont représentées (les Mimosoïdées, les Caesalpinoïdées et les Papilionoïdées), et des estimations du nombre de chromosomes et de la taille du génome sont mentionnées. (Young et al., 2003)

L'appareil reproducteur mâle est constitué des 10 étamines. La colonne staminale est formée de 9 étamines soudées et le dixième est libre. Le calice est formé par cinq sépales soudés (Lesins et Lesins, 1979).

2. 1. Intérêts agronomiques

Venant à l'origine du pourtour méditerranéen, *M. truncatula* est présente sur des sols lourds, marneux ou argileux et est adaptée aux conditions semi-arides (Lazrek ben Friha, 2008). L'intérêt agronomique pour la production fourragère et la diminution de l'épandage d'engrais azotés en zone sèche s'avère donc très important. Bien qu'elle soit annuelle, *M. truncatula* pourrait être assimilée à une espèce pérenne, grâce à sa capacité à se ressemer naturellement d'une année à l'autre, ce qui aboutit à la diminution du phénomène d'érosion des sols très présent dans le bassin méditerranéen.

La plupart des variétés commerciales de *M. truncatula* sont essentiellement cultivées en rotation avec des céréales.

2. 2. Caractéristiques et intérêts génétiques et génomiques

Pour des aspects multiples de la génétique et de la génomique, *M. truncatula* a été choisie comme plante modèle grâce à son petit génome d'environ 500 Mb -soit environ 4 fois celui d'Arabidopsis (Castilho et al., 2005)- réparti sur 8 chromosomes, sa diploïdie (2n = 16) et son caractère autogame avec un temps de génération court.

M. truncatula est aussi facilement transformée par *Agrobacterium rhizogenes* (Boisson-Dernier et al., 2001) et *A. tumefaciens* (Chabaud et al., 2003).

Aujourd'hui, de nombreuses ressources génétiques sont disponibles, comme des banques de BAC (Bacterial Artificial Chromosome), d'EST (expressed sequence tag), des banques de mutants, ainsi que des populations de lignées recombinantes et des cartes génétiques et physiques (http://www.medicagogenome.org/). A ce jour, le génome de *M. truncatula* est séquencé et la lignée A17 a été désignée comme lignée de référence (Young et al., 2011).

Contrairement à *Lotus japonicus* (l'autre plante modèle des légumineuses), *M. truncatula* appartient au groupe des Galégoïdes qui renfermant les Trifoliées (luzernes, trèfles), les Viciées (pois, féveroles, lentilles, vesces) et les Cicérées (pois chiche). Elle est donc plus proche phylogénétiquement (**Figure 2**) de ces légumineuses (Doyle, 1998).

Ce rapprochement phylogénétique a donc été associé à une synthénie entre *M. truncatula* et les légumineuses les plus cultivées (Zhu et al, 2005). Selon Schmidt (2000), la synthénie est

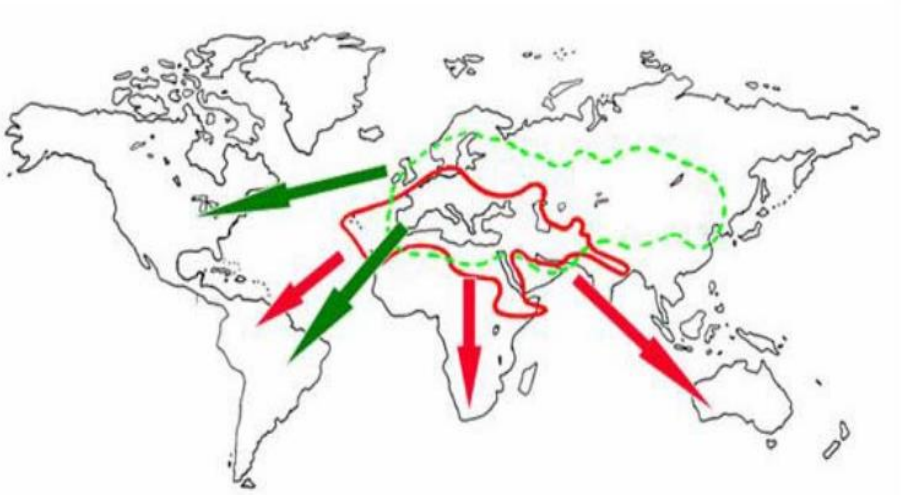


Figure 3. Répartition géographique du genre Medicago

Les régions encerclées correspondent aux régions d'origine de l'espèce pérenne *M. sativa* (en rouge) et l'espèce annuelle *M. truncatula* (en vert). Les flèches indiquent l'expansion vers de nouvelles régions. (Delalande et al., 2007).

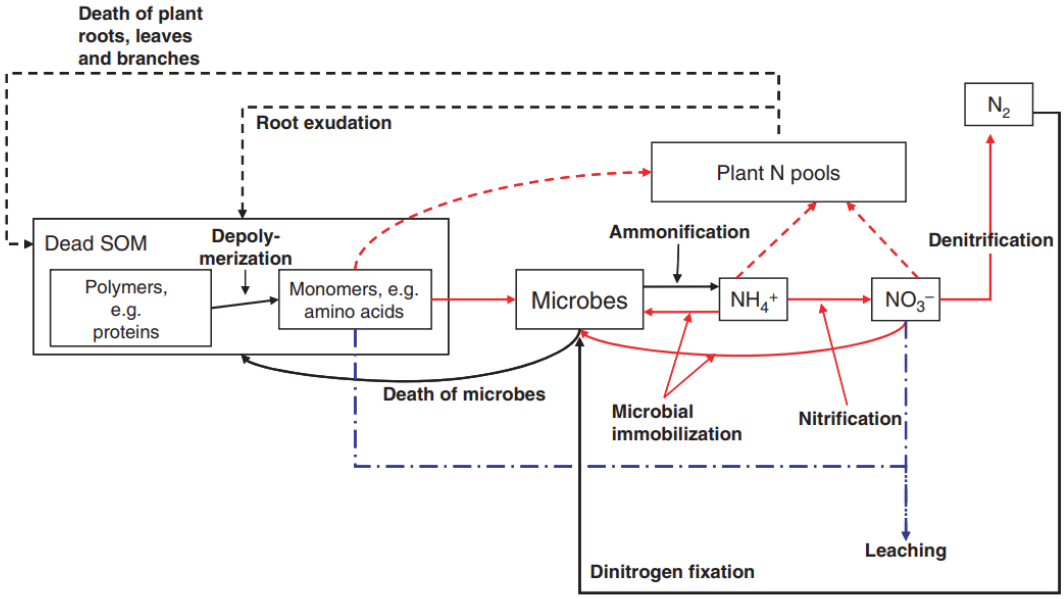


Figure 4. Processus majeurs du cycle de l'azote dans un écosystème forestier.

Lignes pointillées: processus impliquants les végétaux; lignes solides: processus impliquants les microorganismes; lignes rouges pleines et pointillées : processus compétitifs entre les plantes et les microorganismes. Lignes bleues: voies de transport hydrologiques. SOM: matière organique du sol. (Rennenberg et al., 2009)

une conservation de l'ordre des gènes (ou de marqueurs) entre espèces. Ainsi, grâce à cette conservation du génome qui pourrait indiquer une forte possibilité d'observer des résultats similaires entre *M. truncatula* et les autres légumineuses, plusieurs ressources ont été développées.

La présence de *M. truncatula* sur tout le pourtour méditerranéen (**Figure 3**) représente une source de biodiversité, à travers la présence de plusieurs variétés qui montrent des adaptations différentes aux facteurs climatiques et biotiques de leur milieu. Cette caractéristique est donc importante pour l'étude de la génétique et de la génomique.

II. La symbiose fixatrice d'azote

L'importance des légumineuses est largement attribuée à leur capacité à établir au niveau de leurs racines une symbiose fixatrice de l'azote atmosphérique (N_2) avec les rhizobiums. Ces bactéries sont hébergées dans des structures appelées nodules ou nodosités dans lesquelles elles trouvent les conditions idéales pour réaliser les réactions de réduction d'azote.

1. Cycle de l'azote

L'azote représente 78% de l'atmosphère terrestre, ce fait de lui l'élément le plus abondant. Malgrés son abondance, il s'y trouve que sous sa forme moléculaire normale diatomique N_2, un gaz relativement inerte et donc peu réactif.

Chez les organismes vivants, il est essentiel à la synthèse des acides nucléiques et des protéines, les deux polymères les plus importants de la vie. Or, la plupart ne peuvent pas l'utiliser sous sa forme N_2. L'azote fixée inorganique, souvent sous forme d'ammoniac NH_3 ou d'ions nitrates NO_3^-, est la seule forme qu'ils peuvent utiliser. Par conséquent, l'azote represente donc un élément très limitant pour la productivité primaire dans les écosystèmes terretres et marrins.

La biogéochimie de l'azote dépend presque entièrement des réactions de réduction-oxydation principalement médiées par les micro-organismes et, dans une moindre mesure, du recyclage à long terme dans la géosphère (Canfield et al., 2010). Le cycle de l'azote dans la **Figure 4** décrit les processus biochimiques ou chimiques impliqués.

En raison du grand nombre de transformations de l'azote dans l'environnement et de la difficulté pour les êtres vivants à l'incorporer, ce cycle est très complexe. Il se compose principalement de trois processus de base :

(i) La fixation de l'azote moléculaire N_2 : correspond à la conversion de l'azote atmosphérique en azote utilisable par les plantes et les animaux.

Une très faible fraction de l'azote atmosphérique N_2 est rendue assimilable par voie physico-chimique principalement par l'effet des éclairs et de la lumière ultraviolette. L'azote ainsi transformé en acide nitrique HNO_3 atteint le sol par les précipitations ou sous forme de particules sèches sur lesquelles il a été adsorbé dans l'atmosphère (Prather et al., 2001).

Le processus majoritaire est la fixation biologique du diazote. Les rhizobiums sont les plus puissants fixateurs pouvant fixer jusqu'à 200 kg N/ha/an (Smil, 1999). 20 % de l'azote ainsi fixé dans les nodules est transféré à la plante, qui fournit en échange des glucides aux bactéries, et 80 % est émis dans le sol après la mort et la décomposition des nodules.

La réaction chimique type est:

$$2N_2 + 3(CH_2O) + 3H_2O \longrightarrow 4NH_4^+ + 3CO_2$$

A son tour, l'ammonium (NH_4^+) se transforme en ammoniac (NH_3) gazeux, dans les sols où le pH est élevé, selon la réaction suivante :

$$NH_4^+ + OH^- \longrightarrow NH_3 + H_2O$$

(ii) La nitrification : correspond à la transformation des produits de la fixation (NH_3 et NH_4^+) par l'action des bactéries (Costa et al., 2006) nitrosantes (Nitrosomonas, Nitrosococcus) en nitrites (NO_2^-) selon la réaction suivante :

$$2NH_4^+ + 3O_2 \longrightarrow 2NO_2^- + 2H_2O + 4H^+$$

A leurs tours, les nitrites sont transformés en nitrates (NO_3^-) par l'action de bactéries nitrifiants (Nitrobacter, Nitrococcus) selon la réaction suivante :

$$2NO_2^- + O_2 \longrightarrow 2NO_3^-$$

(iii) La dénitrification : il s'agit d'une réaction de réduction des nitrates (NO_3^-), par l'intermédiaire de bactéries anaérobies (Pseudomonas) qui transforme la matière organique, en une forme gazeuse N_2 qui retourne dans l'atmosphère et ainsi le cycle recommance. La réaction de dénitrification est la suivante :

$$4NO_3^- + 5(CH_2O) + 4H_4^+ \longrightarrow 2N_2 + 5CO_2 + 7H_2O$$

Malgré l'abondance de l'azote dans l'atmosphère et son cycle qui permet son recyclage, l'azote reste un élément très limitant pour la croissance des plantes. Des pertes peuvent avoir lieu.

Ces pertes se produisent principalement sous la forme ammoniacale gazeuse NH_3. Les pertes du NH_3 dans les écosystèmes naturels sont presque nulles, alors qu'elles sont très importantes dans les sols agricoles à cause de l'apport de fortes quantités d'azote ammoniacal, sous forme de fumiers et de fertilisants (Oenema et al., 2009). Dans les sols riches en nitrates et en carbone et en conditions anaérobies, la dénitrification se produit avec une perte atteignant 20% du contenu en azote (Barton et al., 1999). La lixiviation participe à son tour aux pertes d'azote. De part leur charge négative, qui ne leurs permet pas d'être retenus par les colloïdes du sol chargés négativement, les nitrates peuvent être entrainés en profondeur lors de l'écoulement des eaux de pluie (Dise et al., 2009).

Le cycle de l'azote est alors déterminé par le type d'écosystème, son utilisation, les conditions pédoclimatiques mais surtout par la quantité d'azote apportée par la fixtion biologique.

2. Interaction Rhizobium-légumineuses

La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et la plante hôte. La plante émet des molécules essentielles à la réalisation de chaque étape du processus de nodulation et de fixation. Les flavonoïdes constituent les premiers signaux de l'hôte qui déclenchent chez la bactérie l'expression des gènes de régulation de la nodulation (Peters et Verma, 1990).

Ces flavonoïdes et / ou les isoflavonoïdes libérés de la racine de l'hôte des légumineuses induisent la transcription de gènes de nodulation dans des rhizobiums compatibles, conduisant à la formation de molécules de lipochitooligosaccharides qui, à leur tour, signalent

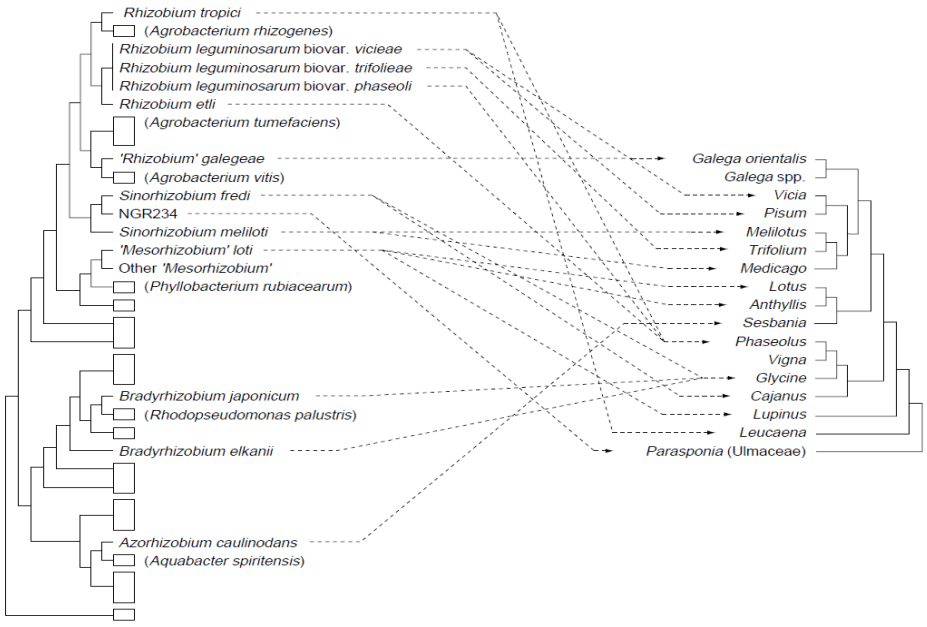


Figure 5. Comparaison des phylogénies moléculaires bactériennes et des légumineuses.

La phylogénie bactérienne (à gauche) est basée sur les séquences génétiques de l'ARNr 16S et montre trois groupes très distincts de bactéries impliquées dans la symbiose fixatrice d'azote avec les légumineuses et le Parasponia (Ulmaceae). Des bactéries symbiotiques représentatives sont représentées; les lignées des bactéries non symbiotiques sont indiquées par des cases, avec un représentant indiqué entre parenthèses pour les lignées étroitement liées aux groupes symbiotiques. À droite, les relations phylogénétiques sont présentées pour certains genres de légumineuses (réduits de l'arbre de la figure 2) nodulés par des bactéries présentes sur l'arbre bactérien. Les flèches relient les symbiotes bactériens à leurs hôtes. (Doyle, 1998).

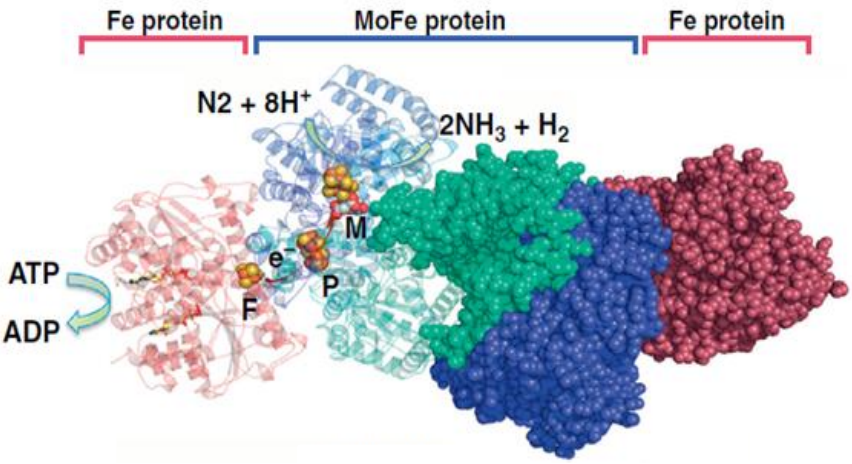


Figure 6. Structure du complexe enzymatique de la nitrogénase.

La figure montre les composants de la protéine MoFe et Fe, avec les trois métalloclusters (F pour [4Fe4S], P pour le cluster P et M pour FeMo- co). (Oldroyd et Dixon, 2014).

à la plante hôte de commencer la formation de nodules. Ainsi, une centaine de gènes de la légumineuse et du rhizobium sont impliqués (Graham et Vance, 2003).

Pendant le processus de reconnaissance entre la légumineuse et le rhizobium, plusieurs facteurs biotiques et abiotiques peuvent altérer le processus d'infection et donc l'association symbiotique, mais aussi le processus de fixation d'azote.

En effet, l'association symbiotique est généralement très spécifique. Chaque espèce bactérienne possède un spectre d'hôte bien défini, souvent limité (**Figure 5**). Par exemple, *Sinorhizobium meliloti* peut s'associer efficacement avec les plantes des genres *Medicago, Melilotus et Trigonella*. Dans certains cas, la spécificité symbiotique peut conduire à la formation de nodules infectés mais incapable de fixer l'azote atmosphérique. C'est ce qu'on appelle l'efficience symbiotique. L'efficience symbiotique est donc l'aptitude et la capacité d'une souche particulière à produire un nodule actif, donc fixateur d'azote.

A partir du moment où les nodules sont mis en place et efficientes, la fixation d'azote commence. Cette fixation biologique de l'azote est catalysée par une enzyme « la nitrogénase ». L'enzyme nitrogénase catalyse la rupture réductrice de la triple liaison de N_2 pour générer l'ammoniac NH_3 accompagnée d'une réduction des protons en H_2 et se fait selon la réaction suivante :

$$N_2 + 8H^+ + 8e- + 16\ ATP \xrightarrow{\text{Nitrogénase}} 2NH_3 + H_2 + 16\ ADP + 16\ Pi$$

La nitrogénase (**Figure 6**) se compose de deux principaux composants protéiques (Rubio et Ludden, 2005), la dinitrogenase (protéine MoFe ou composant I) et la dinitrogenase réductase (protéine Fe ou composant II).

Quand elles sont exposées à l'oxygène, les proteines de la nitrogénase sont dénaturées et ne peuvent fonctionner que dans un environnement anaérobie (Dighe et al., 2010). Cette sensibilité à l'oxygène représente l'une des propriétés les plus frappantes de la nitrogénase. La couleur rouge des nodules indique la présence de leghémoglobine, une protéine présente dans les nodules, qui sert de régulateur d'oxygène en le transportant vers les bactéroïdes. La régulation de l'apport d'O_2 protège la nitrogénase bactérienne de l'effet inhibiteur de l'oxygène. Cette régulation garantit donc l'efficacité du nodule à fixer l'azote atmosphérique.

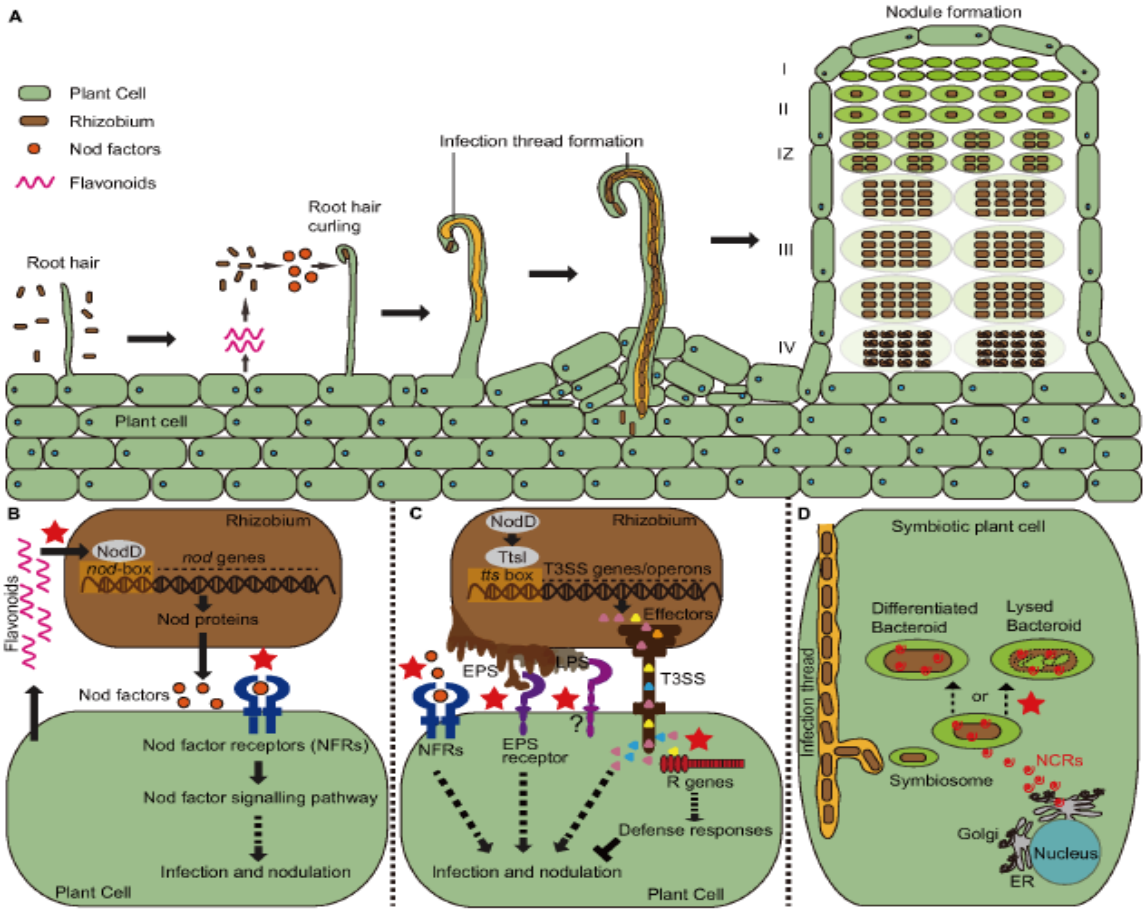


Figure 7. Voies de signalisation symbiotique et immunité des plantes impliquées dans la reconnaissance de la spécificité dans les interactions légumineuses-rhizobium (indiquées par les étoiles rouges) (Wang et al., 2018).

D’autres facteurs comme la température, le pH et l’humidité du sol agissent sur le fonctionnement de la nitrogénase (Dighe et al., 2010).

3. Les Rhizobium

Le terme Rhizobium vient du grec Rhiza=racine et bios=vie et provient de la première appellation au XIXème siècle du premier genre bactérien vivant dans le sol et pouvant noduler les légumineuses.

Les rhizobiums sont des bactéries de la famille des Rhizobiacées, ils sont Gram négatifs, non sporulant, et ils apparaissent en forme de bâtonnets et sont mobiles. Ce sont des microorganismes aérobies de petite taille dont la température de croissance optimale est de 28°C et le pH optimal est de 6 à 7.

Les rhizobiums comprennent plus de 100 espèces, dont 11 genres appartenant à la sous classe d’alphaprotéobactéries (Rhizobium, Mesorhizobium, Sinorhizobium ou Ensifer, Bradyrhizobium, Microvirga, Azorhizobium, Ochrobactrum, Methylobaterium, Phyllobacterium, Devosia, Shinella) et 2 genres appartenant à la sous classe des betaprotéobactéries qui sont Burkholderia et Cupriavidus (Weir, 2016). Des études récentes ont signalé la présence d’autres sous classes dont γ-proteobactéries et Actinobactéries (De Meyer et al., 2011).

4. Nodulation et fixation symbiotique d’azote

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique. Les nodules formés sont le résultat d'un dialogue moléculaire entre le rhizobium et la plante hôte. Selon Remigi et al. (2016), les gènes essentiels à la nodulation, à l'infection et à la fixation de l'azote sont regroupés chez les rhizobiums, dans des modules de symbiose. Ces modules contiennent des gènes impliqués dans la synthèse et l'exportation du signal du facteur Nod oligosaccharidique (nod/nol/noe), et dans la synthèse et l'assemblage du complexe nitrogénase (nif/fix/fdx). Les gènes conservés sont nodABCDIJ et nifABHDKENT. Plusieurs études comme (Wang et al., 2012) pensent que les facteurs Nod sont le principal déterminant de la spécificité de l'hôte. La **Figure 7** montre les voies de signalisation et les étapes de la nodulation.

La première étape du processus de nodulation consiste en un échange de signaux qui permet le démarrage de l’étape de l’infection. Durant cette étape, les bactéries commencent par s’approcher des racines grâce au chimiotactisme activé par la sécrétion de flavonoïdes par les

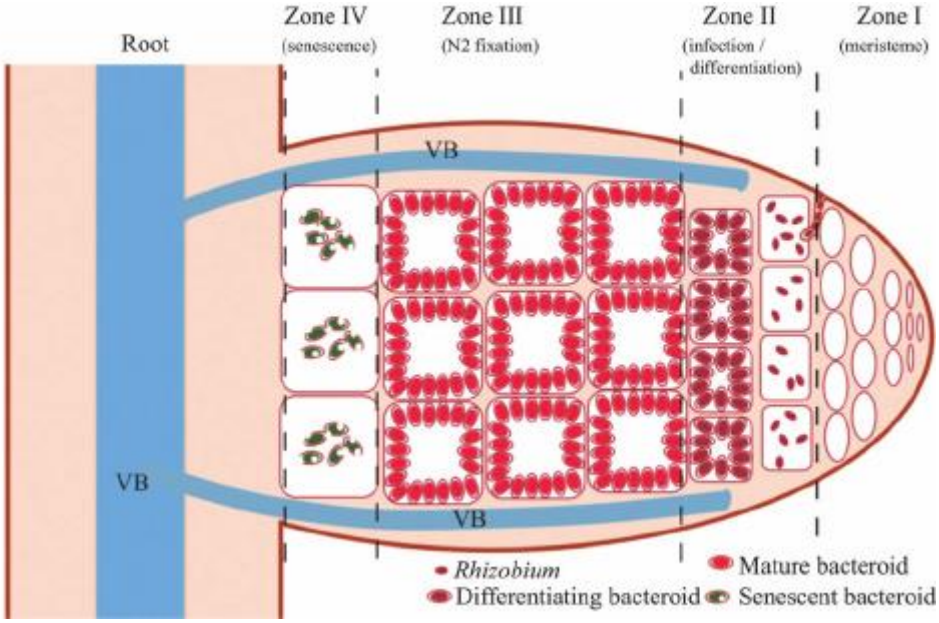


Figure 8. Diagramme de développement d'un nodule indéterminé.

Le nodule se développe par des divisions cellulaires méristématiques dans la zone I. Dans la zone II, les rhizobiums sont libérés par le fil infectieux dans les cellules corticales, ils se différencient en bactéroïdes qui, dans la zone III, synthétisent la nitrogénase et d'autres enzymes impliquées dans la fixation de l'azote. Après quelques semaines, le nodule commence à devenir sénescent et les bactéroïdes sont dégradés (zone IV). VB indique un ensemble vasculaire. (Rodriguez-Haas et al., 2013).

racines de la plante hôte, induisant l'expression des gènes *nod* chez la bactérie. Ces gènes *nod* contrôlent les différentes étapes de l'établissement de la symbiose à travers les facteurs Nod (NFs). Une fois ces NFs émis et reconnus par les récepteurs des facteurs Nods (NFRs), ils induisent chez la plante, différentes modifications (morphologiques, physiologiques et moléculaires) poursuivis par l'induction de gènes spécifiques, la pénétration de la bactérie dans la plante. C'est la deuxième étape du processus de nodulation. Pendant cette étape, le poil se transforme en crosse de berger qui renferme les rhizobiums.

Une croissance apicale inverse se met en place, formant une structure tubulaire appelée le cordon d'infection, dans lequel les bactéries prolifèrent. Parallèlement à la progression de l'infection, l'organogenèse nodulaire se met en place. Les cellules végétales du cortex et du péricycle entrent en division et forment un primordium nodulaire, où les bactéries se libèrent et se différencient en bactéroïdes. Les bactéroïdes se concentrent dans la production des nitrogénases indispensables à la fixation de l'azote atmosphérique en réduisant l'azote atmosphérique (N_2) en ammonium (NH_4^+). La période de fixation de l'azote atmosphérique est optimale entre 4 et 5 semaines après l'infection. Au-delà de cette période, les premières réductions de la capacité bactérienne fixatrice du N_2 sont détectables et un processus de sénescence se produit dans la zone des nodules fixant l'azote. La sénéscence des nodules concorde avec le début du remplissage des gousses dans les légumineuses à grains (Dupont et al., 2012).

Il existe deux types majeurs de nodosités déterminés par la plante hôte. Les nodules déterminés se développent à partir des cellules du cortex externe et sont de forme sphérique (Gage, 2004). Ce type de nodosité existe seulement chez les légumineuses des zones tropicales telles que le soja et le haricot (Hirsch, 1992). Alors que les nodules indéterminés se développent à partir des cellules du cortex interne et sont allongés (Crespi et Gálvez, 2000). Ces nodosités sont connues chez les légumineuses des zones tempérées comme le sulla, le pois, et la luzerne (Hirsch, 1992).

Dans le nodule indéterminé, un gradient de différenciation est établit (**Figure 8**) et définit quatre zones (Rodriguez-Haas et al., 2013) : la zone méristématique (Zone I), la zone d'infection ou de différenciation (Zone II), la zone de fixation d'azote (Zone III) et la zone de senescence (Zone IV).

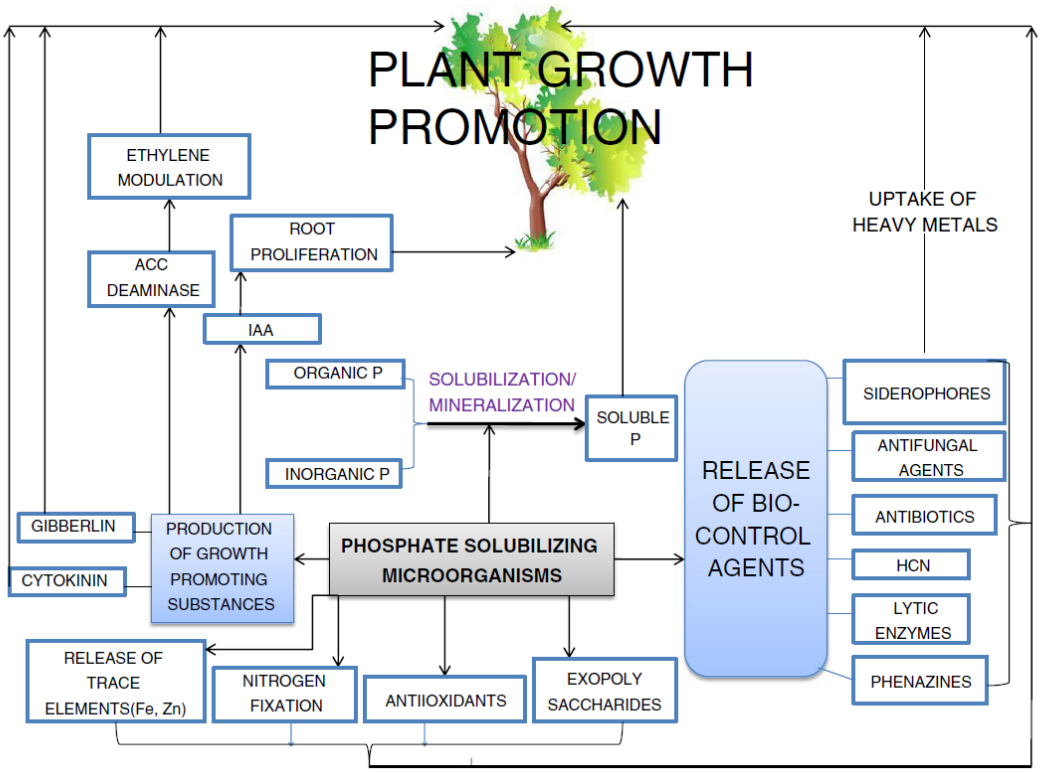


Figure 9. Les mécanismes possibles impliqués dans l'amélioration de la croissance des plantes par les PSM. (Sharma et al., 2013).

III. Autres associations bénéfiques avec des rhizobactéries

Les rhizobactéries sont des bactéries qui présentent l'aptitude à coloniser les racines de façon intense. Parmi les rhizobactéries, on distingue les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) qui possèdent des effets bénéfiques liés principalement à leur position stratégique à l'interface sol/racine.

1. Bénéfices par action directe sur les plantes

Grâce à des mécanismes directs et indirects, les rhizobactéries ont la capacité d'améliorer la croissance des plantes. Ceci est principalement dû à des rhizobactéries appelées PGPR. Le mode d'action des différents types de PGPR est influencé par des facteurs biotiques (génotype de la plante hôte, stades végétatifs, mécanismes de défense des plantes…) et abiotiques (composition du sol, conditions climatiques…).

La stimulation directe de la croissance et du développement par les PGPR consiste essentiellement à faciliter l'absorption des nutriments par la plante en les rendant plus disponible à la plante. Ceci se fait généralement à travers la fixation symbiotique d'azote atmosphérique, la solubilisation de phosphate insoluble, la séquestration du fer par les siderophores bactériens et l'induction de la production de phytohormones telles que l'acide iadole acétique et les acides gibbérreliques. Les PSM (Phosphate Solubilizing Microorganisms) font partie des PGPR et participent à l'amélioration de la croissance chez les plantes par différents mécanismes (**Figure 9**).

Jha et Saraf (2015) citent la production d'enzymes hydrolytiques (chitinases, cellulases, protéases…), la production d'antibiotiques contre les pathogènes des plantes, l'induction de la résistance systémique induite (ISR), la compétition avec les agents pathogènes pour les éléments nutritifs, le parasitisme, la production de métabolites suppressives de rhizobactéries délétères (comme la cyanure d'hydrogène et les siderophores), les COV (Composés Organiques Volatiles), les EPS (Exopolysaccharides) etc comme les principaux mécanismes qu'utilisent les PGPR pour favoriser indirectement la croissance et le développement des plantes.

2. Rôle du phosphore dans la plante

Le phosphore (P), élément clé dans la nutrition des plantes, est le deuxième macronutriment le plus important après l'azote. Il affecte profondément leur croissance et développement

ainsi que les rendements des cultures. Il joue un rôle essentiel dans les principaux processus métaboliques et il est essentiel pour toutes les cellules vivantes du fait qu'il représente un composant principal de l'ADN, de l'ARN, de l'ATP et des phospholipides. Le P est aussi impliqué dans pratiquement tous les processus métaboliques comme la photosynthèse, le transfert et le stockage de l'énergie, la transmission de l'information génétique, la respiration, la division cellulaire, mais aussi la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses.

2. 1. Problématique du phosphore

Contrairement à l'azote, le phosphore est un élément non renouvelable. En comparaison avec d'autres nutriments, la concentration de P dans la solution du sol est beaucoup plus faible et se situe entre 0,001 mg/l dans les sols très pauvres et 1 mg/l dans les sols fortement fertilisés (Antoun, 2012). Cependant, en raison de la faible solubilité et de la fixation dans les sols, seule une petite fraction du phosphore dans la solution du sol (1 ppm ou 0,1%) est facilement disponible pour les plantes (Charana Walpola and Yoon, 2012). Or le P appliqué en fertilisant ne résout pas le problème vu qu'il est rapidement fixé dans le sol. On estime que seulement 10 à 20% des engrais chimiques phosphatés sont utilisés par les plantes l'année d'application (Richardson, 2001). C'est souvent donc le nutriment le moins accessible pour les plantes, car il se trouve souvent en trois catégories inaccessibles pour les plantes : composés inorganiques, composés organiques de l'humus du sol et composés P organiques et inorganiques associés aux cellules du vivant (Khan et al, 2014). Or, les anions orthophosphates (principalement $H_2PO_4^-$ et HPO_4^{2-}) sont la seule forme de P directement absorbée par les plantes. Cependant, leur concentration est très faible car ils sont très actifs chimiquement et réagissent rapidement avec des cations, comme le Ca dans les sols alcalins, ou l'Al et le Fe dans les sols acides, pour former des précipités non disponibles pour les plantes. Les réactions résultantes de la précipitation du P soluble de la solution du sol sont généralement appelées fixation ou rétention (Antoun, 2012). L'apport de fertilisants P en agriculture moderne s'avère donc nécessaire pour les agriculteurs bien qu'il soit souvent appliqué en quantités excessives afin de limiter ou d'éviter les carences potentielles, et donc la perte de rendements des cultures. Le premier inconvénient qui découle de cette pratique est le danger que cela représente pour l'environnement, notamment sur la santé des sols qui peuvent arriver jusqu'à la perte de fertilité, la dégradation des ressources terrestres comme la biodiversité microbienne, mais surtout la dégradation des ressources des eaux de surface, à cause de la prolifération d'algues et ainsi de l'eutrophisation (Sarabia et al., 2017).

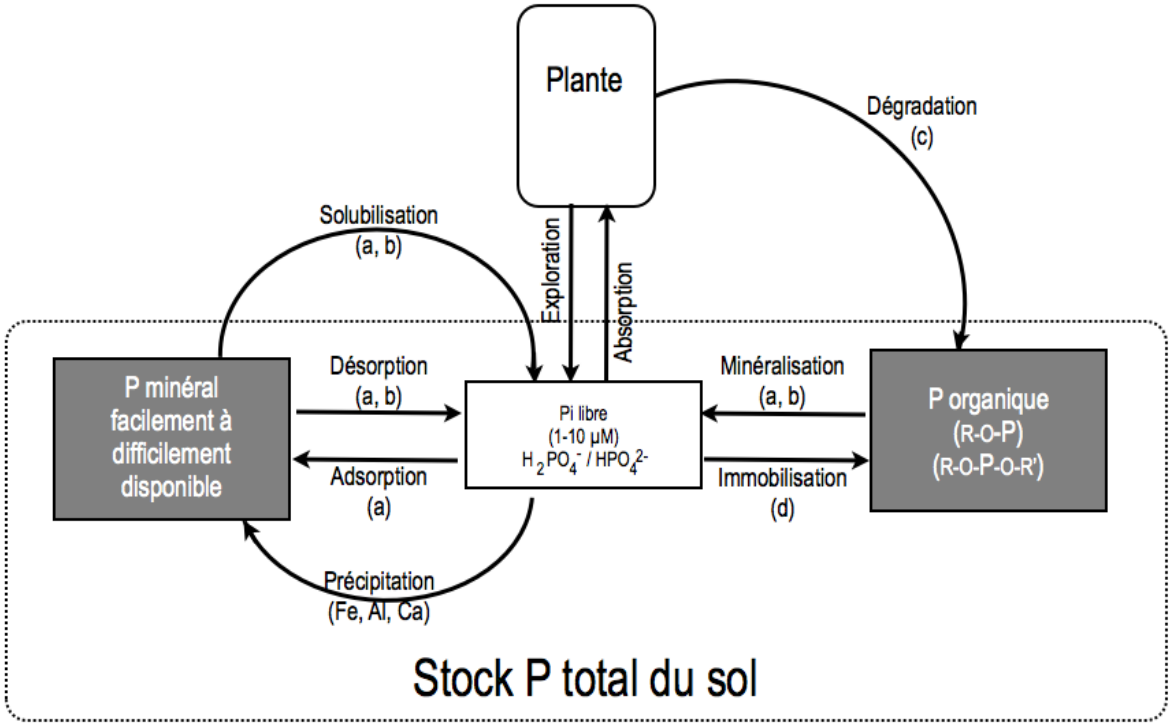


Figure 10. Cycle simplifié du phosphore montrant la répartition du stock total de P du sol entre les différents pools de P. (Plassard et al., 2015).

La dépendance de l'agriculture aux engrais phosphatés dérivés de roches et le caractère non renouvelable de la roche phosphatée fait que cette ressource est en perpétuel déclin. L'institut d'études géologiques des États-Unis (USGS) estime que les ressources terrestres de P seront complètement épuisées dans 50 à 100 ans. D'après Taktek et al. (2015), 80% de ces ressources sont sous le contrôle de trois pays qui : la Chine, les Etats-Unis et le Maroc. L'exploitation minière produit un phosphate brut qui a été reconnu comme une alternative valable pour l'agriculture durable (Vassilev et al., 2001). Mais malheureusement, les résultats ne sont pas satisfaisants car, généralement, les rendements obtenus avec cette forme d'engrais sont inférieurs à ceux produits avec des engrais phosphatés solubles (Khasawneh et Doll, 1979).

2. 2. Cycle du phosphore

En raison de ces problématiques concernant le phosphore, il est donc nécessaire de comprendre son cycle (**Figure 10**). Ainsi, Sims et Pierzynski (2005) ont identifié les principaux processus du cycle P du sol qui sont : la dissolution-précipitation (équilibres minéraux), la sorption-désorption (interactions entre P en solution et les surfaces solides du sol) et la minéralisation-immobilisation (conversions biologiquement induites de P entre les formes inorganiques et organiques). Dans le sol, le P inorganique est généralement associé à d'autres composés comme le Ca, Fe et Al dont chacun a des caractéristiques de solubilité unique qui détermine la disponibilité des phosphates pour la plante. L'adhésion physique des ions phosphates sur les surfaces d'autres molécules, appelé aussi adsorption, est un processus important qui limite la mobilité et la biodisponibilité des phosphates dans les sols. Le troisième facteur important dans le cycle du P est la flore microbienne du sol qui transforme le P organique et minéral dans un sens ou dans un autre. Ainsi, la mobilisation du phosphore dans le sol se fait selon différents procédés. On distingue alors :

a. La désagrégation : c'est une altération de la roche phosphatée qui se produit suite à des processus écologiques. On distingue donc la désagrégation physique qui induit une altération de la roche sans modifier sa composition chimique. Et la désagrégation chimique par divers produits chimiques qui induit la dissolution, l'hydrolyse, l'hydratation ou encore l'oxydoréduction (Taktek et al., 2015).
b. La solubilisation : c'est un processus au cours duquel des microorganismes participent à la conversion du P insoluble en P soluble à travers la production d'acides organiques et le relâchement de protons qui chélatent les cations fixés aux phosphates insolubles pour le convertir en formes solubles (Mackey et Paytan, 2009).

c. La minéralisation : c'est un processus au cours duquel les complexes de P organiques sont convertis en minéraux phosphatés grâce à l'activité de certaines enzymes microbiennes, communément appelées les phosphatases (Taktek et al., 2015).
d. L'immobilisation : c'est le processus inverse des trois précédents rendant le P labile indisponible soit transitoirement en le séquestrant dans les cellules vivantes, soit par phosphogénèse en formant des minéraux phosphatés.

La plante ne peut utiliser que le pool de phosphate inorganique (Pi) libre dans la solution du sol à partir duquel elle absorbe les ions orthophosphates ($H_2PO_4^-$ /HPO_4^{2-}). Une meilleure exploration du sol permet d'augmenter l'accès au pool de Pi libre. Le pool de Pi libre est alimenté par le pool de P minéral plus ou moins facilement disponible via les phénomènes de désorption et/ou de solubilisation. Il peut aussi être alimenté par la minéralisation du P complexé au carbone via des liaisons monoester (R-O-P) ou diester (R-O-P-O-R') constituant le P organique du sol. Dans un sol, le pool de Pi libre représente une infime fraction du P total du sol. Les différentes fonctions sont influencées par a) les variations de pH ; b) la production d'anions organiques ; c) la production de phosphatases ou de phytases, d) l'immobilisation de P dans la fraction microbienne du sol.

2. 3. Mécanismes de solubilisation de phosphates chez les rhizobactéries

Plusieurs espèces microbiennes ont été rapportées comme étant des microorganismes ayant une capacité de solubilisation de P. Ces microorganismes sont appelés des PSM (Phosphate Solubilizing Microorganismes) et comprennent des mycorhizes, bactéries, des champignons des actinomycètes, et des algues. Les PSB (Phosphate Sulubilizing Bacteria) comprennent plusieurs genres tels que les Pseudomonas, les Bacillus, des azotobacter, xanthomonas, enterobacter, pantoea, klebsiella ainsi que quelques rhizobium (Kumar et al., 2013 ; Zaidi et al., 2009).

Les microorganismes PSM, y compris les rhizobactéries, jouent un rôle important dans les trois composantes majeures du cycle P du sol (à savoir la dissolution-précipitation, la désorption par sorption et la minéralisation-immobilisation). Les principaux mécanismes de solubilisation de P employés par ces microorganismes comprennent: (1) la libération de composés de complexation ou de dissolution minérale, (par ex. anions d'acides organiques, siderophores, protons, ions hydroxyles, CO_2), (2) libération d'enzymes extracellulaires

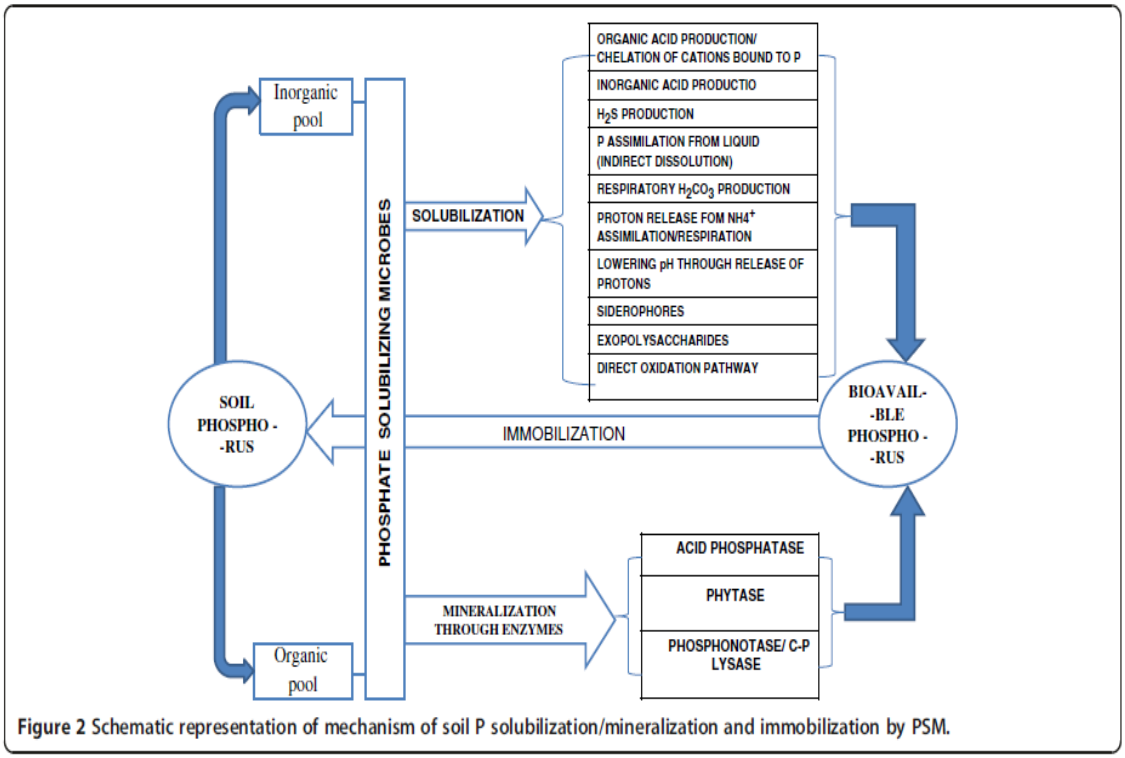


Figure 2 Schematic representation of mechanism of soil P solubilization/mineralization and immobilization by PSM.

Figure 11. Représentation schématique des mécanismes de solubilisation, minéralisation et immobilisation du phosphore dans le sol avec les PSM (Phosphate Solubilizing Microorganisms). (Sharma et al., 2013)

(minéralisation P biochimique) et (3) libération de P pendant la dégradation du substrat (minéralisation biologique P) (McGill et Cole, 1981).

Cependant, les mécanismes utilisés par les microorganismes pour solubiliser le phosphate insoluble dépendent de sa forme initiale (**Figure 11**). Ainsi, la solubilisation du P inorganique se produit principalement par production d'acide organique, soit en abaissant le pH, soit en améliorant la chélation des cations liés à P, soit en rivalisant avec P pour les sites d'adsorption sur le sol, soit en formant des complexes solubles avec des ions métalliques (Ca, Al, Fe) associés à P insoluble. L'hypothèse de la formation d'acides inorganiques comme l'acide sulfurique qui réagiraient avec le phosphate ferrique pour donner du sulfate ferreux et libèreraient donc le phosphate a été proposée (Kim et al, 1998). D'autres mécanismes ont été proposés comme la libération de protons H^+, ou encore l'oxydation extracellulaire par voie d'oxydation directe. La solubilisation du P organique est aussi appelée minéralisation. Le P sous forme organique peut donc être minéralisé par des enzymes secrétées par les microorganismes. Elles sont classées en trois catégories :

(a) les NASPs (Non-specific acid phosphatases). Les plus abondantes sont les phosphomonoestérases qui sont capables de déphosphoryler les liaisons phosphoester et les liaisons phosphoanhydride de la matière organique (Nannipieri et al., 2011).

(b) les phytases provoquent spécifiquement la libération de P à partir des phytates (Richardson et Simpson, 2011).

(c) les phosphonatases et les C-P lyases, qui clivent la liaison C-P des organophosphonates (Rodríguez et al., 2006).

IV. Les maladies fongiques chez les légumineuses

Occupant la quasi-totalité de la surface émergée sur terre, et grâce à la photosynthèse, les plantes ont la capacité de produire de la matière organique à partir de matière inorganique et représentent ainsi une source principale de carbone sur terre. Certains organismes comme les nématodes et surtout micro-organismes comme les bactéries, les champignons et les virus profitent alors de cet environnement favorable à leurs développements. L'interaction entre la plante et l'autre organisme vivant peut-être bénéfique pour les deux. C'est le cas du mutualisme entre les légumineuses et les rhizobiums. Mais cette interaction peut aussi être néfaste quand il s'agit d'un organisme ou d'un microorganisme pathogène. Ces organismes pathogènes peuvent acquérir des nutriments au détriment de la plante hôte ou causer plusieurs maladies pouvant provoquer d'énormes dégâts allant jusqu'à la mort de la plante. Plusieurs

bactéries peuvent être pathogènes aux plantes comme Ralstonia et Xanthomonas. Mais les pathogènes les plus importants restent les champignons et les oomycètes.

1. Quelques exemples de maladies fongiques

Les maladies fongiques constituent chez les légumineuses un facteur très limitant de la production. Dans cette partie, quelques exemples de maladies fongiques sont cités. Tous ces agents pathogènes affectent aussi *M. truncatula*.

- *Colletotrichum trifolii* : Le mode de développement de ce champignon est de type hémibiotrophe et la dissémination se fait par les conidies. Les premiers symptômes apparaissent seulement quelques jours après l'infection et se caractérisent par une macération des tissus de la plante. Les symptômes les plus tardifs et les plus remarquables sont des nécroses sèches caractéristiques qui apparaissent sur les tiges et les feuilles (Djebali, 2008).
- *Erysiphe polygoni* : appelé aussi oïdium, *Erysiphe poligoni* se développe à la surface des feuilles sur lesquelles il forme des colonies d'aspect blanc poudreux.
- *Botrytis fabae* : ce champignon de type nécrotrophe, Botrytis fabae est l'agent causal de la maladie des tâches chocolatées. Elle provoque des tâches sur les feuilles dont la couleur varie du brun rougeâtre au noir. C'est une maladie qui provoque d'importants dégâts sur la culture de la fève en Tunisie (Kharrat et al., 1996).
- *Ascochyta rabiei* : c'est une maladie qui touche quasiment toutes les parties aériennes de la plante. Les attaques se manifestent par des lésions allongées de couleur brun foncé sur la tige et par des nécroses arrondies sur les feuilles.
- *Mycosphaerella pinodes* : C'est le principal agent causal de l'anthracnose du pois, engendrant d'importants dégâts sur cette légumineuse à travers le monde (Bretag et Ramsey, 2001). La maladie se développe rapidement en conditions chaudes et humides.
- *Phoma medicaginis* : ce champignon provoque la maladie des tiges noires sur les *Medicago* spp. Les feuilles attaquées jaunissent et finissent par tomber entraînant ainsi une défoliation complète de la plante lors d'une grande infection.
- Fusarium : ce champignon, de très larges spectres d'hôtes, infecte des plantes herbacées et ligneuses. La majorité des Fusarium responsables de flétrissements vasculaires appartient à une seule espèce, *Fusarium oxysporum*, qui provoque du

Tableau 1. Pertes économiques causées par la verticilliose.

Mio. : Millions. Données compilées par Magdalena Siebold (non publié) d'après les chiffres du FAO et présentées au 11th International Verticillium Symposium 2013.

	Production annuelle globale (moyenne 2005-2010)		Perte estimée		Perte maximale
Plante hôte	**Mio. $**	**Mio. Tonnes**	**Mio. Tonnes**	**Mio. $**	**%**
Tomate	71,07	140,95	1,41	710,72	70
Pommes de terre	70,7	326,02	3,26	707,03	50
Coton	35,47	23,52	0,24	354,72	30
Colza	20,65	54,98	0,55	206,53	50
Pastèque	21,16	95,62	0,96	211,61	
Olivier	21,05	17,7	0,18	210,46	75
Piments et poivrons	17,88	27,65	0,28	178,77	20
Concombre	17,26	55,53	0,56	172,6	
Choux	16,89	64,66	0,65	168,93	
Laitue	13,95	23,56	0,24	139,47	100
Tabac	12,48	6,69	0,07	124,78	30
Aubergine	12,22	38,32	0,38	122,15	70
Tournesol	10,33	31,7	0,32	103,3	55
Fraise	8,75	4,14	0,04	87,48	
Epinards	6,41	17,16	0,17	64,1	
Chou-fleur (et brocoli)	6,39	18,56	0,19	63,93	
Pistachier	3,26	0,73	0,01	32,62	
Avocat	3,01	3,73	0,04	30,08	
Lentilles	1,96	3,07	0,04	19,61	
Artichaut	1,15	1,44	0,01	11,45	
Houblon	586	0,13	0	5,86	100
Alfalfa	nb	nb	nb	nb	50

flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire chez plus de 100 hôtes différents (Lievens et al., 2008).

- *Aphanomyces euteiches* : cet oomycète infecte plusieurs espèces annuelles et pérennes de la famille des légumineuses. A l'échelle de la parcelle, les symptômes de cette maladie se manifestent par un jaunissement des plantes, qui apparaît par foyer.
- *Verticillium* : ce champignon pathogène est responsable de la verticilliose.

2. *Verticillium* sp : agent causal de la verticilliose

Le genre Verticillium est un groupe de champignons du sol pathogènes des plantes et qui est responsable d'une maladie vasculaire, la verticilliose. A cause de son large spectre d'hôte et des taux des pertes des cultures estimées (**Tableau 1**), la verticilliose est considérée comme l'une des maladies les plus dévastatrices dans le monde. *Verticillium dahliae* Klebahn, *V. albo-atrum* et *V. longisporum sont* parmi les espèces qui provoquent le plus de pertes économiques dans le monde.

La verticilliose est plus développée dans les régions tempérées, moins fréquente dans les régions subtropicales, et rare dans les régions tropicales (Inderbitzin et Krishna, 2014).

Au cours de l'histoire, la taxonomie du genre Verticillium a été revue plusieurs fois grâce à l'évolution des méthodes d'analyses. Ainsi, aujourd'hui on compte 10 espèces phytopathogènes vasculaires des dicotylédones, avec des conidiophores verticillés qui produisent des structures de dormance de couleur brune : *V. dahliae*, *V. albo-atrum*, *V. alfalfae*, *V. longisporum*, *V. nonalfalfae*, *V. tricorpus*, *V. zaregamsianum*, *V. nubilum*, *V. isaacii* et *V. klebahnii*. Les trois espèces *V. albo-atrum* (pathogène de la pomme de terre), *V. alfalfae* (pathogène de la luzerne), et *V. nonalfalfae* (spectre d'hôte plus large mais non pathogène de la luzerne) sont dérivées de l'espèce historique *V. albo-atrum*.

V. alfalfae, anciennement appelé *V. albo-atrum*, est un agent pathogène de la luzerne. La différentiation morphologique entre les trois espèces *V. alfalfa*, *V. nonalfalfae* et *V. albo-atrum* est impossible et ne peut se faire correctement qu'en utilisant les outils moléculaires.

La verticilliose est une maladie vasculaire de flétrissement qui cause des symptômes de déssechement. *V. alfalfae* ne peut pénétrer dans les racines pour coloniser le xylème de la plante qu'à travers des blessures. La biomasse fongique dans le xylème de la plante induit un blocage du xylème et affecte la circulation d'eau dans la plante, ce qui induit le flétrissement de la plante (Fradin et Thomma, 2006).

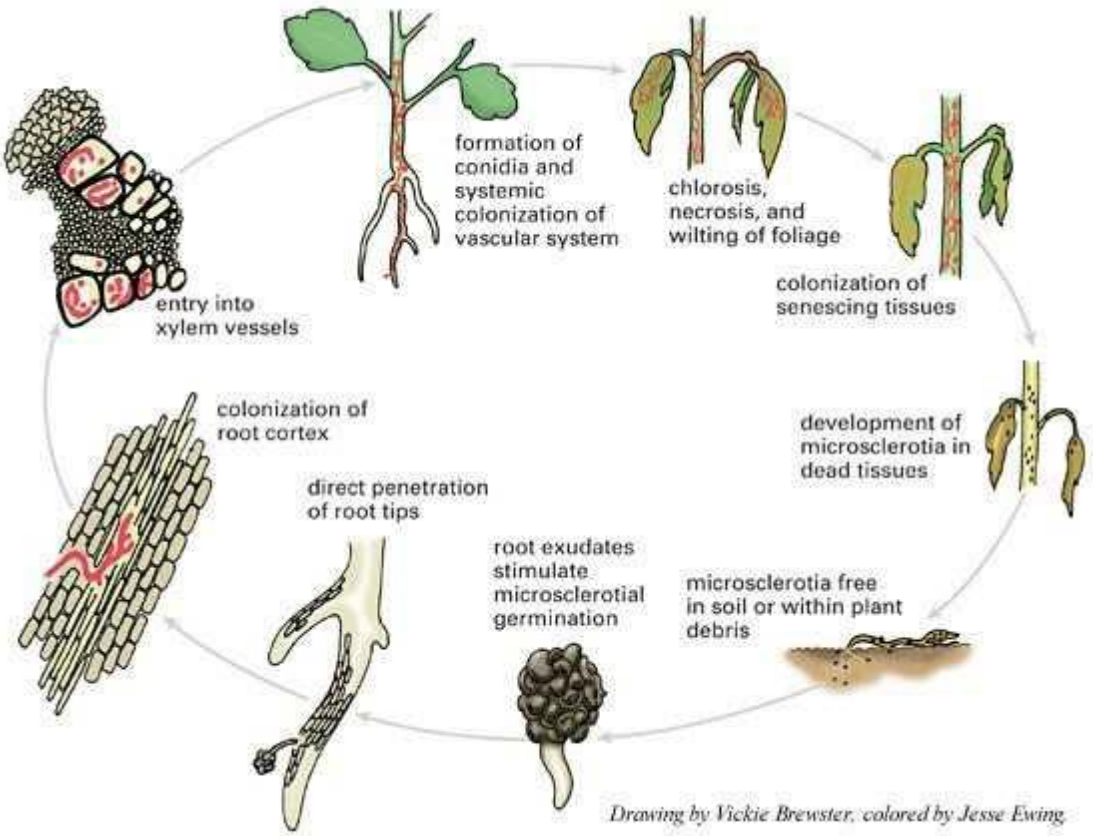


Figure 12. Cycle de la maladie de Verticillium sp. Le cycle d'infection est très similaire chez *V. albo-atrum*, *V. longisporum* et *V. dahliae*. (Berlanger and Powelson 2000)

Le cycle d'infection est divisé en trois phases : la phase de dormance, la phase d'infection, et la phase saprophyte (**Figure 12**).

La phase de dormance est la phase où le pathogène forme des structures de survie lorsque les conditions ne sont pas favorables à son développement. Ces structures appelées microsclérotes peuvent persister dans le sol plusieurs années et germent en cas d'induction par les exsudats racinaires des plantes.

La phase d'infection se caractérise par la pénétration des hyphes par les blessures qui se développent dans le cortex en direction de l'endoderme pour le traverser en suite. Une fois arrivé au xylème, le pathogène y reste et le colonise, soit par croissance végétative, soit en produisant des spores qui seront transportées par le flux de sève dans le xylème et y reste. D'autres conidies néoformées germent et les hyphes accèdent à d'autres vaisseaux adjacents, et ainsi de suite. Ceci est à l'origine des symptômes de flétrissement et de brunissement foliaire, dû principalement aux enzymes de dégradation et des toxines produits par le champignon, à la réponse de la plante hôte comme la production de lignine comme mécanisme de défense à l'agent pathogène.

Pendant les phases tardives, le champignon colonise tous les tissus de la plante et entre dans une phase saprophyte où il forme les structures de dormance dans le parenchyme de la plante morte. Il va persister ainsi dans le sol pendant plusieurs années.

3. Mécanismes de défense chez la plante

Devant le danger de leur environnement, les plantes sont confrontées à des micro-organismes pathogènes tels que des virus, des bactéries, des oomycètes et des champignons. Néaumoins, elles résistent efficacement à leurs agresseurs en déclenchant plusieurs mécanismes de défense. Ces mécanismes ont été développés pour se protéger des multiples agents pathogènes présents dans l'environnent.

La première ligne de défense est représentée par les barrières naturelles préformées (physiques et chimiques). Parmi les barrières physiques, il y a la surface externe de la plante, principalement la cire et la cuticule des cellules épidermiques, l'endoderme, les stomates, la paroi cellulaire épaisse, etc. Freeman (2008), assure que suite à une infection les parois cellulaires se renforcent avec une production de substances telles que la callose qui servent de matrice pour le dépôt de molécules antimicrobiennes (Luna et al., 2011), la lignine qui permet d'empêcher la dégradation des fibres de cellulose (Sattler et Funnell-Harris, 2013), et la subérine. D'autre part, les occlusions vasculaires sont systématiquement observées suite à

une infection par un pathogène vasculaire. Le processus se fait essentiellement par la production de substances pectiques, le plus souvent, ce sont des tyloses et/ou des gels qui empêchent la progression de l'agent pathogène en réduisant le diamètre de la lumière des vaisseaux (Sun et al., 2013).

Si l'agent pathogène réussit à passer ces barrières physiques et à rentrer dans les tissus de la plante, des barrières chimiques se mettent en place. Les métabolites secondaires comme les phytoanticipines et les saponines (Mysore et Ryu, 2004) sont des molécules à effet antimicrobien produites naturellement par les plantes et qui agissent en tant que barrières chimiques. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'azote (RNS), sont des molécules produites dans la cellule infectée et qui provoquent dans la cellule l'oxydation des acides nucléiques, la peroxydation des lipides et l'oxydation des groupements sulfhydriles des protéines induisant des dommages irréversibles (O'Brien et al., 2012). Parmi ces molécules, on trouve le superoxyde (O_2^-), l'hydroxyle (•OH), le pyroxyle (RO_2•), l'hydroperoxyle radical (HO_2 •), l'oxyde nitrique (• NO), le dioxyde d'azote (•NO_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochlorique (HOCl) et les peroxynitrites ($ONOO^-$). D'autres composés à effet antimicrobien sont décrits dans la littérature comme les phytoalexines (Maddox et al., 2010), les protéines PR « pathogenesis-related proteins » (Sels et al., 2008), et le soufre.

Si malgré les barrières naturelles physiques et chimiques, l'agent pathogène réussit à surmonter cette première ligne de défense et à s'installer et pour commencer la colonisation, des mécanismes de défense induite se mettent en place. Ces mécanismes commencent lorsque la plante a reconnu un microorganisme (reconnaissance très spécifique de type gène à gène) ou l'un de ses composants (reconnaissance moins spécifique d'un éliciteur) ou encore de molécules signalant des dommages causés par le pathogène au sein de la plante.

En effet, les cellules végétales reconnaissent des molécules appelées communément éliciteurs ou effecteurs présentes à la surface des pathogènes ou excrétées par ces derniers. Leur reconnaissance s'opère via des récepteurs. Les voies de signalisation intracellulaires activées chez les plantes suite à la reconnaissance des éliciteurs impliquent des acteurs moléculaires. Ces voies de signalisation convergent notamment vers la production de formes actives de l'oxygène, le renforcement des parois cellulaires et l'induction de gènes de défense dont les produits directs ou indirects peuvent contribuer à l'arrêt du développement du pathogène via leur activité antimicrobienne.

Tableau 2. PAMPs et DAMPs identifiés et reconnaissance par les plantes (Postel et Kemmerling, 2009)

PAMP	**Motif minimum**	**Origine**	**Plantes sensibles**
Flagelline	flg22	Bactéries à Gram-	Tomate, A. thaliana
Elongation factor (EF-Tu)	elf18	Bactéries à Gram-	A. thaliana, autre brassicceae
Transglutaminase	motif Pep-13	Oomycètes (Phytophtora spp.)	Persil, pomme de terre, vigne, tabac, N. benthamiana
Xylanase	TKLGE/pentapeptide	Champignons (Trichoderma spp.)	Tabac, tomate
Cold shock protein	motif RNP-1	Bactéries à Gram- et bactérie à Gram +	Solanaceae
Cellulose binding elicitor lectin (CBEL)	Domaine de fixation de la cellulose	Oomycètes (Phytophtora spp.)	Tabac, A. thaliana
Lipid-transfer proteins (elicitins)	non identifié	Oomycètes (Phytophtora spp., Pythium spp.)	Tabacn navet, Raphonus sativus
Harpins (HrpZ)	non identifié	Bactéries à Gram- (Pseudomonas, Erwinia)	Concombre, tabac, tomate, A. thaliana
Necrosis-inducing proteins (NLP)	non identifié	Bactéries (Pseudomonas), champignons (Fusarium), oomycètes (Phytophtora, Pythium)	plantes dicotylédones
Peptidoglycane	Muropéptides/Chitine	Bactéries à Gram+	A. thaliana, tabac
Chitine	Oligosaccharides (degré de polymérisation >3)/Tétraglucosyle	Tous les champignons	Tomate, A. thaliana, riz, blé, orge
ß-Glucanes	glucitole/hepta-ß-glucoside branché, oligo-ß-glucosides lineaire	Champignons (Pyricularia oryzae), oomycètes (phytophtora), algues brunes	Tabac, riz, Fabaceae
Fucanes sulfatés	Fucane/oligosaccharide	Algues brunes	Tabac
Lipopolysaccharide	Lipide A/lipooligosaccharides	Bactéries à Gram - (Xanthomonas, Pseudomonas)	Poivre, tabac
DAMP	**Motif minimum**	**Origine**	**Plantes sensibles**
Oligouronides	Oligomères	Pectines des parois cellulaires	Tabac, A. thaliana
Cellodextrines	Oligomères	Cellulose des parois cellulaires	Raisin
Monomères de cutine	Dodecan-1-ol	Cuticule des plantes	Concombre, tomate, pomme

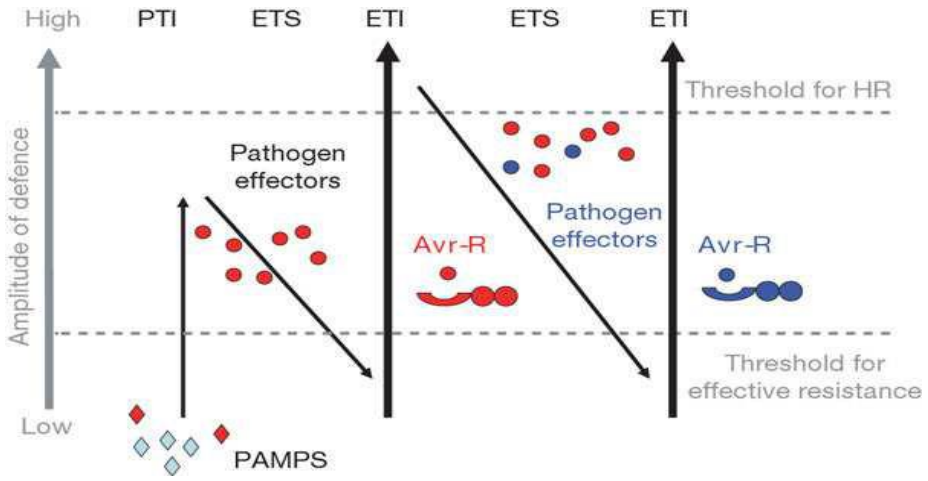


Figure 13. Un modèle en zigzag illustrant la résistance quantitative du système d'immunité de la plante. PTI =PAMP-triggered immunity; ETS = effector-triggered susceptibility ; ETI = effector triggered immunity (Jones and Dangl, 2006).

La première ligne de dédense induite commence par la perception du danger grâce aux éliciteurs. Ces éliciteurs peuvent être d'origine microbienne et sont appelés les MAMPs ou les PAMPs (microbe-associated molecular patterns, pathogen- associated molecular patterns), ou dérivés de la plante appelés des DAMPs (damage-associated molecular patterns). Le **Tableau 2** montre quelques MAMPs et DAMPs.

La résistance qualitative (monogénique) définie par le processus établi par un gène de la plante capable d'éliminer l'agent pathogène. Cette résistance a été décrite par Jones et Dangl (2006) selon un modèle appelé le modèle en zigzag. La **Figure 13** décrit la résistance qualitative. Dans la première phase, la plante détecte les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) représentés par les diamants rouges, grâce à une PRR (Pattern Recognition Receptor) et induit un ensemble de mécanismes de défenses nommés PTI (PAMP-Triggered Immunity). Dans la phase 2, le pathogène produit des effecteurs pour déstabiliser la PTI ou favoriser la nutrition et la colonisation, provoquant une ETS (Effector-Triggered Susceptibility). Dans la phase 3, une protéine R reconnaît un effecteur appelé Avr indiqué en rouge, activant l'ETI (Effector Triggered Immunity), qui se manifeste le plus souvent par une réponse d'hypersensibilité (mort cellulaire programmée) (Ausubel, 2005). Dans la phase 4, les isolats qui ont perdu l'effecteur Avr sont sélectionnés, et un autre effecteur (en bleu) peut supprimer l'ETI. La sélection favorise de nouveaux allèles de protéines R capables de reconnaitre les nouveaux effecteurs acquis, provoquant de nouveau une ETI.

La résistance quantitative (polygénique) plus durable que la résistance qualitative complète (Lannou et al., 2013). Elle se caractérise par une diminution de la fitness de l'agent pathogène sur les différentes phases du cycle infectieux qui comprend la croissance et la production de spores ainsi que la colonisation des tissus de la plante (Pariaud et al., 2009).

B. Matériel et Méthodes

Tableau 3. Origine des accessions de *Medicago truncatula* utilisées et leurs sensibilités à *Verticillium alfalfae* V31.2

Accession de *Medicago truncatula*	**Origine géographique**	**Sensibilité à V31.2**
A17	Espagne	Résistante
F83005.5	France	Sensible
DZA315.16	Algérie	Sensible
TN8.3	Tunisie	Sensible



Figure 14. Origine des rhizobiums collectés au centre la Tunisie : (A) Sidi Bouzid, (B) Sidi Ali Ben Aoun, (C) Bir El Haffey, (D) Bir Ouled Mnasser, (E) Thélepte, (F) Oued Miou.

I. Matériel biologique

1. Matériel végétal : *Medicago truncatula*

Quatre lignées de *Medicago truncatula* d'origines géographiques différentes (**Tableau 3**) ont été utilisées dans ce travail. Les graines ont été obtenues suite à des multiplications de plantes dans les serres d'Ecolab à Toulouse.

2. Les souches de champignons

Les souches de champignons utilisées dans les essais d'antagonisme in vitro et de biocontrôle ont été obtenues depuis les collections d'ECOLAB et du laboratoire de biochimie et de technobiologie à Tunis. *Verticillium alfalfae* V31.2 (appelée avant *Verticillium albo-atrum*), *Vertcillium nonalfalfae* LPP0323, *Verticillium dahliae* JR2, ainsi que 3 espèces de *Fusarium oxysporum*. Les champignons ont été cultivés sur un milieu PDA à 24°C à l'obscurité. Les suspensions de spores ont été obtenues comme décrit dans Ben et al., (2013).

3. Les isolats de rhizobium

Les isolats de rhizobiums utilisés dans les différents essais proviennent de la collection effectuée au printemps 2014 comprenant 31 isolats. Ces bactéries ont été isolées à partir de nodules de plantes de *M. truncatula* saines collectées à partir de six sites du centre de la Tunisie (Sidi Ali Ben Aoun, Thélepte, Bir el Haffey, Oued Miou, Sidi Bouzid et Ouled Mnasser) localisées sur la carte (**Figure 14**). Quatre autres isolats ont été obtenus auprès du docteur Kais ZRIBI au laboratoire des légumineuses au Centre de Biotechnologie Borj Cedria de Tunis, en plus de la souche de référence RCR 2011.

II. Méthodes

1. Germination des graines

Les gousses des différentes accessions de *M. truncatula* ont été dégoussées et les graines obtenues sont scarifiées à l'aide d'un papier de verre.

Pour les tests *in vitro*, la stérilisation de surface des graines est indispensable. Les graines sont ainsi mises dans de l'eau de javel pendant 1 min et 30 secondes, puis rincées à l'eau distillée stériles une première fois, en agitant pendant 2 minutes, puis 5 à 6 fois. Au dernier lavage, les graines sont gardées dans l'eau pendant 2 à 3 heures pour l'imbibition. Les graines imbibées sont ainsi retirées de l'eau, puis transférées sur milieu gélosé à 0,7 % dans des boîtes de Pétri.



Figure 15. Dégoussage, Scarification, repiquage et germination des graines de *M. truncatula*.

Dans le cas des tests de protection, de nodulation et de solubilisation du phosphate, les graines sont scarifiées avec du papier de verre, puis sont mises dans des boîtes de Pétri avec du papier absorbant imbibé d'eau distillée stérile.

Dans les deux cas, une fois les graines disposées dans les boîtes de Pétri, les boîtes sont ensuite fermées avec du parafilm pour conserver l'humidité, et enveloppées de papier aluminium pour assurer l'obscurité. Ces boîtes sont ainsi placées à 4°C pendant 3 jours pour lever la dormance, ensuite placées un jour à température ambiante (**Figure 15**). Les plantules de *M. truncatula* ainsi obtenues sont par la suite repiquées directement après germination sur le substrat correspondant.

2. Culture des champignons et production de spores

Les cultures de champignons utilisés dans ce travail ont été obtenues à partir de suspensions de spores congelées à -80°C dans 25% de glycérol. Quelques gouttes de glycérol stock ont été étalées sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, BD Difco), dans des boîtes de Petri et les cultures ont été incubées pendant 5 jours à 24°C et à l'obscurité. Plusieurs repiquages ont été effectués pour avoir des cultures fraîches pour nos essais.

Les suspensions sporales de la souche de *Verticillium alfalfae* V31.2 ont été obtenues en inondant des cultures de 2 semaines dans des boîtes de Pétri avec de l'eau distillée stérile. La concentration des suspensions sporales a été déterminée sous microscope à l'aide une cellule Malassez. A partir de cette suspension sporale, on peut reconstituer un glycérol stock à -80°C de la souche V31.2.

3. Obtention d'isolats de rhizobium à partir de nodules

Les plantes de *M. truncatula* ont été récoltées à partir de 6 sites du centre de la Tunisie, au printemps 2014, et les nodules ont été prélevés des racines et conservés dans des tubes eppendorff avec du $CaCl_2$. Les nodules séchés sont réhydratés, puis désinfectés en surface dans de l'éthanol à 95% pendant 5 à 10 secondes, suivi d'une série de lavage. Ils sont ensuite immergés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 2 minutes, puis lavés plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile comme décrit par Beattie et Handelsman (1989). La stérilisation de surface sert à limiter la contamination du milieu de culture par d'autres microorganismes. Chaque nodule est immergé par 2 à 3 gouttes d'eau distillée, puis écrasé à l'aide de pinces stériles sur une boîte de Pétri contenant le milieu gélosé YEMA-RC (Yeast Extract Mannitol

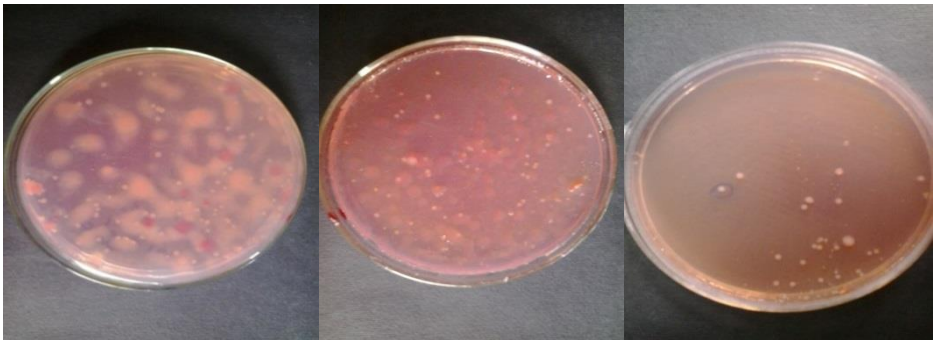


Figure 16. Purification des isolats de rhizobiums

(a) Milieu contenant des rhizobiums avec des contaminants colorés en rouge. (b) 1ère purification : milieu contenant des rhizobiums avec peu de contaminants. (c) 2ème purification : milieu contenant seulement des souches de Rhizobium pures.

Tableau 4. Sites d'échantillonnage et nombre d'isolats gardés pour chaque site.

Sites d'échantillonnage	<
Sidi Ali Ben Aoun	6
Thaélepte	3
Bir El Haffey	4
Oued Miou	6
Sidi Bouzid	5
Ouled Mnasser	7
Souches du CBBC	4
RCR2011	1



Figure 17. Etapes de l'essai de nodulation *in vitro*.

(A) : Germination des graines sur milieu gélosé stérile ; (B) : Disposition des graines germées sur milieu M incliné sans azote ; (C) : Inoculation des racines des plantules avec l'inoculum bactérien.

Agar additionné de Rouge Congo à 0,0025%). Le jus de nodosités est soigneusement étalé sur cette boîte par une anse stérile (Vincent, 1970). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quadrants, de manière à isoler des simples colonies. Toutes les boîtes seront par la suite incubées pendant 4 à 7 jours dans un incubateur à 28°C.

Après l'incubation, des colonies bien individualisées sont purifiées par des repiquages successifs (**Figure 16**) sur de nouvelles boîtes jusqu'à l'obtention d'une culture pure et homogène. Les colonies ainsi purifiées sont conservées pour une longue durée à -80°C dans du glycérol (25 %) jusqu'à utilisation.

Trente et un isolats de Rhizobium (**Tableau 4**) ont été purifiés et conservés. Quatre souches qui ont été obtenues auprès du Centre de Biotechnologie Borj Cedria ainsi qu'une souche de référence RCR2011 appartenant à ECOLAB ont été ajoutées à la collection.

En deuxième partie 44 mutants ont été purifiés après exposition de la souche RCR2011 de *Sinorhizobium meliloti* à une gamme de rayonnements Gamma par l'équipe du Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires de Tunisie, afin d'élargir la variabilité génétique et de développer de nouvelles souches.

4. Evaluation de la performance des rhizobiums pour la fixation symbiotique de l'azote

L'étude de l'efficience des isolats de Rhizobium a été effectuée *in vitro*, au phytotron et sous serre.

4.1. Test de nodulation in vitro

Des graines de *Medicago truncatula* des deux lignées parentales A17 et F83005.5 ont été scarifiées, stérilisées et mises en germination dans du milieu gélosé à 7‰, puis gardées 3 jours à 4°C pour la levée de la dormance, et enfin placées pendant 24 heures à température ambiante. Après ces 24 heures, les graines germées ont été désposées sur du milieu incliné M sans azote dans des boîtes carrées, à raison de 5 à 6 graines par boîte. Les racines sont par la suite inoculées une par une suspension de rhizobium (**Figure 17**). Chaque racine est inoculée avec 50 µl à 10^8 cfu/ml. Une boîte de 5 à 6 graines a été utilisée pour chaque condition.

Le milieu M standard contient des vitamines, des microéléments, et des macroéléments, dont de l'azote. Or pour cet essai, il a fallu le modifier pour éliminer toutes les sources d'azote

Tableau 5. Composition du milieu M modifié.

		Concentration (Cf) finale mg/L
S1 les macroéléments	$MgSO_4$, $7H_2O$	731
	KCl	65
	KH_2PO_4	110
	Na-Fe-EDTA	8
S2	$CaCl_2$	133
S3 : Les microéléments	$MnCl_2$	6
	H_3BO_3	1,5
	$ZnSO_4$, $7H_2O$	2,65
	Na_2MoO_4, $2H_2O$	0,0024
	$CuSO_4$, $5H_2O$	0,13
	KI	0,75
Les vitamines	Glycine	3
	Myoinositol	50
	Nicotine acid	0,5
	Pyridoxine	0,1
	Thiamine	0,1
	pH	5,5
	Agar	7,5 g/L

(**Tableau 5**). Le KNO_3 a donc été changé par du KH_2PO_4 et le $Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$ par du $CaCl_2$, en essayant d'ajuster les concentrations des autres éléments.

4.2. Tests de nodulation en pots

Des graines de *M. truncatula* ont été scarifiées, maintenues sur un papier absorbant humide dans une boîte de Pétri pendant trois jours à 4°C dans l'obscurité, puis transférées à température ambiante pendant 24 heures.

Les graines germées ont été transférées dans des pots de 500 ml contenant un mélange de Perlite / terreau stérilisé (2/1, V/V). Trois pots contenant 3 plantules chacun ont été utilisés pour chaque traitement. Ils sont ensuite placés dans un phytotron à 24°C, avec un photopériodisme de 16/8.

Deux Jours après le transfert, les plantules ont été inoculées comme décrit çi dessous.

a. Inoculation des plantules

L'inoculation par les Rhizobium est faite 2 jours après la mise en pots des plantules. Les rhizobiums sont cultivés dans 20 ml du milieu liquide YEM pendant 48 heures à 28°C, en présence d'agitation orbitale à 150 rpm. L'inoculum est ensuite dosé à 600 nm et ajusté à une concentration de 10^7 cfu/ml en supposant qu'une densité optique de 1 à 600nm est équivalente à 10^9 cfu/ml.

Chaque plante est ensuite inoculée avec 3 ml de la suspension bactérienne. L'inoculum est stérilement injecté à la base des tigelles des jeunes plantules. Un traitement de plantes témoins non inoculées est considéré dans chaque test de nodulation.

b. Les trois essais de nodulation en pots

Les deux premiers essais (dont un sous serre et un en phytotron) ont été conduits sur douze isolats de rhizobium (B.oun1, B3, B6, H2, H3, O.M5, O.Mn11, O.Mn5, O.Mn6, Th1, Th2, et Th4) inoculés à quatre lignées de *M. truncatula* (A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3).

Un troisième essai a été conduit en phytotron 25°C sur 4 isolats de rhizobium (O.Mn13, B.oun2, J13 et II3.23/4) inoculés aux quatre lignées de *M. truncatula* précédemment utilisées A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3. Ce troisième essai a été fait sur deux expériences indépendantes, avec 3 pots pour chaque expérience et chaque condition et 3 plantes dans chaque pot.

Huit semaines plus tard, les plantes ont été récoltées, les nodules ont été comptés et les biomasses aériennes et racinaires ont été déterminées. Pour le troisième essai, un dosage d'azote dans la partie aérienne a été fait.

c. Dosage d'azote

Le dosage d'azote a été fait sur seulement les parties aériennes des plantes de *M. truncatula* des lignées A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées au phytotron et inoculées avec les quatre isolats de Rhizobium O.Mn13, B.oun2, J13 et II3.23/4. Les parties aériennes de toutes les plantes ont été séchées à l'étuve. Chaque groupe de 3 plantes provenant d'un même pot a été rassemblé et broyé en poudre dans un mortier, avec un pilon, puis avec un broyeur à marteaux (type LM 3100). La teneur en azote a été dosée avec la méthode de Kjeldahl telle que décrite par (Kjeldahl, 1883).

5. Evaluation de la performance des Rhizobium pour la solubilisation du phosphate

5. 1. Solubilisation du phosphate in vitro

L'expérience a été réalisée avec le phosphate de calcium inorganique ($CaHPO_4$) comme seule source de P insoluble, dans un milieu Pikovskaya solide contenant en g/L (Glucose, 10; NaCl, 0,2; $MgSO_4$, $7H_2O$, 0,41; NH_4NO_3, 0,373; $FeCl_3$ 0,003; extrait de levure, 3; Agar, 20). Ce milieu de croissance a été complété avec 0,7 g/L de $CaHPO_4$ comme décrit par Hmissi et al. (2015). Le milieu Pikovskaya contenant du $CaHPO_4$ a un aspect laiteux.

A partir d'une culture fraîche de rhizobium, un point est placé sur la surface du milieu de culture. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 28°C. Les colonies se distinguant par la production d'une zone halogène autour des colonies bactériennes (qui représentent l'indicateur de la solubilisation de P) ont été identifiées. Le diamètre de la colonie (dc) et le diamètre total (zone halo + colonie: dh) ont été mesurés à 7 et 15 jours d'incubation afin de calculer l'indice de solubilisation (SI), tel que décrit par Marra et al. (2011); SI = dh (mm) / dc (mm).

Trois répétitions biologiques indépendantes, avec quatre répétitions techniques, ont été réalisées pour les trente-six isolats de rhizobium.

5. 2. Solubilisation du phosphate et effet sur la croissance des plantes

a. Solubilisation du phosphate en pots : différences entre phosphate soluble et phosphate inorganique insoluble

Deux accessions de *Medicago truncatula* (Jemalong A17 et F83005.5), et quatre isolats de rhizobium (O.Mn13; II3.23/4; J13 et B.oun2) ont été utilisées dans cette expérience.

La conception expérimentale a été effectuée comme suit : le traitement 1 est un mélange sable/perlite (témoin); le traitement 2 est un mélange sable/perlite avec addition de 0,2% de $CaHPO_4$ comme phosphate insoluble; le traitement 3 est mélange sable/perlite avec addition de 0,1% de K_2HPO_4 et 0,1% de KH_2PO_4 comme phosphate soluble.

Le phosphate en poudre a été soigneusement mélangé avec du sable et de la perlite, et le mélange a été divisé en pots dans lesquels les graines germées ont été transférées. Environ neuf répétitions ont été considérées pour chaque traitement. Deux répétitions biologiques indépendantes ont été réalisées.

Malheureusement, la majorité des plantes du traitement 3 a été perdu. Il n'a donc été gardé que les traitements 1 et 2 pour le reste de l'expérience et l'analyse des données.

Huit semaines plus tard, les plantes ont été récoltées et le poids frais des parties aériennes et racinaires a été déterminé.

Il est à noter que cette expérience a été réalisée dans un phytotron à 25°C, au laboratoire du partenaire français.

b. Solubilisation du phosphate en pots : différences entre phosphate rocheux et phosphate soluble

Deux accessions de *Medicago truncatula* (Jemalong A17 et F83005.5) et quatre isolats de rhizobium (O.Mn13; II3.23/4; J13 et B.oun2) ont été utilisés dans cette expérience

La conception expérimentale a été effectuée comme suit : le traitement 1 est un sol non inoculé (témoin) ; le traitement 2 est un sol inoculé avec addition de 0,2% de Phosphate rocheux provenant des mines de Gafsa comme phosphate insoluble ; le traitement 3 est un sol inoculé avec addition de 0,1% de K_2HPO_4 et 0,1% de KH_2PO_4 comme phosphate soluble

Le phosphate en poudre a été soigneusement mélangé avec du sable et de la perlite, et le mélange a été divisé en pots dans lesquels les graines germées ont été transférées. Six à

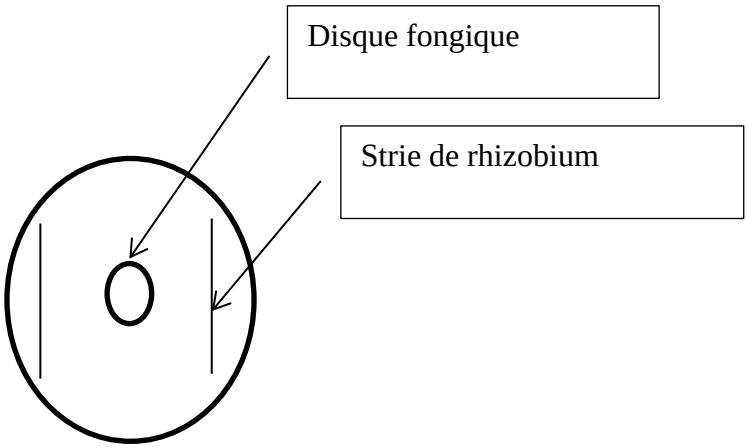


Figure 18. Représentation schématique de la méthode de strie utilisée pour les tests d'antagonisme.

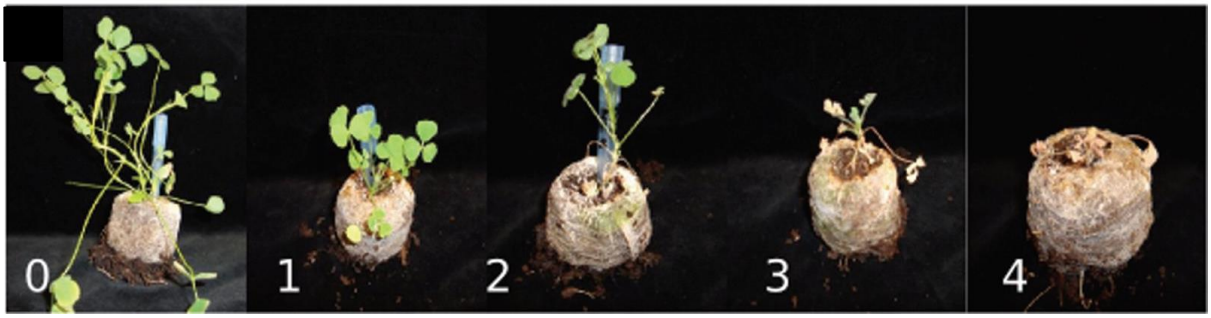


Figure 19. Échelle de symptômes pour la notation de l'indice de l'avancement de la verticilliose chez *Medicago truncatula.*

neuf répétitions ont été considérées pour chaque traitement. Deux répétitions biologiques indépendantes ont été réalisées.

Huit semaines plus tard, les plantes ont été récoltées et le poids frais des parties aériennes et racinaires a été déterminé.

Il est à noter que cette expérience a été réalisée dans un armoire phytotron à 25°C à l'INRA Tunisie.

6. Essai de biocontrôle

6. 1. Test d'antagonisme in vitro

Dix souches de champignons différentes ont été utilisées dans ce test. Pour chaque souche fongique, trois boîtes de Pétri répliquées (90 mm de diamètre) contenant du milieu PDA ont été inoculées au centre avec des disques du champignon (5 mm de diamètre). Dans le même temps, des isolats de rhizobiums ont été appliqués à équidistance les unes des autres et à 25 mm des disques fongiques (**Figure 18**). Les diamètres orthogonaux de la croissance des champignons en développement ont été mesurés.

6. 2. Inoculation et notation de symptômes

Des expériences d'inoculation ont été réalisées en utilisant le même protocole standard (Toueni et al., 2016).

Les gousses de deux lignées de *Medicago truncatula* (Jemalong A17 et F83005.5) sont vidées de leurs graines et les graines ont été scarifiées, puis ont été semées sur du papier filtre humidifié dans des boîtes de Pétri. Elles ont été germé dans l'obscurité pendant 3 jours à 4ºC pour la stratification et pendant 24 heures à température ambiante. Les graines germées ont été transférées dans des pots Jiffy (Jiffy France, Lyon, France) et cultivées pendant 2 (ou 8) jours à 25°C avec une photopériode de 16h / 8h (jour/nuit), avant d'être inoculées avec 1ml à 10^9 cfu/ml de rhizobium. Huit (ou seize) jours plus tard (première paire de feuilles), les plantes dans des pots de Jiffy ont été inoculées à la racine en coupant à environ 1 cm du fond du pot de Jiffy et les racines exposées ont été immergées pendant 30 min dans une suspension de conidies de V. alfalfae V31.2 à 10^6 conidies / ml.

Les symptômes ont été notés pendant quatre semaines sur une échelle de symptômes allant de 0 correspondant à une plante saine à 4 correspondant à une plante morte (**Figure 19**).

7. Analyse statistique des données

L'aire sous les courbes de progression de la maladie (AUDPC, Shaner et Finney 1977) a été calculée en utilisant le paquage « agricolae » du système R pour le calcul statistique et les graphiques (R Core Team, 2012).

Toutes les données ont été analysées avec ANOVA en utilisant le modèle approprié en fonction des modèles expérimentaux utilisés.

Les différences de traitement ont été déterminées par un test de Tukey ou un test de Newman-Keuls en utilisant le paquage "agricolae".

C. Résultats

Tableau 6. Origine des isolats de Rhizobium
[1] Obtenu du CBBC ; [2] (Rosenberg et al. 1981)

Isolats de Rhizobium	**Origine**
10.23/R29[1]	Rhayet, Tunisie
B.oun1	Sidi Ali Ben Aoun,Tunisie
B.oun2	Sidi Ali Ben Aoun,Tunisie
B.oun3	Sidi Ali Ben Aoun,Tunisie
B.oun4	Sidi Ali Ben Aoun,Tunisie
B.oun5	Sidi Ali Ben Aoun,Tunisie
B.oun6	Sidi Ali Ben Aoun,Tunisie
B1	Sidi Bouzid, Tunisie
B2	Sidi Bouzid, Tunisie
B3	Sidi Bouzid, Tunisie
B4	Sidi Bouzid, Tunisie
B6	Sidi Bouzid, Tunisie
H1	Bir El Haffey, Tunisie
H2	Bir El Haffey, Tunisie
H3	Bir El Haffey, Tunisie
H4	Bir El Haffey, Tunisie
II3.23/4[1]	Amra, Tunisie
J13[1]	Jelma, Tunisie
J15[1]	Jelma, Tunisie
O.M1	Oued Miou, Tunisie
O.M2	Oued Miou, Tunisie
O.M3	Oued Miou, Tunisie
O.M4	Oued Miou, Tunisie
O.M5	Oued Miou, Tunisie
O.M6	Oued Miou, Tunisie
O.Mn10	Ouled Mnasser, Tunisie
O.Mn11	Ouled Mnasser, Tunisie
O.Mn12	Ouled Mnasser, Tunisie
O.Mn13	Ouled Mnasser, Tunisie
O.Mn5	Ouled Mnasser, Tunisie
O.Mn6	Ouled Mnasser, Tunisie
O.Mn7	Ouled Mnasser, Tunisie
RCR2011[2]	Australie
Th1	Thélepte, Tunisie
Th2	Thélepte, Tunisie
Th4	Thélepte, Tunisie

I. Obtention d'isolats de Rhizobium dans le centre de la Tunisie

Pour obtenir les isolats de Rhizobium capables d'établir une symbiose avec la plante modèle des légumineuses *M. truncatula*, des prélèvements de nodules ont été effectués sur des plantes spontannées de cette espèce dans 6 régions du centre de la Tunisie. Après les différentes étapes de purification sur milieu sélectif, 31 isolats purs (**Tableau 6**) ont été obtenus et conservés sous forme de stocks de glycérol jusqu'à leur utilisation. De plus, quatre souches provenant de la collection de CBBC et la souche de référence séquencée RCR2011 ont été incluses dans la collection.

II. La symbiose

Le rôle le plus important des rhizobiums étant la symbiose fixatrice d'azote atmosphérique, l'efficacité symbiotique de certains isolats de rhizobium de la collection a été évalué dans ce chapitre à travers certains paramètres de croissance des plantes. Quatre lignées de *M. truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 provenant de 4 pays différents ont été utilisées dans ces tests.

1. Etude du pouvoir nodulant *in vitro* de deux lignées de *M. truncatula* inoculées avec 36 isolats de rhizobium

Le pouvoir nodulant des Rhizobium a d'abord été étudié *in vitro*. Tous les isolats de Rhizobium ont été testés pour leur capacité à noduler les 2 lignées de *M. truncatula* A17 et F83005.5.

La **Figure 20** montre une grande différence de nodulation entre les 36 isolats de Rhizobium ainsi qu'entre les deux lignées A17 et F83005.5. Vingt-huit isolats de Rhizobium présentent au moins un nodule quand ils sont inoculés à la lignée A17 contre dix-huit seulement chez F83005.5. Dix isolats de Rhizobium ne donnent aucun nodule quand ils sont inoculés à la lignée F83005.5, ces isolats sont B3, B4, H1, H4, J15, O.M4, O.M6, O.Mn10, O.Mn11 et O.Mn12, dont 5 d'entre eux ne nodulent pas du tout A17 non plus (H1, O.M3, O.M4, O.M6, O.Mn11).

Certains isolats de Rhizobium ont montré un pouvoir très faible de nodulation (inférieur à un nodule en moyenne), 4 isolats dans le cas de l'inoculation à A17 et 9 isolats dans le cas de F83005.5.

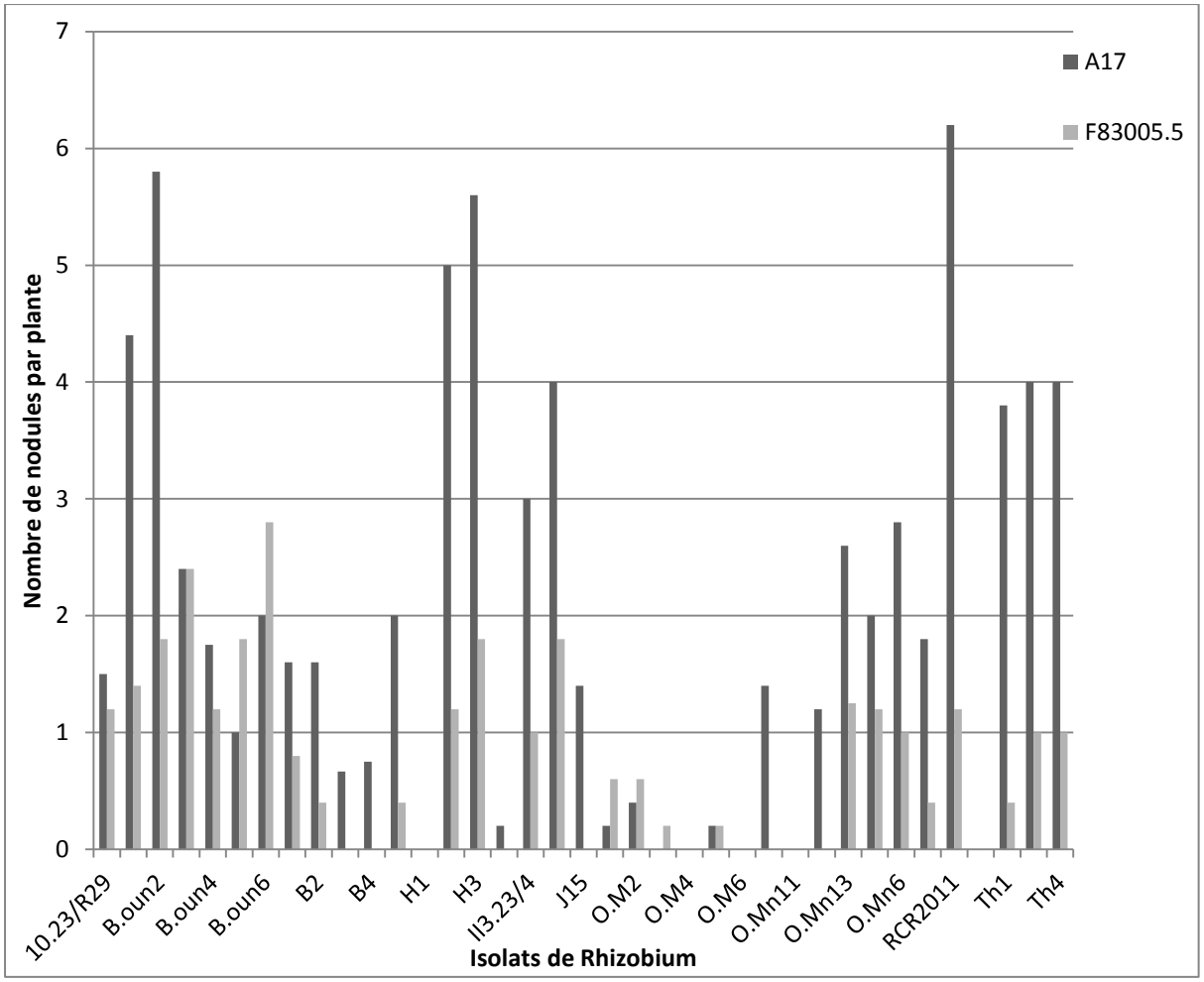
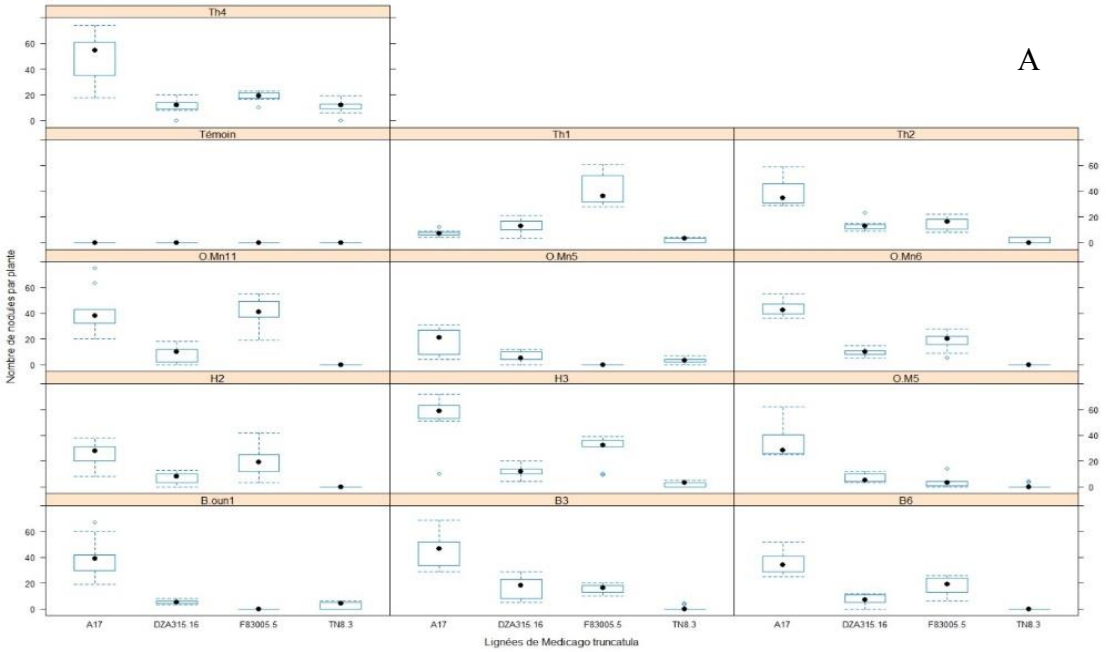


Figure 20. Nodulation des accessions de *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5) inoculées avec les 36 isolats de Rhizobium tunisien.

Les nodules ont été comptés après 4 semaines de culture dans des boîtes carrées sur milieu M dépourvu d'azote. Les valeurs ont été obtenues à partir de 4 à 6 plantes pour chaque combinaison lignée*isolat.

Tableau 7. Nombre de nodules sur des racines de *M. truncatula* cultivées *in vitro* et inoculées avec des isolats de Rhizobium de Tunisie.
Les valeurs ont été obtenues à partir de 4 à 6 plantes pour chaque combinaison lignée*isolat. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK). Les combinaisons Isolat*Lignée avec la même lettre sont du même groupe.

Nodulation *in vitro*			
Rhizobium*Lignée	**Nombre moyen de nodules par plante**	**Rhizobium*Lignée**	**Nombre moyen de nodules par plante**
RCR2011*A17	6,20 a	O.Mn12*A17	1,20 efg
B.oun2*A17	5,80 a	O.Mn5*F83005.5	1,20 efg
H3*A17	5,60 ab	RCR2011*F83005.5	1,20 efg
H2*A17	5,00 abc	B.oun5*A17	1,00 efg
B.oun1*A17	4,40 abcd	II3.23/4*F83005.5	1,00 efg
J13*A17	4,00 abcde	O.Mn6*F83005.5	1,00 efg
Th2*A17	4,00 abcde	Th2*F83005.5	1,00 efg
Th4*A17	4,00 abcde	Th4*F83005.5	1,00 efg
Th1*A17	3,80 abcdef	B1*F83005.5	0,80 fg
B.oun6*A17	3,20 bcdefg	O.M1*F83005.5	0,60 g
Mt13*A17	3,20 bcdefg	O.M2*F83005.5	0,60 g
B.oun4*A17	3,00 cdefg	B2*F83005.5	0,40 g
II3.23/4*A17	3,00 cdefg	B6*F83005.5	0,40 g
B.oun6*F83005.5	2,80 cdefg	O.M2*A17	0,40 g
O.Mn6*A17	2,80 cdefg	O.Mn7*F83005.5	0,40 g
O.Mn13*A17	2,60 cdefg	Th1*F83005.5	0,40 g
10.23/R29*A17	2,40 cdefg	H4*A17	0,20 g
B.oun3*A17	2,40 cdefg	O.M1*A17	0,20 g
B.oun3*F83005.5	2,40 cdefg	O.M3*F83005.5	0,20 g
Mt13*F83005.5	2,40 cdefg	O.M5*A17	0,20 g
B6*A17	2,00 defg	O.M5*F83005.5	0,20 g
O.Mn5*A17	2,00 defg	B3*F83005.5	0,00 g
B.oun2*F83005.5	1,80 defg	B4*F83005.5	0,00 g
B.oun5*F83005.5	1,80 defg	H1*A17	0,00 g
H3*F83005.5	1,80 defg	H1*F83005.5	0,00 g
J13*F83005.5	1,80 defg	H4*F83005.5	0,00 g
O.Mn7*A17	1,80 defg	J15*F83005.5	0,00 g
B1*A17	1,60 defg	O.M3*A17	0,00 g
B2*A17	1,60 defg	O.M4*A17	0,00 g
B3*A17	1,50 defg	O.M4*F83005.5	0,00 g
B.oun1*F83005.5	1,40 defg	O.M6*A17	0,00 g
J15*A17	1,40 defg	O.M6*F83005.5	0,00 g
O.Mn10*A17	1,40 defg	O.Mn10*F83005.5	0,00 g
O.Mn13*F83005.5	1,25 efg	O.Mn11*A17	0,00 g
10.23/R29*F83005.5	1,20 efg	O.Mn11*F83005.5	0,00 g
B.oun4*F83005.5	1,20 efg	O.Mn12*F83005.5	0,00 g
B4*A17	1,20 efg	témoin*A17	0,00 g
H2*F83005.5	1,20 efg	témoin*F83005.5	0,00 g



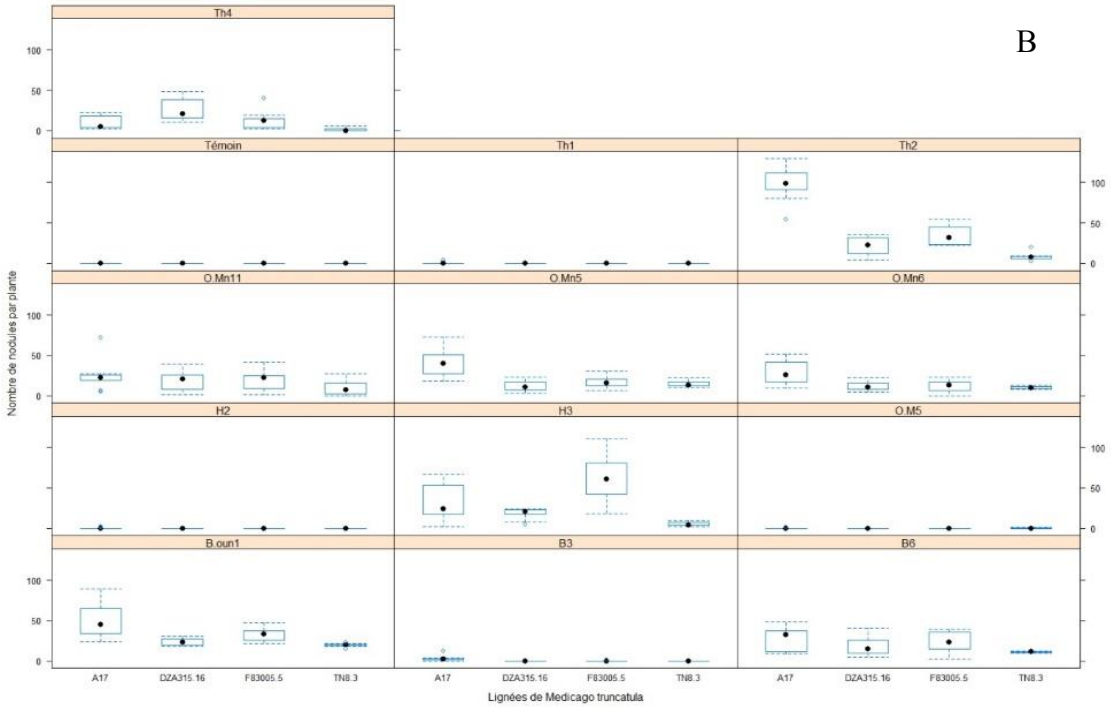


Figure 21. Nodulation des accessions de *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4).

Les nodules ont été comptés après 8 semaines de culture. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes, dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat. **A** : Box plot montrant la variation du nombre de nodules selon les lignées et l'isolat de Rhizobium inoculé dans l'essai sous serre. **B** : Box plot montrant la variation du nombre de nodules selon les lignées et l'isolat de Rhizobium inoculé dans l'essai en phytotron.

Quand elle est inoculée à des plantes de la lignée A17, La souche RCR2011 est celle qui nodule le mieux avec en moyenne 6,2 nodules par plante suivie par l'isolat B.oun2 avec 5,8 nodules par plante et de H3 avec 5,6 nodules par plante, tous les trois chez la lignée A17 (**Figure 20**).

L'analyse ANOVA (**Annexe 1**) montre des différences hautement significatives entre les lignées avec une p-value de $2e^{-16}$, entre les isolats de Rhizobium avec une p-value de 2^{e-16}, ainsi qu'une interaction très significative entre les lignées de *M. truncatula* et les isolats de Rhizobium, avec une p-value de $2{,}85e^{-8}$.

Le **tableau 7** montre les groupes de moyennes calculés en utilisant le test de Student-Newman-Keuls (SNK). En tête, vient la combinaison RCR2011/A17, suivi de B.oun2*A17 et H3*A17 et H2*A17. Le dernier groupe contient les combinaisons n'ayant montrées aucun nodule sur les racines.

En conclusion, on remarque que la lignée A17 nodule mieux que F83005.5.

2. Effet de douze isolats de rhizobiums sur la croissance et le développement des plantes en pot, en serre et en phytotron

Afin de mieux identifier les isolats de rhizobium qui nodulent le mieux *M. truncatula,* il a été choisi 12 isolats (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4) provenant des six différentes stations d'échantillonnage (Sidi Ali Ben Aoun, Sidi Bouzid, Bir el Haffey, Oued Miou, Ouled Mnasser et Thélepte). Les douze isolats ont été testés sur quatre lignées différentes de *M. truncatula* qui sont A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3. Deux isolats de rhizobiums, B3 et O.Mn11, parmi ces douze, n'ont pas montré de nodules *in vitro* sur une ou les deux lignées A17 (O.Mn11) et F83005.5 (B3 et O.Mn11) (**Figure 21**).

2. 1. La nodulation de quatre lignées de M. truncatula est très affectée par l'interaction du génotype et de l'isolat

Douze isolats de Rhizobium de différents sites d'isolement ont été testés pour leur efficacité symbiotique et leurs effets sur la croissance et le développement de 4 lignées différentes de *M. truncatula*. La première expérience a été réalisée sous serre, alors que la deuxième a été réalisée au phytotron (**Figure 21**). Le nombre moyens de nodules comptés sur les plantes ayant poussées sous serre varie entre 0 (pour toutes les plantes témoins ainsi que 6 autres combinaisons avec des rhizobiums) et 54,33 (pour les plantes de la lignée A17 inoculées avec

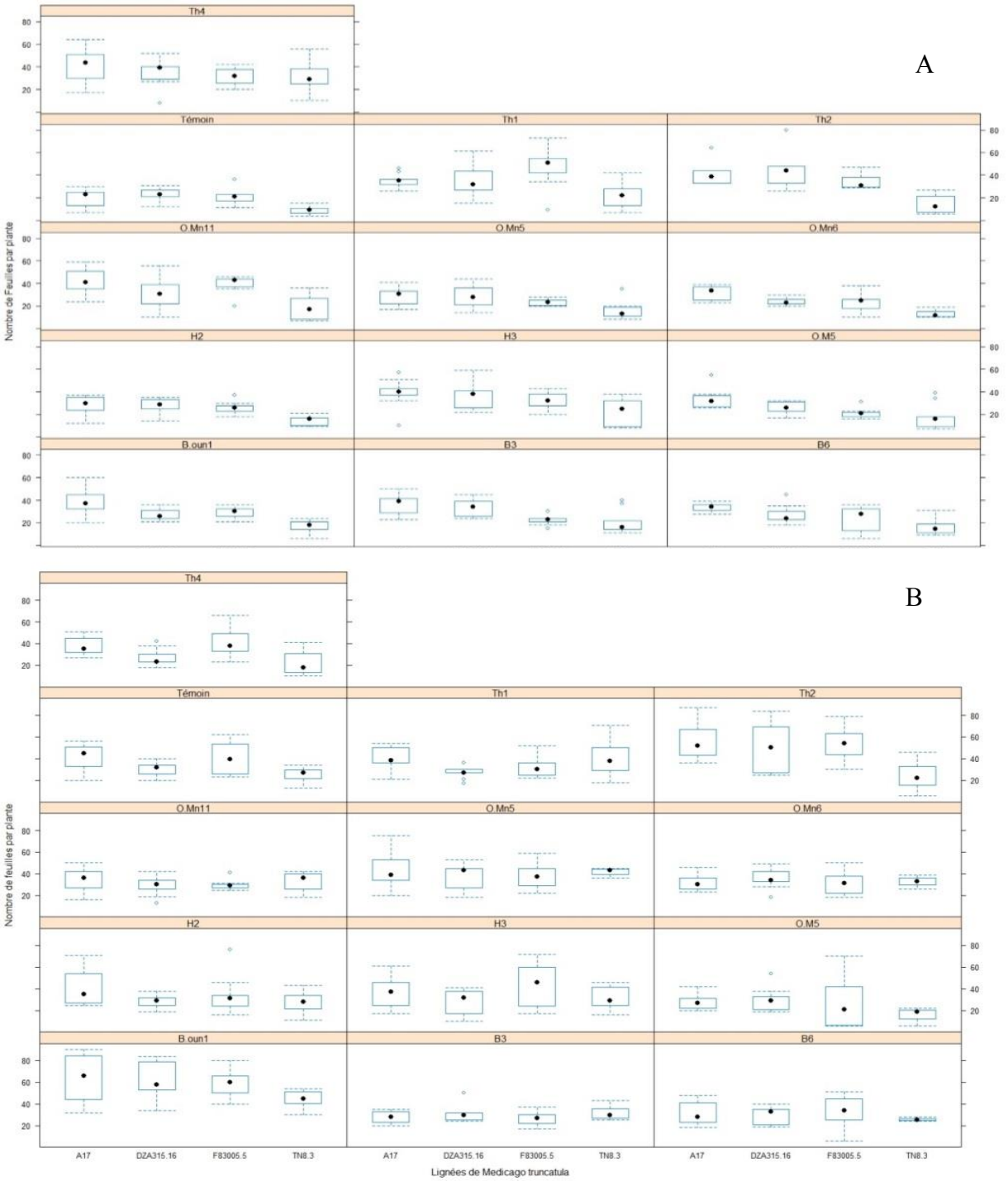


Figure 22. Production de feuilles des accessions de *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4).

Les feuilles ont été comptées après 8 semaines de culture. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat. **A** : Box plot montrant la variation du nombre de feuilles selon les lignées et l'isolat de Rhizobium inoculé dans l'essai sous serre. **B** : Box plot montrant la variation du nombre de feuilles selon les lignées et l'isolat de Rhizobium inoculé dans l'essai en phytotron.

l'isolat de Rhizobium H3), et entre 0 (pour toutes les plantes témoins ainsi que 10 autres combinaisons avec des rhizobiums) et 98,89 (pour les plantes de la lignée A17 inoculées avec l'isolat de Rhizobium Th2) en phytotron.

L'analyse de la variance ANOVA sans les témoins présente dans les deux essais des différences hautement significatives (**Annexe 2 et 3**). Une différence hautement significative entre les quatre lignées de *M. truncatula* avec une p-value de $2e^{-16}$, entre les douze isolats de Rhizobium avec une p-value de $2e^{-16}$, ainsi qu'une forte interaction (p-value de $2e^{-16)}$ entre les lignées de *M. truncatula* et les rhizobiums.

Les témoins, ainsi que plusieurs plantes inoculées, n'ont pas formé de nodules (**Annexe 4**). Dans l'essai sous serre, en plus des témoins, il a été remarqué que les isolats B.oun1 et O.Mn5 ne nodulent pas la lignée F83005.5, alors qu'ils la nodulent en phytotron. Les isolats O.Mn11, O.Mn6, H2 et B6 ne montrent pas de nodules quand ils sont inoculés à TN8.3 sous serre. Dans l'essai en phytotron, les deux isolats Th1 et H2 ne présentent pas de nodules avec aucune des lignées F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 et moins d'un seul nodule sur A17. L'isolat O.M5 ne nodulent ni F83005.5, ni DZA315.16 et l'isolat B3 ne nodule pas DZA315.16 et TN8.3.

Le comptage des nodules a montré que, de façon générale, la lignée A17 présente souvent le nombre de nodules le plus élevé. Le plus grand nombre de nodules a été trouvé dans l'essai au phytotron.

En raison des différences de résultats entre l'essai *in vitro*, l'essai en serre et l'essai au phytotron, il n'est pas possible de conclure que les isolats qui n'ont pas nodulé dans l'un des essais ne sont pas capables de noduler les lignées en question. Parmi tous les isolats testés, aucun isolat n'a montré une incapacité absolue à noduler. Ce résultat pourrait être dû à des erreurs lors de l'expérience ou à des changements dans les conditions de culture des rhizobiums.

2. 2. Le nombre de feuilles sur les plantes inoculées en phytotron est plus élevé que sur les plantes inoculées en serre

Le nombre de feuilles produites par les plantes de *M. truncatula* inoculées avec Rhizobium permet d'évaluer l'effet de la symbiose avec ces douze isolats (**Figure 22**). Le nombre moyen de feuilles produites par les plantes de *M. truncatula* est très différent entre la culture en serre et la culture en phytotron (**Annexe 7**).

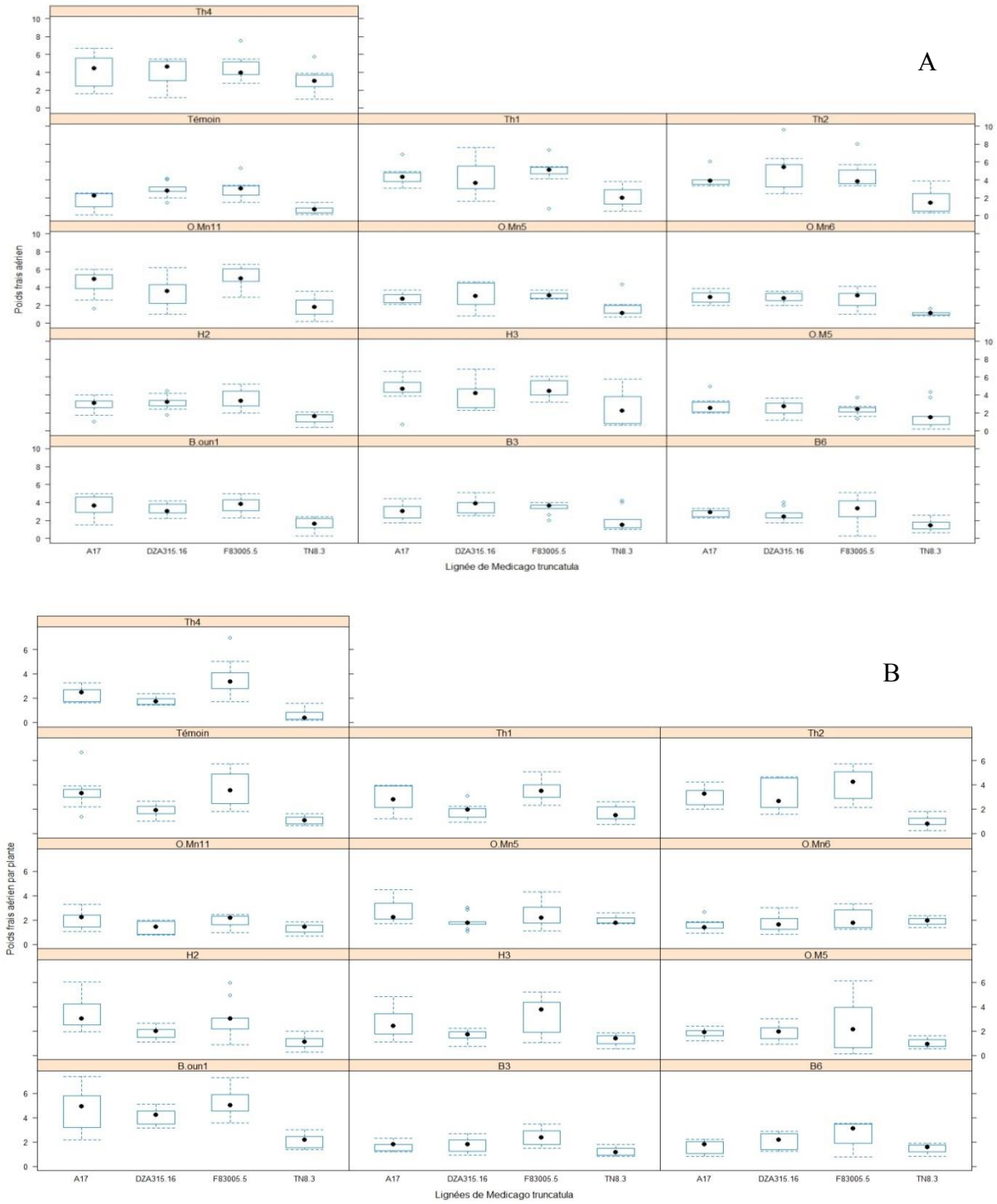


Figure 23. Production de biomasse aérienne de *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4).

Les parties aériennes ont été pesées après 8 semaines de culture. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat. **A** : Box plot montrant la variation du poids frais aérien selon les lignées et l'isolat de Rhizobium inoculé dans l'essai sous serre. **B** : Box plot montrant la variation du poids frais aérien selon les lignées et l'isolat de Rhizobium inoculé dans l'essai en phytotron.

Chez les plantes cultivées en serre, le nombre moyen de feuilles produites varie entre 8,88 feuilles par plantes chez les témoins TN8.3 et 46,89 feuilles par plantes chez les F83005.5 inoculées avec Th1. Chez les plantes cultivées en phytotron, le nombre moyen de feuilles est en général plus élevé et varie entre 15,67 chez les TN.3 inoculées par O.M5 et 63,88 chez les A17 inoculées par B.oun1.

Le nombre maximal de feuilles produites par chaque lignée est toujours plus élevé au phytotron qu'en serre : il est de 63,88 chez A17 en phytotron contre 42,11 en serre, 60,22 chez F83005.3 en phytotron contre 46,89 en serre, 61,33 chez DZA315.16 en phytotron contre 44 en serre et 44,57 chez TN8.3 en phytotron contre 32,44 en serre. Le nombre minimal de feuilles produites par chaque lignée est toujours plus élevé au phytotron qu'en serre. Ceci pourrait être dû aux conditions plus stables en phytotron qu'en serre.

L'essai sous serre a aussi montré que l'inoculation des plantes avec des isolats de rhizobium a donné des effets positifs sur la production de feuilles. Il est à noter que pour les quatre lignées utilisées, le nombre de feuilles dénombrés chez les plantes témoins est toujours inférieur à celui chez les plantes inoculées. Or, ce résultat n'a pas été démontré dans l'essai au phytotron.

Une analyse de la variance (**Annexe 5 et 6**) a montré une différence hautement significative entre l'effet des douze isolats de Rhizobium ainsi que les plantes témoins avec une p-value de $2e^{-16}$ dans les deux essais, une différence hautement significative entre les quatre lignées de *M. truncatula* avec une p-value de $2e^{-16}$ dans l'essai en serre et de $1{,}28e^{-5}$ dans l'essai au phytotron. L'interaction entre les lignées de *M. truncatula* et les isolats de Rhizobium est significative (p-value =0,0153) dans l'essai au phytotron et très significative (0,00377) dans l'essai en serre.

2. 3. Effet de la symbiose sur la biomasse aérienne fraîche

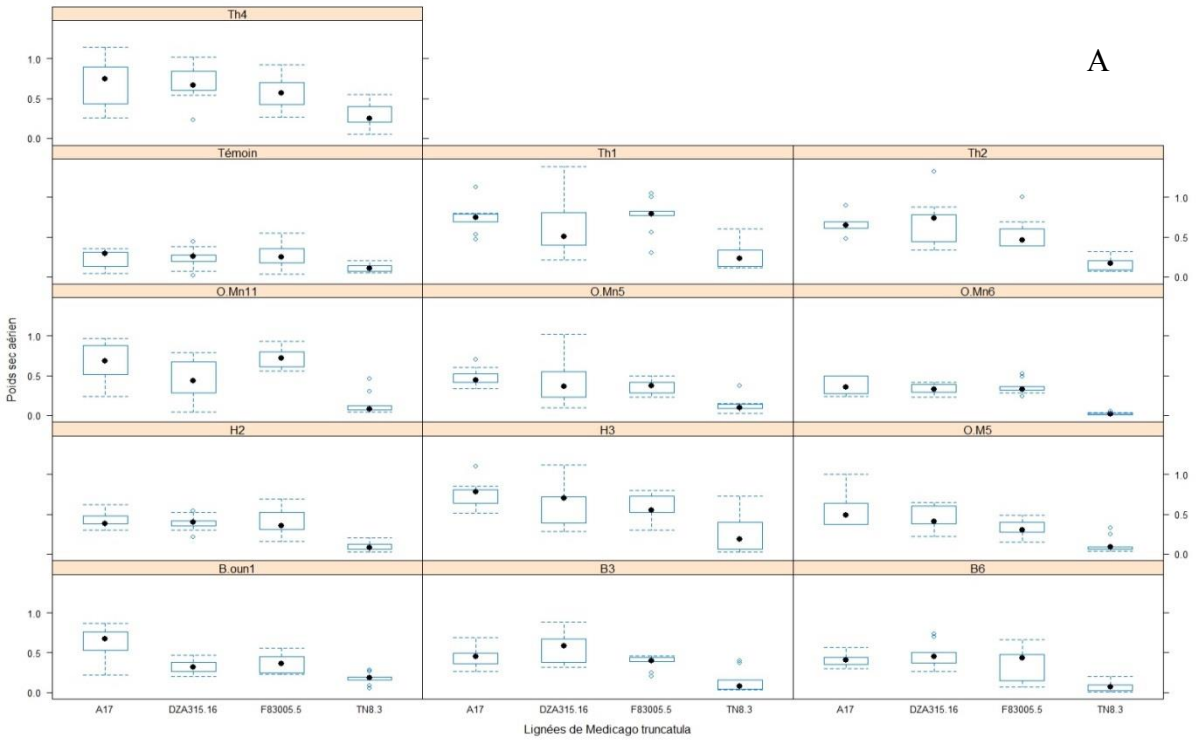
A la récolte, les parties aériennes de toutes les plantes ont été séparées des racines et pesés afin d'évaluer la biomasse aérienne fraîche et ainsi de voir l'effet de la symbiose sur la croissance des plantes de *M. truncatula*. Des box plot sont établis et montrent ainsi des différences remarquables entre l'effet des rhizobiums et en les comparant avec les témoins au niveau de la biomasse des plantes (**Figure 23**). Néanmoins, l'analyse de la variance (**Annexe 8 et 9**) montre une interaction isolat*génotype dans le cas où les plantes ont poussé au phytotron (p-value= $1{,}86e^{-5}$), cette interaction n'existe pas dans l'essai sous serre (p-value=0,251). La même analyse ANOVA montre des différences hautement significatives

Tableau 8. Production biomasse aérienne fraîche de 4 lignées de *Medicago truncatula* inoculées avec 12 isolats de Rhizobium de Tunisie cultivées en serre et au phytotron.
Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK). Les lignées, les isolats et les combinaisons Isolat*Lignée avec la même lettre sont dans le même groupe.

Essai sous serre	
Lignée de *M. truncatula*	**Moyenne du poids frais aérien**
F83005.5	3,71 a
DZA315.16	3,45 a
A17	3,37 a
TN8.3	1,76 b
Isolat de Rhizobium	**Moyenne du poids frais aérien**
H3	3,95 a
Th4	3,89 a
Th2	3,88 a
Th1	3,85 a
O.Mn11	3,70 a
B.oun1	3,03 b
B3	3,02 b
H2	2,72 bc
O.Mn5	2,62 bc
B6	2,56 bc
O.Mn6	2,40 bc
O.M5	2,35 bc
Témoin	2,10 c

Essai au phytotron	
Isolat*Lignée	**Moyenne du poids frais aérien**
B.oun1*F83005.5	5,23 a
B.oun1*A17	4,67 ab
B.oun1*DZA315.16	4,05 bc
Th2*F83005.5	4,03 bc
Témoin*F83005.5	3,66 bcd
Th4*F83005.5	3,62 bcde
Th1*F83005.5	3,49 bcdef
H2*A17	3,46 bcdef
Témoin*A17	3,41 bcdefg
H3*F83005.5	3,32 bcdefgh
Th2*DZA315.16	3,16 bcdefghi
Th2*A17	3,13 bcdefghij
H2*F83005.5	3 cdefghijk
Th1*A17	2,84 cdefghijkl
H3*A17	2,7 cdefghijklm
O.Mn5*A17	2,69 cdefghijklm
B6*F83005.5	2,58 cdefghijklm
O.M5*F83005.5	2,46 cdefghijklmn
O.Mn5*F83005.5	2,44 cdefghijklmn
B3*F83005.5	2,39 cdefghijklmn
Th4*A17	2,36 cdefghijklmn
O.Mn11*A17	2,12 defghijklmn
O.Mn6*F83005.5	2,07 defghijklmn
B.oun1*TN8.3	2,07 defghijklmn
O.Mn5*TN8.3	2,03 defghijklmn
B6*DZA315.16	2,02 defghijklmn
O.Mn11*F83005.5	1,92 defghijklmn
O.M5*DZA315.16	1,89 efghijklmn
O.Mn6*TN8.3	1,88 efghijklmn
H2*DZA315.16	1,88 efghijklmn
O.Mn5*DZA315.16	1,87 efghijklmn
O.M5*A17	1,84 efghijklmn
Témoin*DZA315.16	1,84 efghijklmn

O.Mn6*DZA315.16	1,81 fghijklmn
Th1*DZA315.16	1,79 fghijklmn
B3*DZA315.16	1,75 fghijklmn
Th4*DZA315.16	1,74 fghijklmn
B3*A17	1,66 fghijklmn
H3*DZA315.16	1,61 ghijklmn
Th1*TN8.3	1,61 ghijklmn
B6*A17	1,58 ghijklmn
O.Mn6*A17	1,55 hijklmn
B6*TN8.3	1,43 ijklmn
O.Mn11*DZA315.16	1,39 ijklmn
O.Mn11*TN8.3	1,31 ijklmn
H3*TN8.3	1,28 jklmn
B3*TN8.3	1,21 klmn
H2*TN8.3	1,09 lmn
Témoin*TN8.3	1,07 lmn
O.M5*TN8.3	1,03 lmn
Th2*TN8.3	0,94 mn
Th4*TN8.3	0,62 n



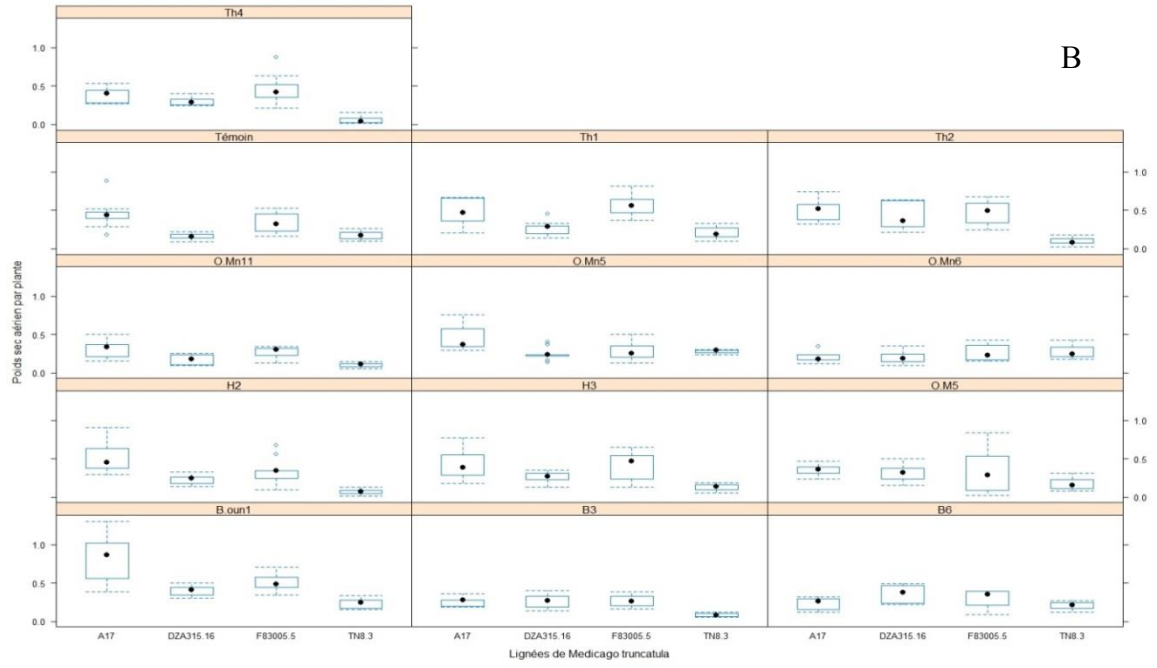


Figure 24. Production de biomasse aérienne de *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4).

Les parties aériennes ont été séchées puis pesées après 8 semaines de culture. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat. **A** : Box plot montrant la variation du poids sec aérien selon les lignées et l'isolat de Rhizobium inoculé dans l'essai sous serre. **B** : Box plot montrant la variation du poids sec aérien selon les lignées et l'isolat de Rhizobium inoculé dans l'essai en phytotron.

entre l'effet des isolats de Rhizobium (p-value=$2e^{-16}$) ainsi qu'entre les quatre génotypes de *M. truncatula* (p-value=$2e^{-16}$) dans les deux essais.

Dans le cas de l'essai sous serre, le test SNK place les trois lignées de *M. truncatula* A17, F83005.5 et DZA315.16 dans un même groupe de moyennes et la lignée TN8.3 dans un autre groupe avec une moyenne de poids frais aérien de 1,76g/plante. Les isolats de Rhizobium sont alors classés selon quatre groupes de moyennes différents ; le premier contient les isolats H3 (avec une moyenne de biomasse fraîche aérienne de 3,95g/plante), Th4, Th2, Th1 et O.Mn11, le deuxième contient B.oun1 et B3, le troisième H2, O.Mn5, B6, O.Mn6 et O.M5 et le dernier contient les témoins avec une moyenne de poids frais aérien de 2,10g/plante. L'inoculation du rhizobium H3 a donc augmenté la biomasse aérienne d'environ 2 fois la biomasse aérienne des plantes témoins (**Tableau 8**).

Dans le cas de l'essai au phytotron où l'interaction entre les isolats de Rhizobium et le génotype de *M. truncatula* est bien présente, les groupes de moyennes sont classées selon les combinaisons isolat*génotype (**Tableau 8**). L'isolat de Rhizobium B.oun1 présente les biomasses les plus élevées quand il est inoculé à F83005.5 (5,23g/plante), A17 (4,67g/plante) et DZA315.16 (4,05g/plante). L'inoculation n'a pas montré un effet significatif sur la biomasse aérienne fraîche.

2. 4. Effet de la symbiose sur la biomasse aérienne sèche

Les résultats de l'essai sous serre montrent que les plantes qui présentent les biomasses aériennes sèches les plus basses sont toutes les plantes de TN8.3 indépendamment de l'isolat de Rhizobium inoculé, ainsi que tous les témoins de toutes les lignées (**Figure 24**). Le poids sec aérien des plantes de la lignée TN8.3 cultivées en serre est compris entre 0,02 et 0,3 g/plante (**Annexe 12**), sachant que le poids sec aérien le plus élevé en serre est de 0,77 pour les plantes de F83005.5 inoculées avec Th1.

En ce qui concerne l'essai en serre, en plus des plantes témoins, toutes les plantes inoculées de la lignée TN8.3 présentent les valeurs de biomasse aérienne sèche les plus basses. Les plantes de la lignée TN8.3 inoculées avec H2, B6, et O.Mn6 se placent même derrière les plantes témoins de la même lignée. Ces trois isolats de rhizobium stimulent très peu le développement des parties aériennes des plantes de la lignée TN8.3. Contrairement à TN8.3, il est à noter que les biomasses sèches aériennes des plantes témoins des lignées A17, F83005.5 et DZA315.16 sont plus faibles que les biomasses sèches aériennes de toutes leurs plantes inoculées respectifs.

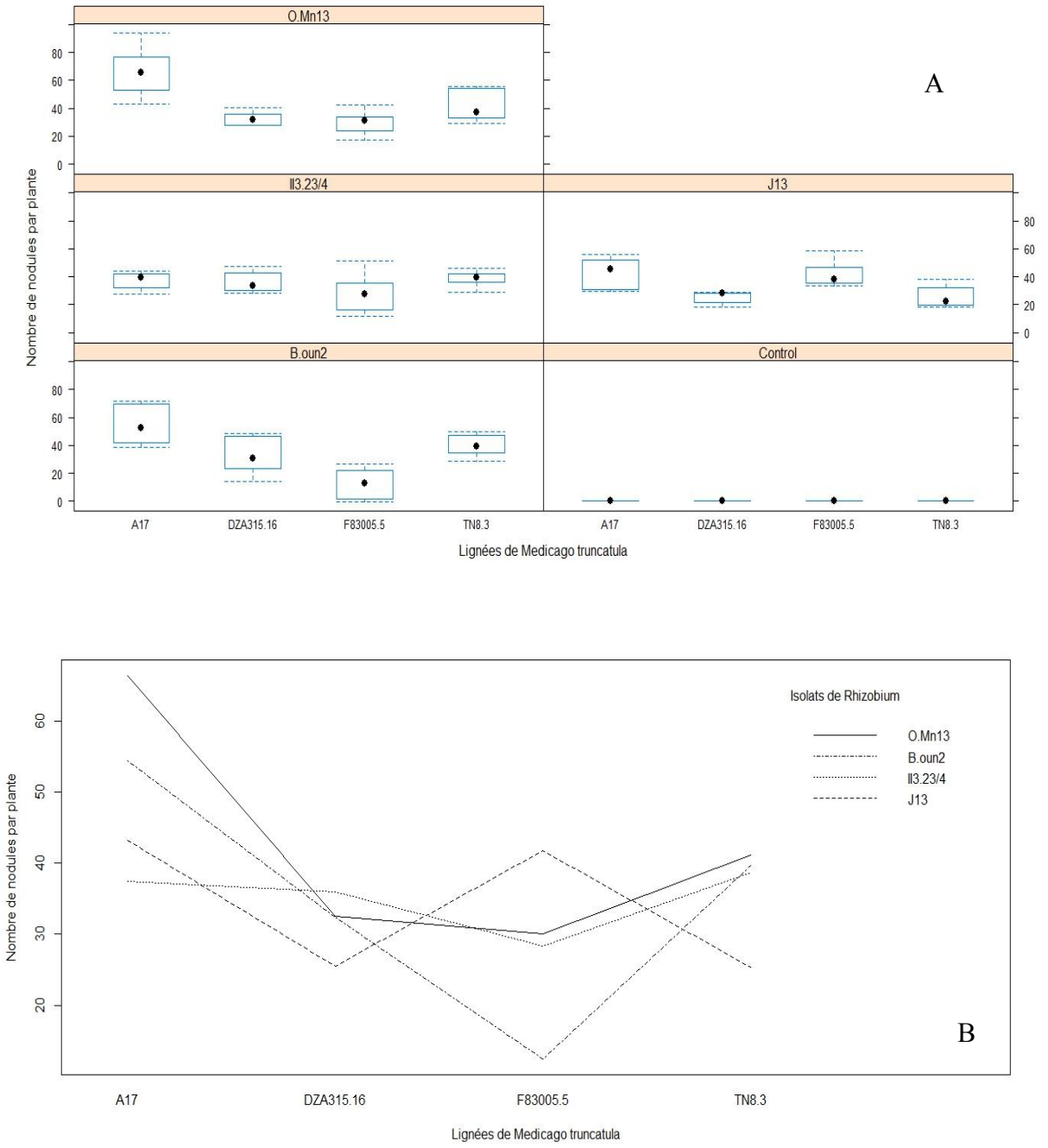


Figure 25. Nodulation des accessions de *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13).

Les nodules ont été comptés après 8 semaines de culture. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison lignée*isolat (3 plantes par pot) dans chaque expérience. **A** : Box plot montrant la variation du nombre de nodules selon les lignées et l'isolat de Rhizobium inoculé. **B** : Diagramme d'interaction montrant l'interaction entre les lignées et les isolats de Rhizobium.

Concernant l'essai au phytotron, la biomasse aérienne sèche des plantes témoins étant plus faible que les plantes inoculées, seule la lignée DZA315.16 montre donc un effet significatif de l'inoculation. Lors de cet essai, la valeur moyenne du poids sec aérien varie entre 0,06 (dans le cas des plantes de TN8.3 inoculées avec Th4) et 0,82 (dans le cas des plantes d'A17 inoculées avec B.oun1).

L'analyse de la variance (**Annexe 10 et 11**) montre des différences hautement significatives entre les lignées de *M. truncatula* et entre les isolats de Rhizobium pour les deux essais, avec une p-value de $2e^{-16}$. Une interaction significative entre les rhizobiums et les lignées de *M. truncatula* est aussi présente, avec une p-value de 0,00208 dans le cas de l'essai en serre et de $8,86e^{-12}$ pour l'essai au phytotron.

3. Effet symbiotique de quatre isolats de Rhizobium tunisiens sur quatre accessions de *Medicago truncatula*

Les expériences décrites ci-dessus ont montré des différences importantes entre les deux essais de nodulation en serre et phytotron. De plus, la durée de chaque essai et le nombre de plantes et isolats utilisées n'étaient pas compatibles avec l'alternance des périodes en Tunisie et en France. Il a donc été décidé de restreindre le nombre d'isolats, en gardant les quatre lignées de *M. truncatula*. Deux expériences indépendantes ont pu être réalisées dans ces conditions, ce qui permettait aussi de faire des analyses statistiques plus solides.

Quatre isolats issus de différents sites d'échantillonnage ont donc été sélectionnés pour ces essais en pots dans un phytotron. B.oun2, J13 et II3.23/4 ont montré une forte activité de solubilisation du phosphate *in vitro,* alors qu'O.Mn13 n'a pas été capable de solubiliser le phosphate lors de l'essai *in vitro*.

3. 1. L'inoculation de quatre lignées de Medicago truncatula par différents isolats de Rhizobium montre une forte interaction du génotype et de l'isolat sur la nodulation.

Des différences significatives dans le nombre de nodules ont été observées pour les différentes combinaisons de lignées et d'isolats (**Figure 25, Tableau 9**). Le nombre maximum de nodules a été obtenu pour O.Mn13 inoculé sur la lignée A17 (valeur moyenne 66,39 nodules par plante), suivi de B.oun2 inoculé sur la même lignée (valeur moyenne 54,45 nodules par plante) et du minimum pour B.oun2 inoculé sur la lignée F83005.5 (valeur moyenne 12,45 nodules par plante). Aucune des plantes des quatre lignées de *M. truncatula* non inoculées ne présentait de nodules.

Tableau 9. Nombre de nodules sur des racines de *M. truncatula* inoculées avec des isolats de Rhizobium de Tunisie.
Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison isolat/lignée (3 plantes par pot) dans chaque expérience. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK). Les combinaisons Isolat*Lignée avec la même lettre sont dans le même groupe.

Isolat*lignée	Moyenne de nombre de nodules
O.Mn13*A17	66,39 a
B.oun2*A17	54,45 ab
J13*A17	43,28 bc
J13*F83005.5	41,73 bc
O.Mn1*TN8.3	41,14 bc
B.oun2*TN8.3	39,67 bc
II3.23/4*TN8.3	38,62 bc
II3.23/4*A17	37,45 bc
II3.23/4*DZA315.16	36,01 bc
O.Mn13*DZA315.16	32,56 c
B.oun2*DZA315.16	32,34 c
O.Mn13*F83005.5	30,06 c
II3.23/4*F83005.5	28,39 cd
J13*DZA315.16	25,56 cd
J13*TN8.3	25,39 cd
B.oun2*F83005.5	12,45 d

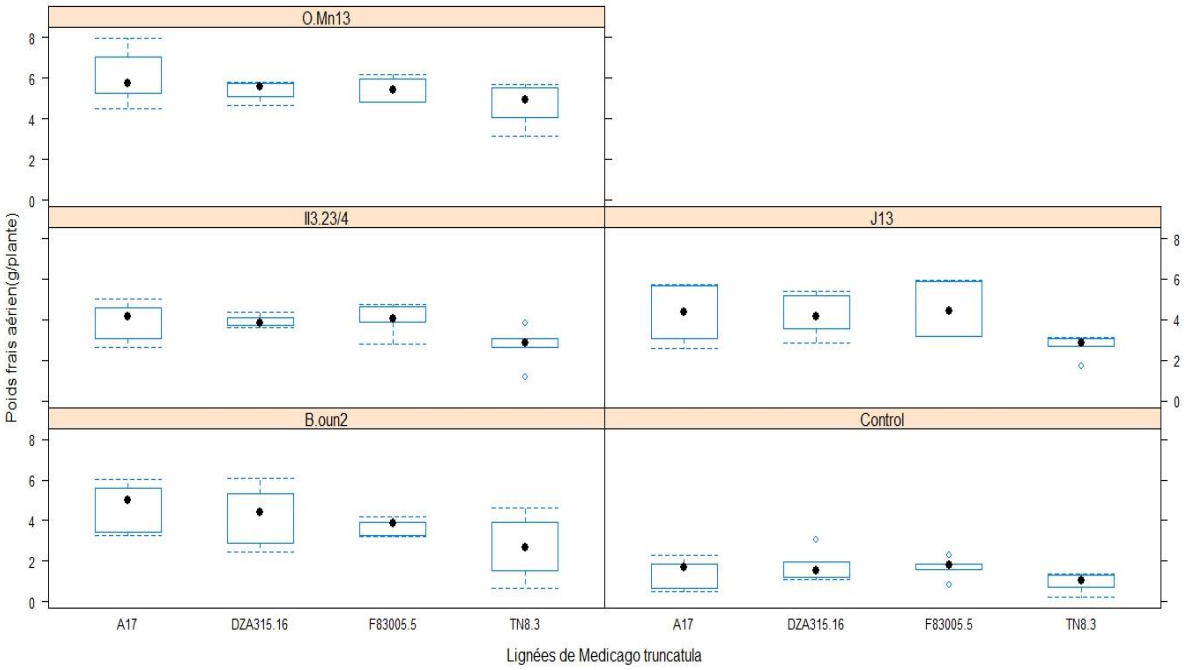


Figure 26. Biomasse aérienne fraîche des accessions *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13).
Le contrôle est constitué de plantes non inoculées. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison lignée*isolat (3 plantes par pot) dans chaque expérience.

L'analyse statistique par ANOVA (**Annexe 13**) montre une variabilité extrêmement élevée de la nodulation avec une p-value de $5{,}15e^{-10}$ pour l'effet de la lignée, une p-value de 0,0204 pour l'effet des isolats de rhizobium et de $4{,}28e^{-6}$ pour l'interaction lignée*isolat. Cette interaction est également visible dans la **Figure 25B**.

Le diagramme d'interaction montre la tendance de la variation du nombre de nodules en fonction de la lignée de *M. truncatula* utilisée et l'isolat de Rhizobium inoculé. Il est à noter que trois isolats (O.Mn13, B.oun2 et II3.23/R29) montrent une baisse du nombre de nodules quand ils sont inoculés aux plantes de la lignée F83005.5, sauf pour le cas de J13 où les plantes de F83005.5 ont environ le plus grand nombre de nodules, avec celles de A17, occupant ainsi le même groupe de moyennes.

3. 2. L'inoculation de quatre lignées de Medicago truncatula par différents isolats de Rhizobium augmente le poids des parties aériennes.

a. Biomasse aérienne fraîche

L'état des plantes à la récolte (après 2 mois de culture) montre une nette différence entre les plantes témoins et les plantes symbiosées. La **Figure 28** montre 5 plateaux, chaque plateau contenant 9 pots répartis en 3 pots pour chaque lignée de *M. truncatula* utilisée pour ce test. Sur la figure, On note que toutes les plantes du plateau témoin sont jaunes et de petites taille et que l'inoculation des rhizobiums a amélioré la croissance et la couleur des feuilles.

C'est pour cette raison que la biomasse aérienne à l'état frais a été évaluée. La **Figure 26** confirme les constatations. Le poids frais aérien des plantes inoculées est nettement plus élevé que celui des plantes témoins.

L'analyse de la variance de toutes les plantes (**Annexe 14**) montre un effet rhizobium très significatif (p-value=$2e^{-16}$), ainsi qu'un effet lignée (p-value=$5{,}15e^{-7}$) mais pas d'interaction Rhizobium*génotype. Le test de Newman Keuls montre 2 groupes de moyennes dans les lignées A17 (4,09 g/plante), DZA315.16 (3,91 g/plante) et F83005.5 (3,89 g/plante) d'un côté et TN.8.3 (2,76 g/plante) d'un autre côté. Les Rhizobium sont classés en 3 groupes ; O.Mn13 dans le premier groupe avec 5,40 g/plante, J13 (3,94 g/plante), B.oun2 (3,85 g/plante) et II3.23/4 (3,65 g/plante) dans un deuxième groupe et en fin les plantes non inoculées dans un dernier groupe avec en moyenne 1,46g/plantes.

L'analyse ANOVA des plantes inoculées (sans les plantes témoins) montre la même chose (**Annexe 15)** : Pas d'interaction Rhizobium*Génotype (p-value=0,863), une différence

Tableau 10. Ratios de plantes inoculées/plantes témoins.
Ratios : poids frais aérien (PFA), poids sec aérien (PSA), poids frais racinaire (PFR), poids sec racinaire (PSR), et teneur en azote (N) de *M. truncatula* inoculé avec des isolats de Rhizobium de Tunisie. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison isolat de Rhizobium / lignée (3 plantes par pot) dans chaque expérience.

Isolats de Rhizobium	Ratio PFA	Ratio PSA	Ratio PFR	Ratio PSR	Ratio N
A17					
B.oun2	3,25	1,93	1,00	0,81	2,22
II3.23/4	2,71	1,78	0,56	0,79	2,00
J13	2,96	1,79	0,63	0,82	2,30
O.Mn13	4,15	1,72	1,30	0,86	2,15
DZA315.16					
B.oun2	2,46	1,66	0,84	0,73	1,65
II3.23/4	2,26	1,57	1,06	0,75	1,50
J13	2,44	1,59	1,20	0,74	1,71
O.Mn13	3,13	1,49	0,88	0,75	1,47
F83005.5					
B.oun2	2,19	1,53	0,70	0,70	0,85
II3.23/4	2,37	1,59	0,54	0,67	1,62
J13	2,66	1,60	0,49	0,71	1,68
O.Mn13	3,21	1,51	0,59	0,72	1,80
TN8.3					
B.oun2	2,79	2,18	0,37	0,70	2,12
II3.23/4	2,85	2,34	0,36	0,71	1,83
J13	2,84	2,26	0,77	0,71	1,90
O.Mn13	4,91	3,03	0,89	0,81	1,92

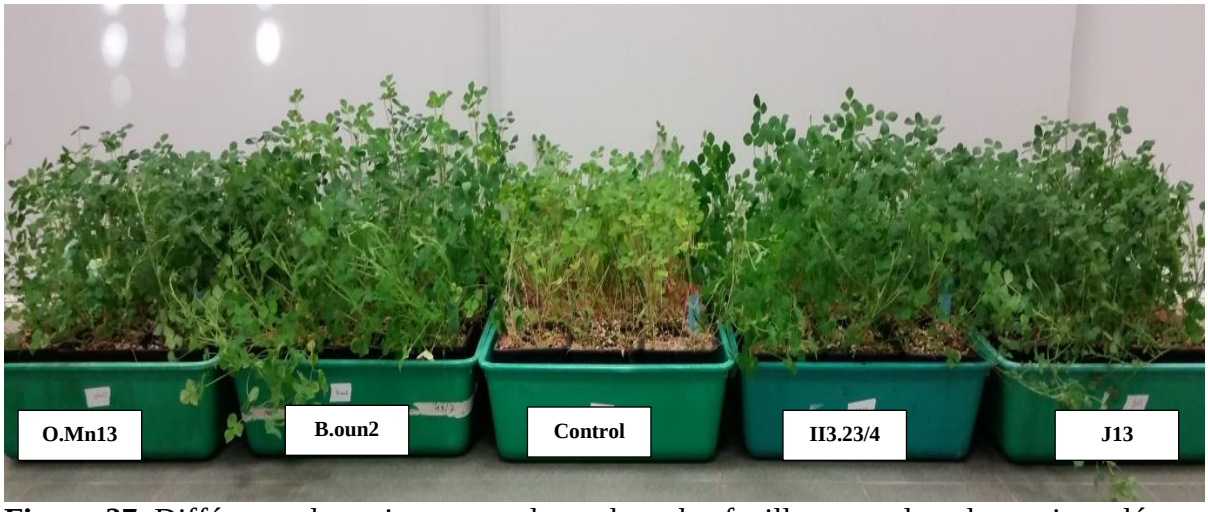


Figure 27. Différence de croissance et de couleur des feuilles entre les plantes inoculées et non inoculées.
Les images montrent des plateaux contenant chacun les 4 génotypes A17, F83005.5, DZA315.16, TN8.3. Les prélèvements ont été faits 2 mois après l'inoculation avec Rhizobium.

hautement significative entre les génotypes de *M. truncatula* (p-value=3,99e^{-06}) ainsi qu'entre l'effet des isolats de rhizobium (p-value=6,23e^{-08}). Le test Newman Keuls montre les mêmes groupes retrouvés en analysant toutes les plantes.

Le **Tableau 10** montre les ratios plantes inoculées/plantes témoins de tous les paramètres étudiés. Le ratio de la biomasse aérienne sèche des plantes inoculées par rapport aux plantes non inoculées indique une différence significative de la stimulation de croissance entre les lignées. Les valeurs de ces ratios montrent que l'inoculation de rhizobium stimule le développement des parties aériennes de toutes les plantes. Les valeurs des ratios montrent une augmentation de biomasse aérienne de 4,91 fois (les plantes de TN8.3 inoculées avec O.Mn13) à 2,19 fois par rapport aux témoins (les plantes de F83005.5 inoculées avec B.oun2).

b. Biomasse aérienne sèche

Compte tenu du grand nombre d'échantillons, la récolte a été faite sur plusieurs jours ce qui pourrait avoir des répercussions sur l'état des plantes à la récolte. Le poids frais peut ne pas donner des résultats exacts. Il a donc été évalué la biomasse des parties aériennes des plantes inoculées et des plantes témoins.

Comme cela a déjà été trouvé pour la biomasse fraîche, la biomasse aérienne sèche des plantes inoculées au rhizobium est constamment plus élevée que celle des témoins non inoculés (**Figure 27**). Le poids sec aérien des plantes témoins varie entre 0,42 g/plante pour la lignée TN8.3 et 0,79 g/plante pour la lignée DZA315.16, alors que le poids sec aérien des plantes symbiosées varie entre 0,92 g/plante pour les plantes de la lignée TN8.3 inoculées par B.oun2 et 1,41 g/plante pour les plantes de la lignée A17 inoculées par le même isolat de rhizobium B.oun2.

L'analyse statistique de la variance du paramètre poids sec aérien sur toutes les plantes (**Annexe 16)** a montré une interaction subsignificative isolat de rhizobium*lignée de *M. truncatula* (p-value = 0,0791), un effet très significatif de *M. truncatula* (p-value=4,57e^{-7}), et un effet Rhizobium très significatif (p-value=2e^{-16}), probablement dû aux faibles valeurs des plantes témoins. Pour cette raison, une analyse ANOVA sur les plantes inoculées a aussi été réalisée.

Le test de Newman Keuls effectué sur la totalité des plantes place les lignées de *M. truncatula* dans deux groupes différents : l'un contenant des plantes des lignées *M. truncatula* A17 (1,2g/plante), DZA315.16 (1,15g/plante) et F83005.5 (1,1g/plante) et le deuxième

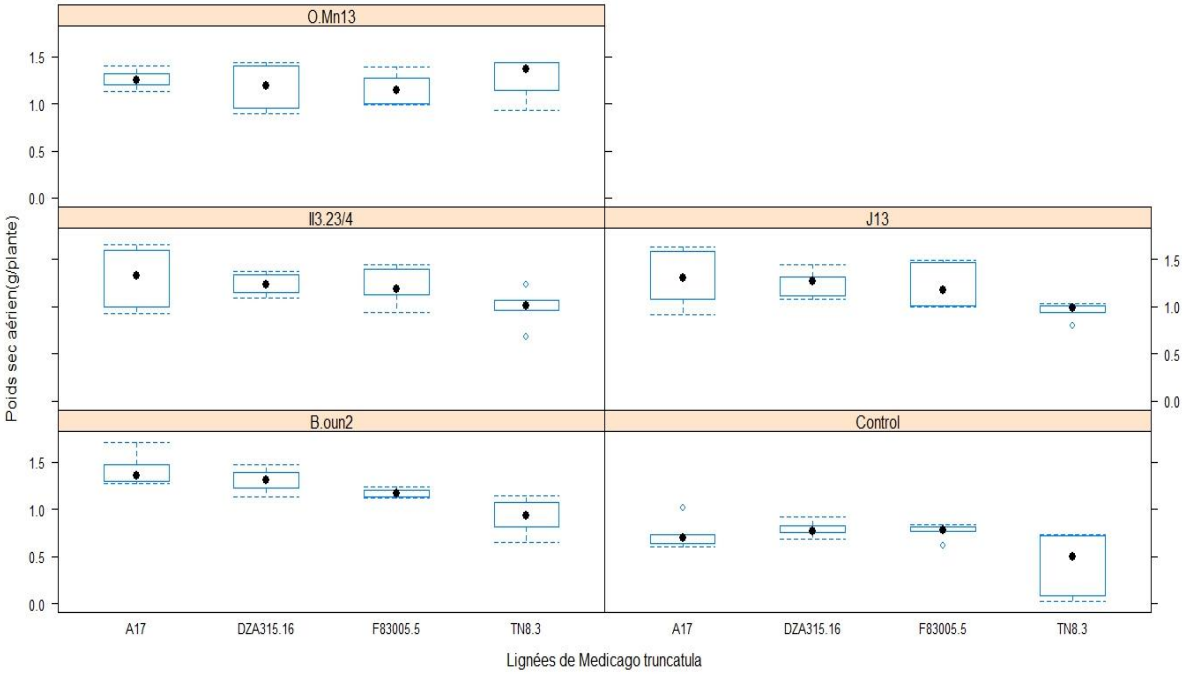


Figure 28. Biomasse sèche des accessions *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13).
Le contrôle est constitué de plantes non inoculées. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison lignée*isolat (3 plantes par pot) dans chaque expérience.

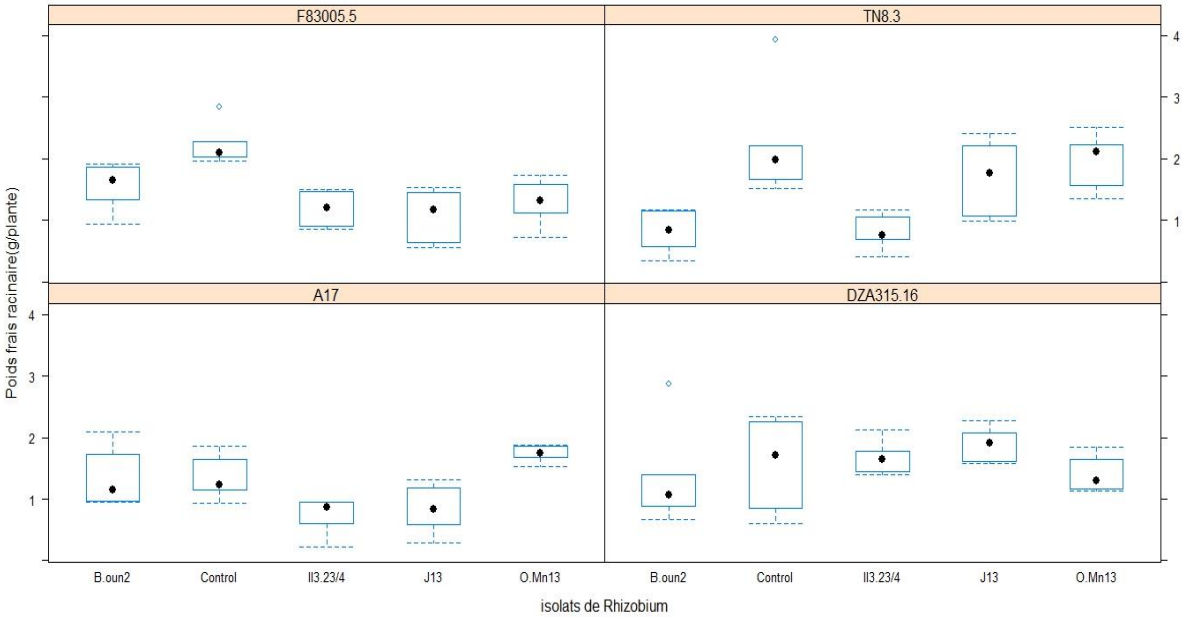


Figure 29. Biomasse fraîche racinaire des accessions *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13).
Le contrôle est constitué de plantes non inoculées. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison lignée*isolat (3 plantes par pot) dans chaque expérience.

contenant les plantes de la lignée TN8.3 *M. truncatula* (0,92 g/plante). En l'appliquant sur les isolats de rhizobium, 2 groupes se distinguent : les plantes non inoculées dans un groupe à part (avec 0,68 g/plante) et toutes les plantes inoculées dans un autre groupe.

L'analyse statistique de la variance du poids sec aérien des plantes inoculées (**Annexe 17**) a montré donc qu'il n'y aucune différence significative entre l'effet des isolats de Rhizobium (p-value = 0,9164) mais un effet très significatif des lignées de *M. truncatula* (p-value=3,15e^{-5}) et une interaction subsignificative (p-value=0,0702) entre les lignées de *M. truncatula* et les isolats de rhizobium.

Le test de Newman Keuls montre alors 2 groupes de moyennes ; le premier contient les lignées A17 (1,32 g/plante), DZA315.16 (1,24 g/plante) et F83005.5 (1,19 g/plante), et le deuxième contient la lignée TN8.3 dont les plantes présentent le poids frais aérien le plus faible avec en moyenne 1,04 g/plante.

Le ratio de la biomasse aérienne sèche des plantes inoculées par rapport aux plantes non inoculées indique également un effet significatif de l'inoculation des rhizobiums sur la stimulation de la croissance. Les valeurs les plus élevées ont été obtenues par la lignée TN8.3, ce qui montre que l'inoculation agit plus efficacement sur cette lignée quel que soit l'isolat de rhizobium utilisé (**Tableau10**). L'augmentation de biomasse aérienne sèche des plantes inoculées par rapport aux plantes témoins est de 1,51 à 1,93 fois pour A17, F83005.5 et DZA315.16.

3. 3. L'inoculation de quatre lignées de Medicago truncatula par différents isolats de Rhizobium diminue le poids de la racine

La symbiose avec les rhizobiums n'a pas seulement augmenté la biomasse aérienne des plantes, mais a également eu des conséquences sur leur développement racinaire.

a. Biomasse racinaire fraîche

Au moment du comptage des nodules, des différences de taille entre les racines ont été remarqués. Cette différence visuelle est confirmée par la pesée des racines à l'état frais. L'inoculation des quatre isolats de rhizobium provenant de différents sites de la Tunisie a induit une diminution constante de la biomasse racinaire pour toutes les plantes (**Figure 29**).

L'ANOVA (**Annexe 18**) montre des différences hautement significatives entre l'effet des rhizobiums (p-value=1,13e^{-06}), entre les génotypes de *M. truncatula* (p-value=0,0117) ainsi

Tableau 11. Biomasse racinaire fraîche de 4 lignées de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium de Tunisie (O.Mn13, J13, B.oun2, II3.23/4).
Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison isolat/lignée (3 plantes par pot) dans chaque expérience. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en incluant les témoins. Les combinaisons lignées*isolats de Rhizobium avec la même lettre sont dans le même groupe.

Isolat de Rhizobium*Lignée	**Poids frais racinaire (g/plante)**
Control*F83005.5	2,22 a
Control*TN8.3	2,22 a
O.Mn13*TN8.3	1,98 ab
J13*DZA315.16	1,90 ab
O.Mn13*A17	1,74 ab
J13*TN8.3	1,70 abc
II3.23/4*DZA315.16	1,68 abc
Control*DZA315.16	1,58 abcd
B.oun2*F83005.5	1,56 abcd
O.Mn13*DZA315.16	1,40 abcd
B.oun2*A17	1,34 bcd
Control*A17	1,34 bcd
B.oun2*DZA315.16	1,32 bcd
O.Mn13*F83005.5	1,30 bcd
II3.23/4*F83005.5	1,19 bcd
J13*F83005.5	1,09 bcd
J13*A17	0,84 cd
B.oun2*TN8.3	0,81 cd
II3.23/4*TN8.3	0,80 cd
II3.23/4*A17	0,74 d

Tableau 12. Biomasse racinaire sèche de 4 lignées de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium de Tunisie (O.Mn13, J13, B.oun2, II3.23/4).
Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison isolat*lignée (3 plantes par pot) dans chaque expérience. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en incluant les témoins. Les isolats de Rhizobium avec la même lettre sont dans le même groupe.

Isolats de Rhizobium	**Poids sec racinaire (g/plante)**
Control	0,92 a
O.Mn13	0,72 b
J13	0,68 b
B.oun2	0,67 b
II3.23/4	0,67 b

qu'entre les différentes combinaisons génotypes*Rhizobium (p-value=1,59e-06). Le test de Newman Keuls montre plusieurs groupes de moyennes. Les plantes non inoculées des lignées F83005.5 et TN8.3 présentent le poids frais racinaires le plus élevé avec 2,22g/plante (Tableau 11).

Les ratios du poids frais racinaire des plantes inoculées/plantes témoins est dans la plupart des cas inférieurs à 1 et varie entre 1,30 et 0,36. Quatre combinaisons seulement (A17*O.Mn13 ; DZA315.16*J13 ; DZA315.16*II3.23/4 et A17*B.oun2) ont un ratio supérieur ou égal à 1. Ces ratios montrent que l'inoculation de rhizobium ne stimule pas la croissance racinaire par rapport aux témoins.

L'analyse de variance des plantes inoculées (**Annexe 19**) montre aussi des différences hautement significatives et le test SNK montre plusieurs groupes (**Annexe 20**), avec en tête la combinaison O.Mn13*TN8.3 avec un poids frais racinaire de 1,98 g/plante.

b. Biomasse racinaire sèche

L'inoculation des quatre isolats de rhizobium provenant de différents sites de la Tunisie a induit une diminution de la biomasse racinaire pour toutes les plantes (**Figure 30**).

Les plantes témoins présentent la biomasse racinaire sèche la plus élevée et les ratios du poids sec aérien des plantes inoculées/les plantes témoins sont inférieurs à 1. Ainsi, à l'inverse des parties aériennes, l'inoculation de rhizobium limite la croissance des racines.

L'analyse de la variance du poids sec des racines montre un effet très significatif (**Annexe 21**) de l'inoculation de rhizobium (p-value=2,65e-11) mais pas d'effet génotype, ni d'interaction lignée*Rhizobium. Cet effet est dû à l'inoculation de rhizobium.

Une analyse ANOVA (**Annexe 22**) et un test de Newman Keuls (**Annexe 23**), sans les plantes témoins, montrent également un effet très significatif de l'inoculation des rhizobiums (p-value = 0,0385). Deux groupes de moyennes (**Tableau 12**) sont identifiés à travers le test SNK : les plantes inoculées avec O.Mn13 dans un groupe (avec 0,72 g/plante) et les plantes inoculées avec les trois autres isolats de rhizobium dans un autre groupe (moyenne PSR entre 0,67 et 0,68g). Aucun effet significatif des lignées de *M. truncatula* ou de l'interaction lignée*isolat n'a été observé.

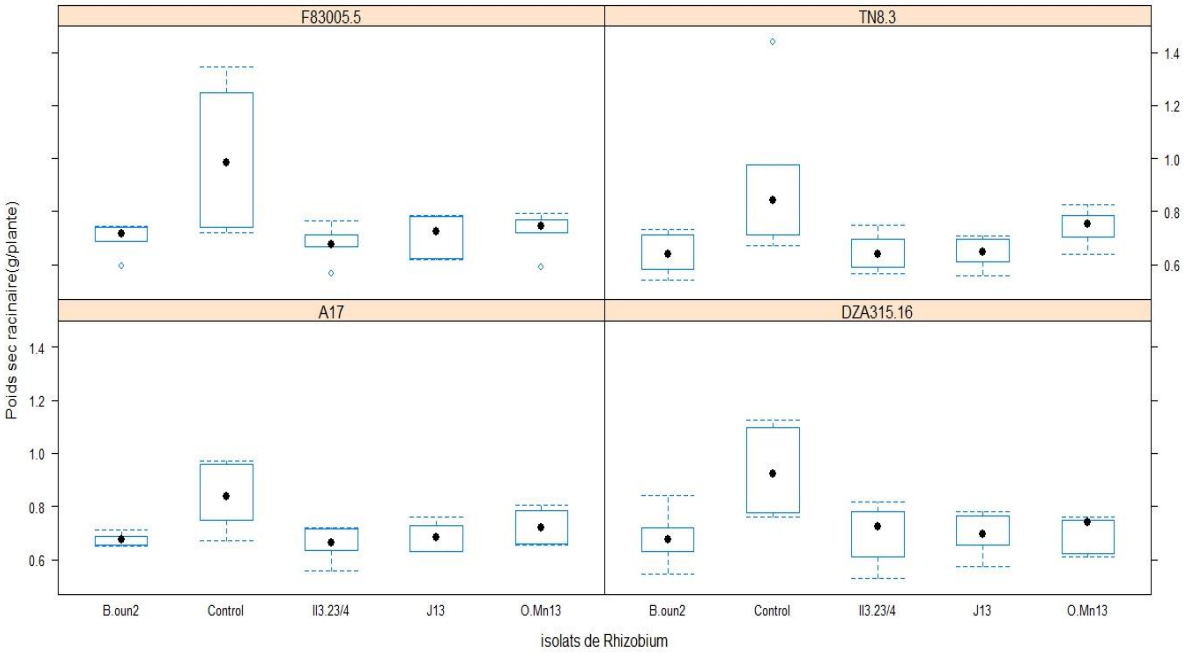


Figure 30. Biomasse sèche racinaire des accessions *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13 ; O.Mn13).
Les plantes témoins n'ont pas été inoculées. Le contrôle est constitué de plantes non inoculées. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison lignée*isolat (3 plantes par pot) dans chaque expérience.

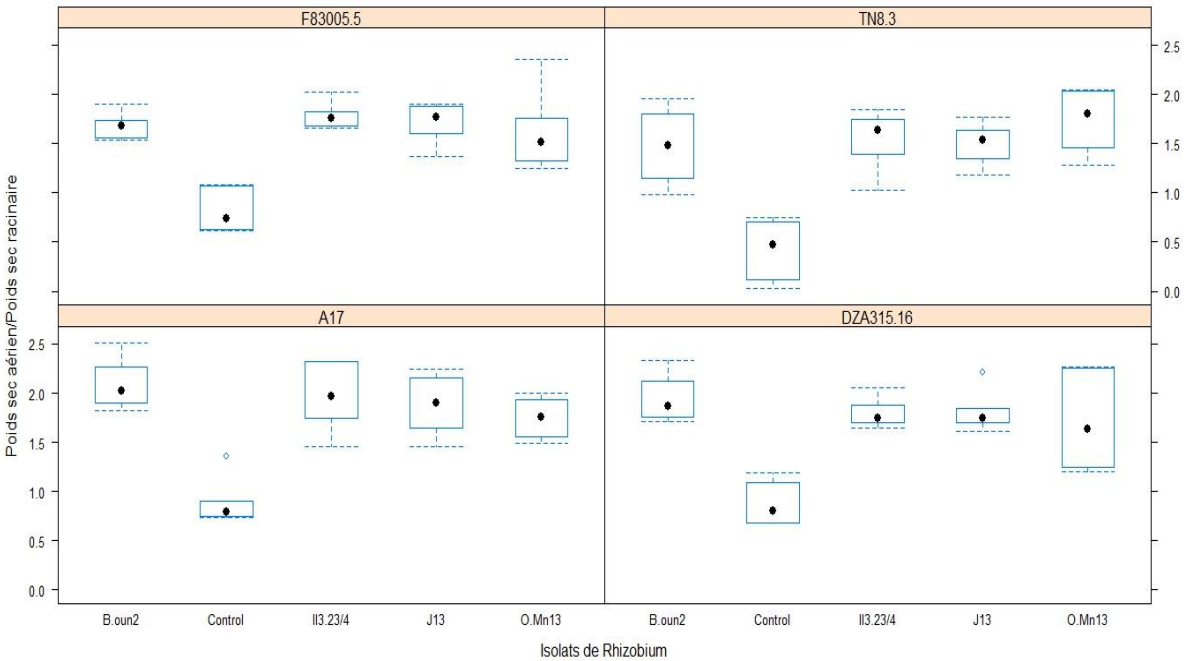


Figure 31. Rapport poids sec aérien sur poids sec racinaire des accessions *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13 ; O.Mn13).
Les plantes témoins n'ont pas été inoculées. Le contrôle est constitué de plantes non inoculées. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison lignée*isolat (3 plantes par pot) dans chaque expérience.

3. 4. Les parties aériennes se développent au dépend des racines sous l'effet de l'inoculation

Compte tenu des résultats précédents, il a été décidé de calculer les ratios biomasse aérienne/biomasse racinaire afin de voir l'effet de l'inoculation de rhizobium sur l'allocation des ressources énergétiques entre les parties aérienne et les parties racinaires chez les quatre lignées de *M. truncatula* utilisées.

Les ratios du poids sec aérien sur le poids sec racinaire sont inférieurs à 1 chez toutes les lignées non-inoculées et deviennent supérieurs à 1 après inoculation avec tous les isolats de rhizobium (**Figure 31**). L'effet est similaire pour les quatre lignées et les quatre isolats et l'analyse ANOVA (**Annexe 24, 25 et 26**) ne montre aucune intéraction génotype*rhizobium pour le paramétre ratio PSA/PSR, mais un effet lignée est démontré avec une p-value égale à $1e^{-5}$, ainsi qu'un effet inoculation avec une p-value supérieure à $2e^{-16}$. Les plantes témoins ont des racines plus développées. Un fort effet des rhizobium sur la croissance des parties aérienne des plantes au détriment de leur croissance racinaire est ainsi observé.

3. 5. La symbiose du rhizobium entraîne une augmentation de la teneur en azote de la plupart des plantes

Comme la fixation de l'azote atmosphérique est la principale caractéristique de la symbiose rhizobienne, la teneur totale en azote a été déterminée à partir des parties aériennes des plantes inoculées et non inoculées. Il apparaît une certaine variabilité entre les génotypes pour les témoins non inoculés, les valeurs moyennes de la teneur en azote variant de 16,94 à 22,22 (‰). L'analyse de leur variance a montré que cette différence n'était pas significative (p-value = 0,277).

La symbiose avec les quatre isolats de Rhizobium a entraîné une augmentation significative de la teneur en azote chez les quatre lignées de *M. truncatula*, sauf pour les plantes de la lignée F83005.5 inoculées avec l'isolat de Rhizobium B.oun2 (**Figure 32**).

L'analyse de variance (**Annexe 27**) a montré un effet très significatif des Rhizobium (p-value = $7{,}76e^{-16}$) et de la lignée (p-value = 0,00736), ainsi qu'une interaction lignée*isolat très significative (p-value = $6{,}59e^{-5}$).

Ainsi, deux groupes de moyennes sont formés : les plantes non inoculées et la lignée F83005.5 inoculée avec B.oun2 dans un groupe et toutes les autres plantes inoculées

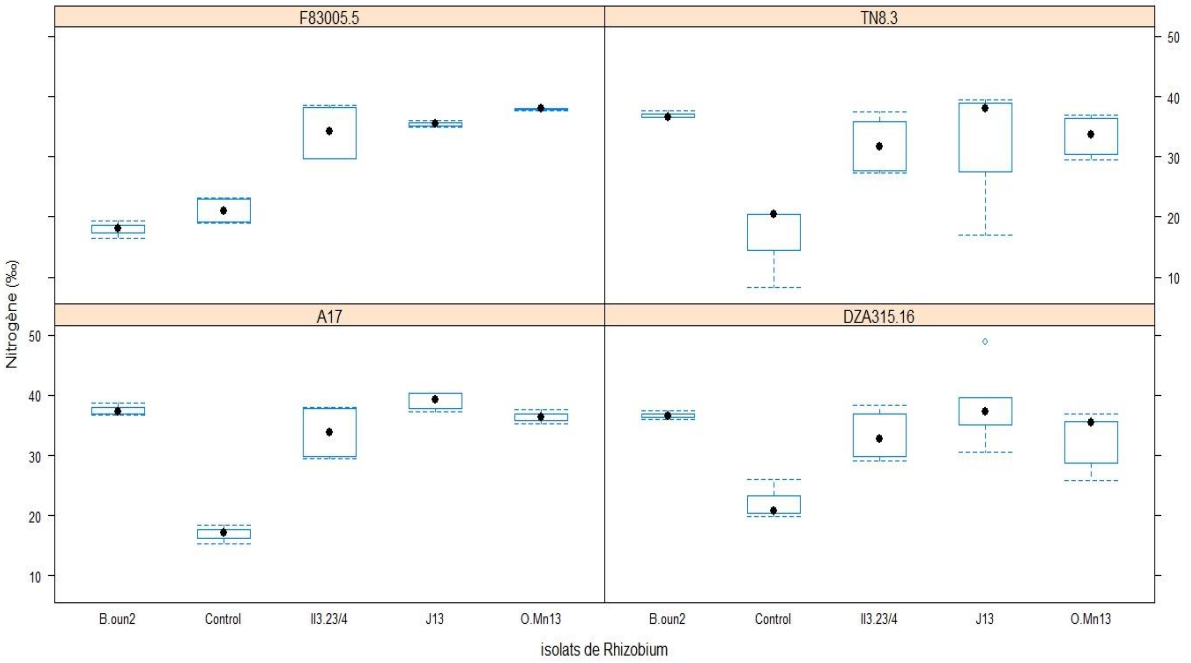


Figure 32. Teneur en azote (‰) des accessions de *Medicago truncatula* (A17 ; F83005.5 ; DZA315.16 ; TN8.3) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisien (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13).
Les plantes témoins n'ont pas été inoculées. Les valeurs sont basées sur la biomasse sèche et ont été obtenues à partir de 3 plantes regroupées (un pot), avec 3 pots pour chaque lignée de couple*isolat et 2 expériences indépendantes.

Tableau 13. Teneur en azote de 4 lignées de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium de Tunisie (O.Mn13, J13, B.oun2, II3.23/4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison isolat/lignée (3 plantes par pot) dans chaque expérience. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en incluant les témoins. Les combinaisons lignée*isolat avec la même lettre sont dans le même groupe.

Isolat*Lignée	**Teneur en Azote (‰)**
J13*A17	39,03 a
J13*DZA315.16	38,08 a
O.Mn13*F83005.5	37,90 a
B.oun2*A17	37,53 a
B.oun2*TN8.3	36,95 a
B.oun2*DZA315.16	36,68 a
O.Mn13*A17	36,40 a
J13*F83005.5	35,44 a
II3.23/4*F83005.5	34,07 a
II3.23/4*A17	33,80 a
O.Mn13*TN8.3	33,44 a
II3.23/4*DZA315.16	33,27 a
J13*TN8.3	33,14 a
O.Mn13*DZA315.16	32,55 a
II3.23/4*TN8.3	31,97 a
Control*DZA315.16	22,22 b
Control*F83005.5	21,05 b
B.oun2*F83005.5	17,94 b
Control*TN8.3	17,45 b
Control*A17	16,94 b

Tableau 14. Teneur en azote de 4 lignées de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium de Tunisie (O.Mn13, J13, B.oun2, II3.23/4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison isolat/lignée (3 plantes par pot) dans chaque expérience. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec les tests SNK, HSD et LSD en excluant les témoins et les plantes de la lignée F83005.5 inoculées avec B.oun2. Les isolats avec la même lettre sont dans le même groupe.

Isolat de Rhizobium	**Moyenne N %**	**SNK**	**HSD**	**LSD**
		Groupe de moyenne		
B.oun2	37,05	a	a	a
J13	36,56	a	a	a
O.Mn13	34,49	a	a	ab
II3.23/4	33,28	a	a	b

indépendamment de la lignée et l'isolat dans le second groupe (**Tableau 13**). Il faut noter que les plantes de la lignée F83005.5 inoculées avec B.oun2 avaient aussi le nombre le moins élevé de nodules.

Seul le ratio pourcentage d'azote inoculées/témoins de la combinaison F83005.5*B.oun2 est inférieur à 1, montrant ainsi que l'inoculation de B.oun2 sur des plantes de F83005.5 n'a pas augmenté le taux d'azote dans les parties aériennes des plantes. Ce manque d'azote est très probablement dû au faible nombre de nodules.

Lorsque l'analyse statistique a été effectuée, sans tenir compte des plantes témoins (**Annexe 28**), l'effet Rhizobium était toujours présent, mais plus faible (p-value=0,0616).

Deux groupes de moyennes ont été révélés : le premier contient des plantes de *M. truncatula* appartenant à la lignée F83005.5 inoculées avec B.oun2 et le second contient toutes les autres plantes inoculées indépendamment de la lignée et de l'isolat de Rhizobium (**Annexe 29**).

La différence prononcée entre les plantes de la lignée F83005.5 inoculée avec B.oun2 et toutes les autres plantes inoculées est la raison de l'interaction génotype*isolat observée, car lorsque l'analyse de variance a été effectuée avec des plantes inoculées seulement, et à l'exclusion de la lignée F83005.5 inoculée avec B.oun2 (**Annexe 30**), une différence significative a été détectée entre les isolats (p-value = 0,0494). Cependant, ni le test SNK ni le test HSD n'ont révélé de groupes de moyennes différents (**Tableau 14**).

Il est donc à noter que l'effet bénéfique sur les niveaux d'azote est quasi identique pour la plupart des combinaisons d'isolats de Rhizobium*lignées de *M. truncatula*, mais des exceptions telles que F83005.5, inoculé avec B.oun2, montrent que cet effet ne peut pas être généralisé.

III. Capacité des Rhizobia à solubiliser le phosphate et effet sur la croissance des plantes

1. Solubilisation du phosphate sous forme de $CaHPO_4$ *in Vitro*

En fonction de leur capacité à solubiliser le phosphate inorganique, les rhizobactéries peuvent fournir aux plantes une forme de P facile à absorber. Les expériences suivantes visent donc à évaluer la capacité des 36 isolats de Rhizobium à solubiliser le $CaHPO_4$. Le milieu contenant $CaHPO_4$ a un aspect laiteux et la solubilisation du phosphate est visible sous la forme d'un halo translucide autour de la colonie bactérienne. De nombreux isolats de Rhizobium, mais pas la totalité, ont effectivement produit un halo translucide sur ce milieu. Au total, 22 isolats

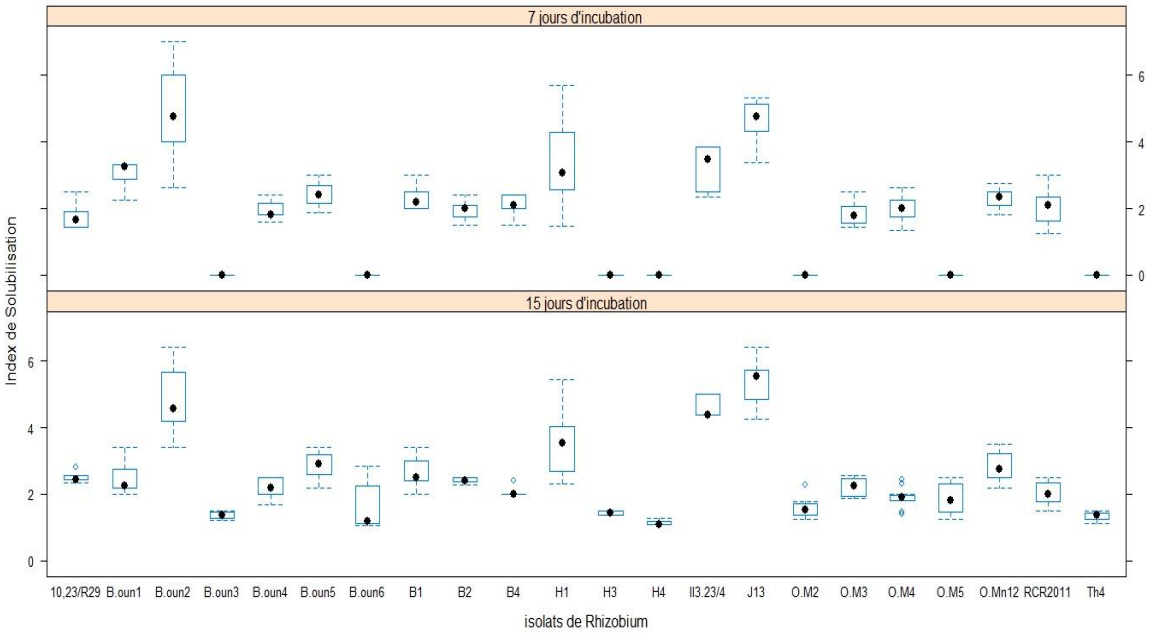


Figure 33. Solubilisation du Phosphate *in vitro* par des isolats tunisiens de Rhizobium. L'indice de solubilisation a été déterminé après 7 et 15 jours d'incubation sur milieu avec $CaHPO_4$ comme source de phosphate insoluble. Seuls les 22 isolats qui solubilisent $CaHPO_4$ sont représentés. Les valeurs sont obtenues à partir de 3 expériences indépendantes avec 4 répétitions pour chacune d'entre elles.

Tableau 15. Indice de solubilisation de phosphate *in vitro* par des isolats de Rhizobium tunisien à 7 jours d'incubation. Seuls les 22 isolats qui solubilisent $CaHPO_4$ sont représentés. Les valeurs ont été obtenues à partir de 3 expériences indépendantes avec 4 répétitions pour chacune d'entre elles. Les groupes de moyennes représentés par des lettres sont obtenus à partir du test Student-Newman-Keuls (SNK). Les isolats avec la même lettre sont dans le même groupe.

Isolats de Rhizobium	**Valeurs moyennes de PSI7**
B.oun2	4,98 a
J13	4,62 a
H1	3,33 b
II3.23/4	3,22 b
B.oun1	3,05 b
B.oun5	2,43 c
O.Mn12	2,31 cd
B1	2,31 cd
B4	2,13 cd
RCR2011	2,03 cd
O.M4	2,01 cd
B2	1,94 cd
B.oun4	1,93 cd
O.M3	1,85 cd
10.23/R29	1,73 d
B.oun3	0 e
B.oun6	0 e
H3	0 e
H4	0 e
O.M2	0 e
O.M5	0 e
Th4	0 e

des 36 (soit 61%) ont pu solubiliser le phosphate dans ces conditions expérimentales. L'efficacité de la solubilisation a été calculée en PSI (Phosphate Solublizing Index), après 7 (PSI7) et 15 jours d'incubation (PSI15).

Comme le montre la **Figure 33**, sept isolats (B.oun3, B.oun6, H3, H4, O.M2, O.M2, O.M5 et Th4) ont une capacité faible de solubilisation de P, les halos n'apparaissant qu'après 15 jours d'incubation. Les valeurs PSI restent inférieures à celles des autres isolats. Quinze isolats de rhizobium ont montré une solubilisation prononcée du phosphate avec des halos visibles et des valeurs PSI7 allant de 1,73 à 4,98. Les deux isolats (SPI7 = 4,98) et J13 (PSI7 = 4,62) ont présenté une forte capacité de solubilisation de P. L'indice de solubilisation a généralement augmenté davantage après 15 jours d'incubation, et il est maximum pour l'isolat J13 (PSI15 = 5,34) suivi de B.oun2 (PSI15 = 4,82) et de II3.23/4 (PSI15 = 4,63). Les valeurs de PSI15, légèrement inférieures à celles de PSI7 observées pour 4 isolats de Rhizobium (B.oun1, B.oun2, B4 et O.M4), sont dues à une forte croissance des colonies dans le halo de solubilisation. Les valeurs moyennes des PSI à 7 (**Tableau 15**) et 15 jours (**Annexe 31**) et les groupes de moyennes sont indiquées dans les tableaux ci-dessous. Il convient de noter aussi que la capacité à solubiliser le phosphate a été constatée pour des isolats provenant des six sites d'échantillonnage.

L'analyse statistique de l'ANOVA (**Annexe 32 et 33**) sur les 22 isolats de Rhizobium solubilisant le phosphate montre que la différence des valeurs PSI est très significative avec des p-value de $2e^{-16}$ à 7 et 15 jours.

L'analyse ANOVA (**Annexe 34**) de la totalité des isolats de rhizobium a aussi montré des différences hautement significatives entre les isolats (p-value= $2e^{-16}$), le temps d'incubation (p-value= $2e^{-16}$), ainsi que l'interaction Rhizobium/temps d'incubation (p-value= $2e^{-16}$). Les mêmes p-value sont retrouvés pour les ANOVA faites sur les 22 isolats de Rhizobium qui solubilisent le phosphate (**Annexe 35**).

La capacité de solubiliser le phosphate est présente chez des isolats des 6 sites, mais davantage dans certains sites comme Sidi Ali Ben Aoun où la totalité des isolats possèdent cette aptitude. Afin d'estimer si la capacité de solubiliser le phosphate pouvait être une adaptation à des conditions locales du sol ou du climat, le lien entre le site d'origine et la capacité des isolats de Rhizobium à solubiliser le phosphate a été étudié en utilisant le test Khi deux.

Tableau 16. Lien entre le site d'origine des Rhizobium et la solubilisation du Phosphate à 7 et à 15 jours d'incubation.

	7 jours d'incubation (PSI7)	**15 jours d'incubation (PSI15)**
indicateur Khi deux	11,42	13,67
degrés de liberté	9	9
p-value	0,25	0,1

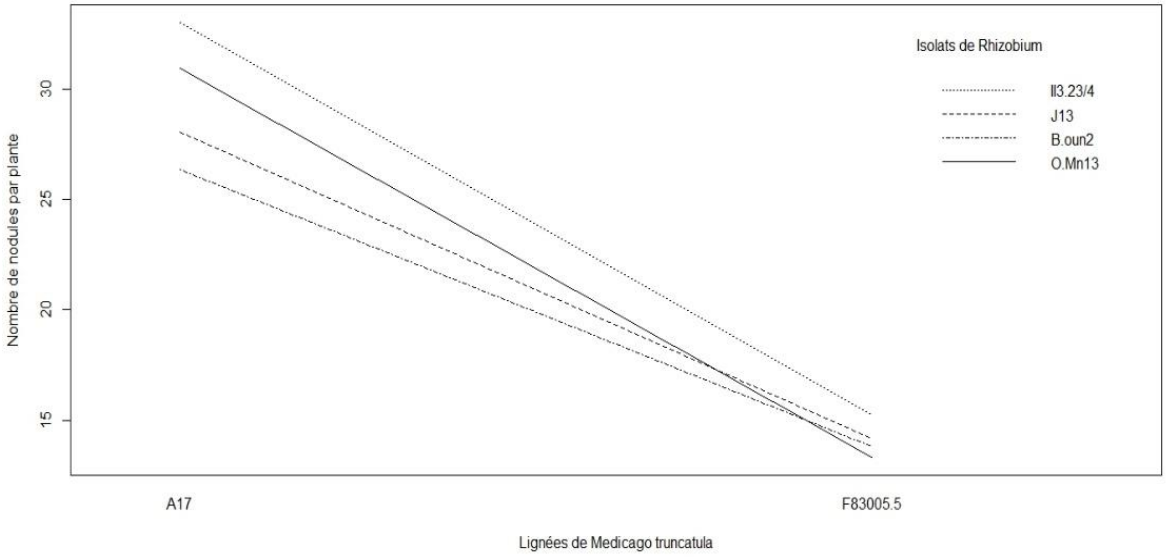


Figure 34. Nodulation des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13).

Les nodules ont été comptés après 8 semaines de culture. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison lignée*isolat (3 plantes par pot) dans chaque expérience. Tracé d'interaction montrant l'interaction entre les lignées et les isolats de Rhizobium.

Le **Tableau 16** montre l'indicateur Khi deux, les degrés de liberté ainsi que les p-value à 7 et 15 jours d'incubation. Les deux p-value pour PSI7 (0,25) et pour PSI15 (0,1) étant supérieures à 0,05, l'hypothèse d'indépendance est acceptée. Il n'existe donc aucun lien entre la capacité des isolats de Rhizobium à solubiliser le phosphate et leurs sites d'origine.

2. Effet de la présence des rhizobiums sur la croissance des plantes dans un substrat où la source de phosphate est insoluble

Suite aux résultats du test de solubilisation du $CaHPO_4$ *in vitro*, il est intéressant d'étudier si cette capacité est fonctionnelle *in planta* et si la plante hôte en bénéficie. Quatre isolats de rhizobium ont été choisis pour faire un test en présence de plante. Les isolats ont été choisis selon leurs profils de solubilisation de phosphate, ainsi que leurs différentes origines. J13, B.oun2 et II3.23/4 sont les 3 isolats de rhizobium qui ont le pouvoir solubilisant *in vitro* de $CaHPO_4$ le plus prononcé, alors qu'O.Mn13 est un isolat de rhizobium qui n'a montré aucun pouvoir solubilisant. Deux lignées de *M. truncatula* ont été utilisées : A17 et F83005.5. Le test a été fait dans un substrat constitué d'un mélange de sable et de perlite additionné de $CaHPO_4$ dans un phytotron à 25°C.

2. 1. Nodulation des plantes de M. truncatula sous $CaHPO_4$ comme seule source de Phosphate

L'essai a été imaginé afin de comparer l'effet de la symbiose sur la croissance des plantes, en présence de phosphate soluble et insoluble. Deux expériences ont donc été lancées en même temps et dans les mêmes conditions. L'un avec du $CaHPO_4$ comme source insoluble de phosphate et l'autre avec un mélange de K_2HPO_4 et de KH_2PO_4 comme source de phosphate soluble. Or la croissance des plantes sur ce substrat a été difficile et aucune plantes de l'expérience du phosphate soluble n'a poussé. Malgré ce substrat limitant pour le développement des plantes, les différences de nodulation et de biomasse ont été évaluées.

La **Figure 34** permet de visualiser l'influence des différents isolats de Rhizobium sur le nombre de nodules par plante chez les deux lignées de *M. truncatula* inoculées avec les quatre isolats de Rhizobium. Le diagramme d'interaction présente des lignes presque parallèles, ce qui signifie que l'interaction est faible voire nulle. L'effet des isolats est le même chez les deux lignées.

Le nombre de nodules sur les racines de A17 et de F83005.5 dans ces conditions de culture est nettement plus faible que le nombre de nodules trouvés à l'essai dans un substrat de terreau. Le nombre de nodules chez A17 varie entre 25 et 35 à l'essai sur sable/perlite et entre

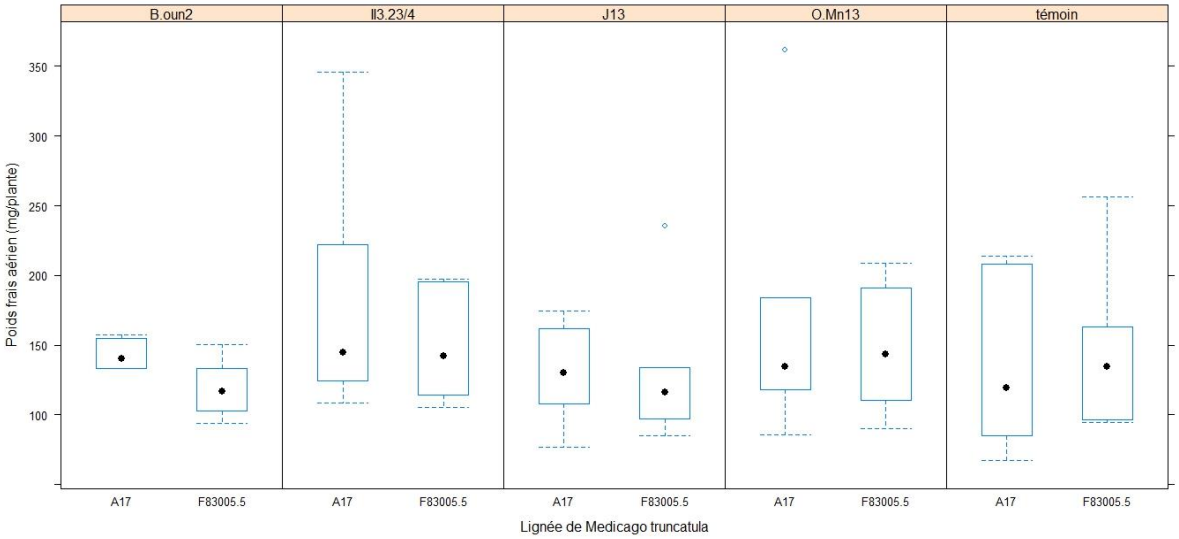


Figure 35. Biomasse fraîche aérienne des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13).

Les parties aériennes ont été pesées après 8 semaines de culture. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison lignée*isolat (3 plantes par pot) dans chaque expérience.

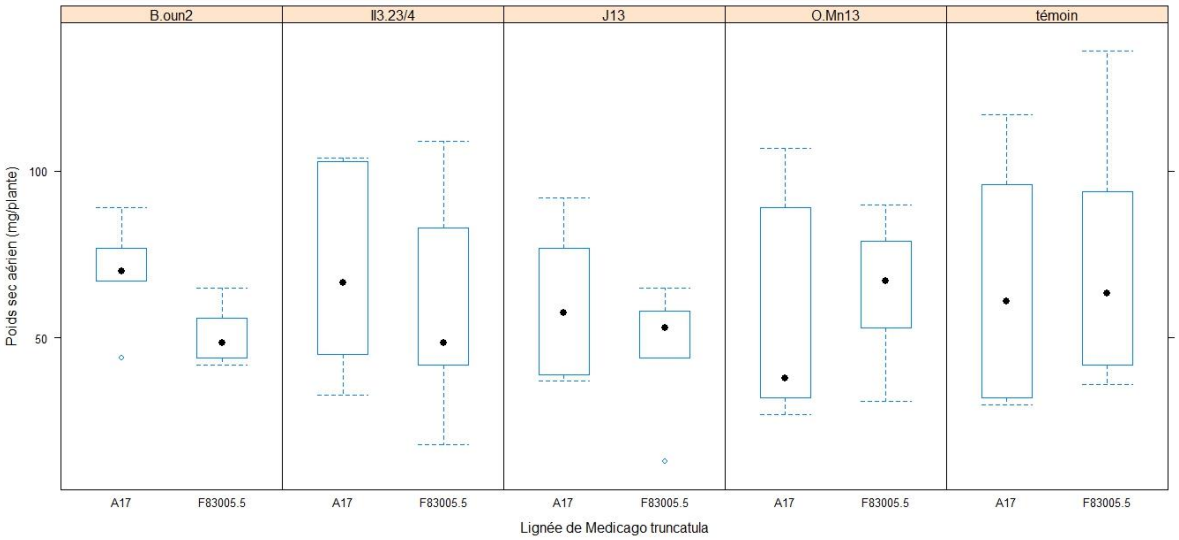


Figure 36. Biomasse aérienne sèche des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13)

Les parties aériennes ont été séchées puis pesées. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison lignée*isolat (3 plantes par pot) dans chaque expérience.

37 et 66 dans l'essai sur terreau. Chez F83005.5, il est inférieur à 15 dans l'essai sur sable/perlite et entre 12 et 37 dans l'essai sur terreau.

Les plantes de la lignée A17 de *M. truncatula* présentent le nombre de nodules le plus élevé quand elles sont inoculées avec les quatre souches de Rhizobium, avec une moyenne de 29,58 nodules par plante chez A17 et 14,15 nodules par plante chez F83005.5. Deux groupes de moyennes sont ainsi distingué.

L'analyse ANOVA (**Annexe 36**) ne montre pas d'interaction entre le génotype et l'isolat de Rhizobium, pas d'effet Rhizobium non plus, mais une différence hautement significative (p-value= 4e-7) entre les deux lignées A17 et F8300505.

2. 2. L'inoculation de rhizobium en présence de $CaHPO_4$ n'affecte pas la biomasse aérienne

L'examen racinaire pour déterminer la nodulation a pour objectif principal de déterminer l'effet de la nodulation sur la biomasse aérienne des plantes. L'effet de l'efficacité symbiotique des Rhizobium sur la croissance et le développement des plantes, sous une carence en phosphate, a été évalué. La biomasse fraîche et sèche est nettement plus faible à cause des conditions de culture limitantes.

La **Figure 35** montre la variation de la biomasse aérienne fraîche en fonction des lignées et des isolats des rhizobiums utilisés.

Il apparaît que les plantes de la lignée A17 inoculées avec B.oun2, II3.23/4 et J13 ont une biomasse aérienne fraîche légèrement plus élevée que chez les plantes de la lignée F83005.5. Chez la lignée A17, le poids frais aérien des plantes témoins est plus faible que chez les plantes inoculées, ce qui n'est pas le cas pour la lignée F83005.5. Or, l'analyse statistique de la variance ne montre pas de différences significatives entre l'effet des lignées ou des isolats de Rhizobium (**Annexe 37**), ni d'interaction génotype*isolat.

A l'inverse, les plantes inoculées avec O.Mn13 (l'isolat qui ne solubilise pas le $CaHPO_4$ *in vitro*) donnent le même résultat que les plantes témoins chez lesquelles la lignée F83005.5 présente une biomasse aérienne fraîche plus élevée que la lignée A17.

L'évaluation après séchage des parties aériennes ne permet pas non plus de mettre en évidence un effet significatif sur la croissance (**Figure 36**).

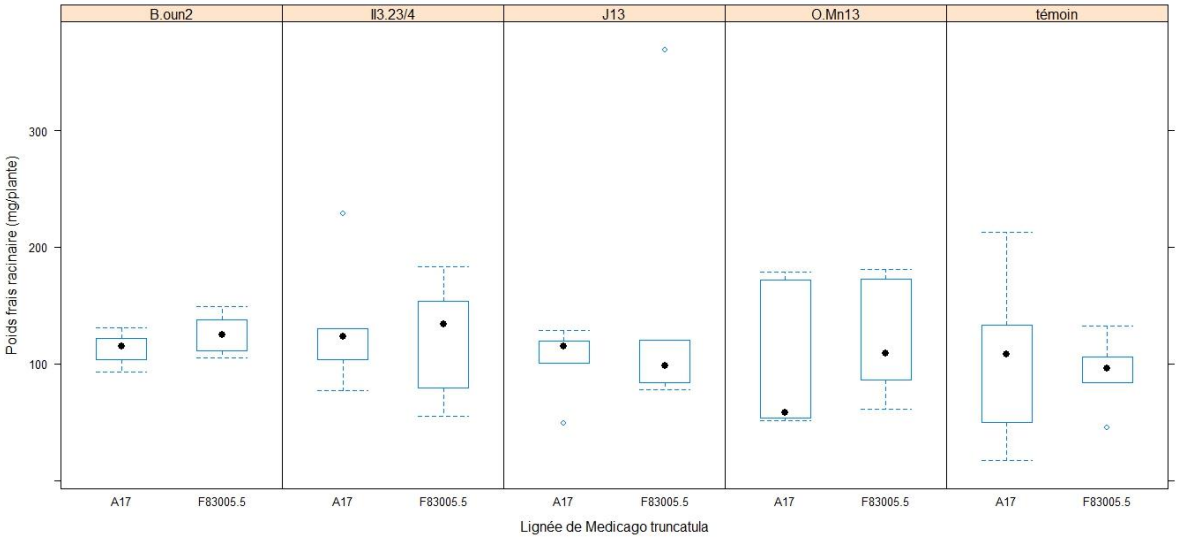


Figure 37. Biomasse racinaire fraîche des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13).

Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison lignée*isolat (3 plantes par pot) dans chaque expérience.

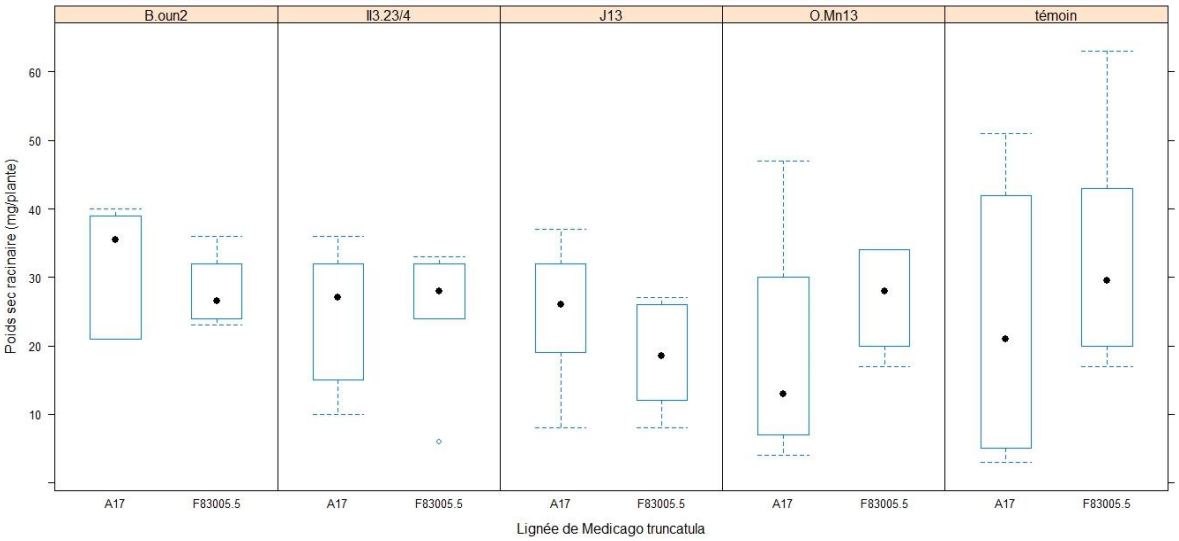


Figure 38. Biomasse racinaire sèche des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13).

Les racines ont été séchées puis pesées. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison lignée*isolat (3 plantes par pot) dans chaque expérience.

2. 3. L'inoculation des rhizobiums en présence de $CaHPO_4$ comme source de phosphore n'affecte pas la biomasse racinaire

Les racines fraîchement cueillies pèsent environ 100 mg/plante (**Figure 37**). On remarque qu'il n'y a pas une grande variation entre les deux lignées de *M. truncatula* ou entre l'effet des isolats de Rhizobium. L'inoculation n'induit pas de différences significatives entre les biomasses racinaires fraîches ce qui est confirmé avec les analyses ANOVA (**Annexe 39).**

La **Figure 38** montre une légère différence entre le poids sec des racines. Chez la lignée A17, seules les plantes inoculées avec O.Mn13 présentent des racines moins développées que les plantes témoins. Il faut rappeler que l'isolat O.Mn13 n'a pas montré une capacité à solubiliser le phosphate *in vitro*. Contrairement à la lignée A17, dans la majorité des cas, les plantes témoins de la lignée F83005.5 présentent des racines plus développées que les plantes inoculées. Mais, l'analyse du poids sec racinaire n'a montré aucune différence significative (**Annexe 40 et 41**).

3. Effet des rhizobiums sur la croissance des plantes en culture avec le phosphate rocheux comme seule source de phosphate

Cet essai a été fait à l'INRA Tunisie en armoire phytotron à 25°C, en utilisant les mêmes isolats de rhizobium (J13, B.oun2, II3.23/5 et O.Mn13) et les lignées de *M. truncatula* (A17 et F83005.5). Dans ce test, 2 sources de phosphate ont été utilisées afin de comparer leurs effets respectifs sur la croissance des plantes de *M. truncatula*. La première source est du phosphate soluble présenté sous forme d'un mélange de K_2HPO_4 et de KH_2PO_4 et le deuxième est présenté sous forme de phosphate rocheux brut. Les sources de phosphate ont été ajoutées à du substrat sable, additionné d'une couche superficielle de terreau.

A la récolte, quelques petites différences au niveau du feuillage des plantes ont été remarqués entre les plantes cultivées sur le phosphate rocheux et des plantes cultivées sur le phosphate soluble, mais aussi entre les deux lignées A17 et F83005.5.

Néanmoins, comme pour la culture au phytotron en présence de $CaHPO_4$ comme seule source de phosphate, les plantes cultivées en armoire phytotron avec phosphate rocheux ou phosphate soluble ont aussi souffert de ces conditions de culture. Toutes les plantes étaient de très petites tailles et avec des parties aériennes et des racines très peu développées (**Figure 39**).



Figure 39. Culture de plantes de *M. truncatula* dans l'armoire phytotron. (A):Disposition des pots dans l'armoire phytotron. (B): Aspect des plantes à la récolte.

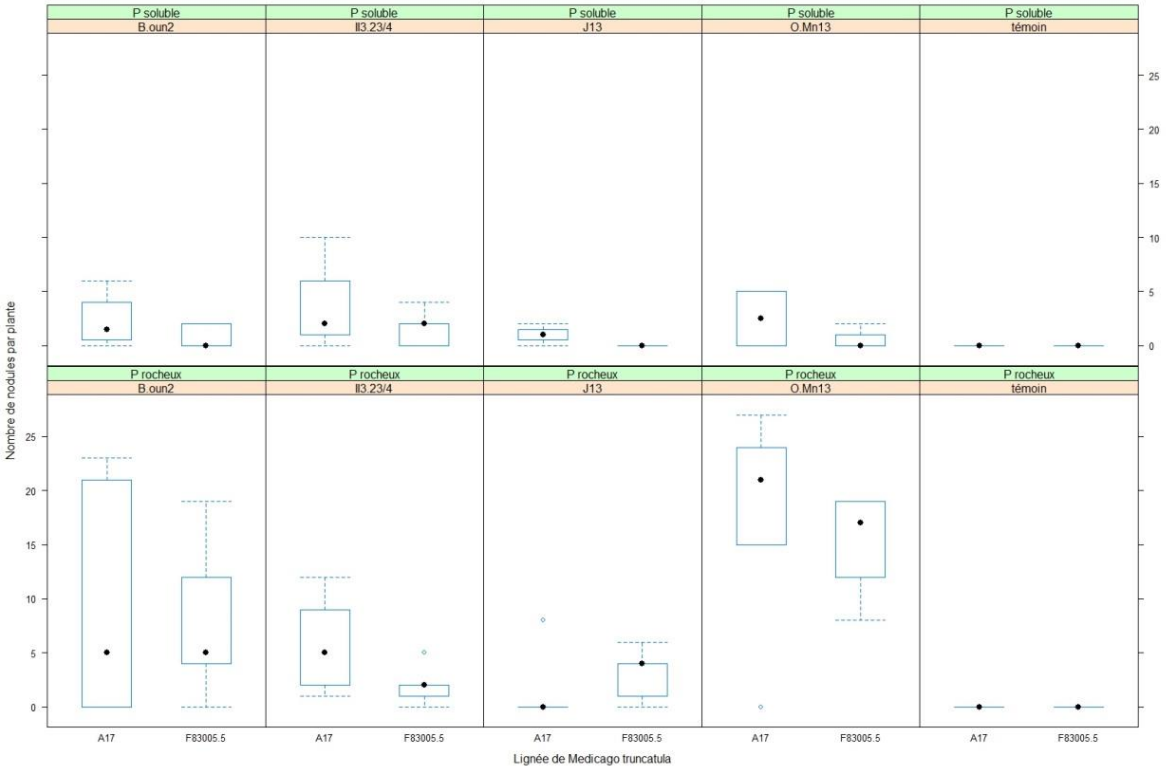


Figure 40. Nodulation des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) en présence de deux formes différentes de phosphates.
Les deux formes de phosphates sont : le Phosphate rocheux insoluble et le phosphate soluble sous forme d'un mélange de KH_2PO_4 et de K_2HPO_4. Les valeurs ont été obtenues à partir de 5 plantes pour chaque combinaison lignée*isolat et chaque traitement.

3. 1. La nodulation par rhizobium est supérieure quand la source de phosphate est le phosphate rocheux

Après deux mois de culture en chambre de culture, les racines de toutes les plantes ont été examinées et le nombre de nodules a été déterminé. Cinq plantes par lignée, par isolat de rhizobium et par traitement ont été considérées à chaque fois. Le comptage de nodules a montré que les plantes cultivées sur du phosphate rocheux produisent plus de nodules par rapport à celles cultivées sur du phosphate soluble (**Figure 40**). Il apparaît aussi que la lignée A17 produit généralement plus de nodules que la lignée F83005.5, mais ceci n'a pas été démontré par les analyses ANOVA (**Annexe 42**).

L'analyse de la variance montre une différence hautement significative entre les quatre isolats de rhizobium avec une p-value=0,000173, entre les sources de phosphate avec une p-value=$3{,}2e^{-5}$ ainsi qu'une interaction rhizobium*source de phosphate avec une p-value=0,004154 (**Annexe 42**). L'isolat O.Mn13 inoculé produit le nombre de nodules le plus élevé chez les deux lignées sur du phosphate rocheux (**Tableau 17**).

A l'exception de O.Mn13, toutes les plantes cultivées sur du phosphate rocheux présentent beaucoup moins de nodules que celles cultivées sur du phosphate soluble.

3. 2. La source du phosphate influence les paramètres de croissance des plantes

Le comptage du nombre de feuilles illustre la mauvaise croissance des plantes sur les deux substrats. Des légères différences sont visibles entre les deux substrats pour les deux lignées en état non-inoculé et inoculé (**Figure 41**).

L'analyse de la variance ne montre aucune différence significative entre les deux lignées et les quatre isolats de rhizobium, mais une différence significative entre les deux sources de phosphate (**Annexe 43**). Le test SNK met en tête le phosphate rocheux avec 4,58 feuilles par plante dans un groupe et le phosphate soluble dans un deuxième groupe avec 4,09 feuilles par plante.

Comme deuxième paramètre de la biomasse aérienne, le poids de matière fraîche a été déterminé (**Figure 42**). Contrairement à ce qui a pu être constaté pour le nombre de feuilles, le poids de la partie aérienne n'est pas influencé par la source de phosphate. Par contre l'inoculation par rhizobium augmente légèrement le poids. Cet effet n'est pas significatif, comme montré par l'analyse ANOVA (**Annexe 44**).

Tableau 17. Nombre de nodules moyen produit par deux accessions de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13) et traitées avec deux formes différentes de phosphate, l'une soluble et l'autre insoluble.
Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en excluant les témoins. Les combinaisons isolat*traitement de la même lettre appartiennent au même groupe de moyennes.

Isolat*traitement	Moyenne du nombre de nodules
O.Mn13*P rocheux	16,20 a
B.oun2*P rocheux	8,90 b
II3.23/4*P rocheux	3,90 bc
II3.23/4*P soluble	2,50 c
J13*P rocheux	2,30 c
B.oun2*P soluble	1,44 c
O.Mn13*P soluble	1,17 c
J13*P soluble	0,60 c

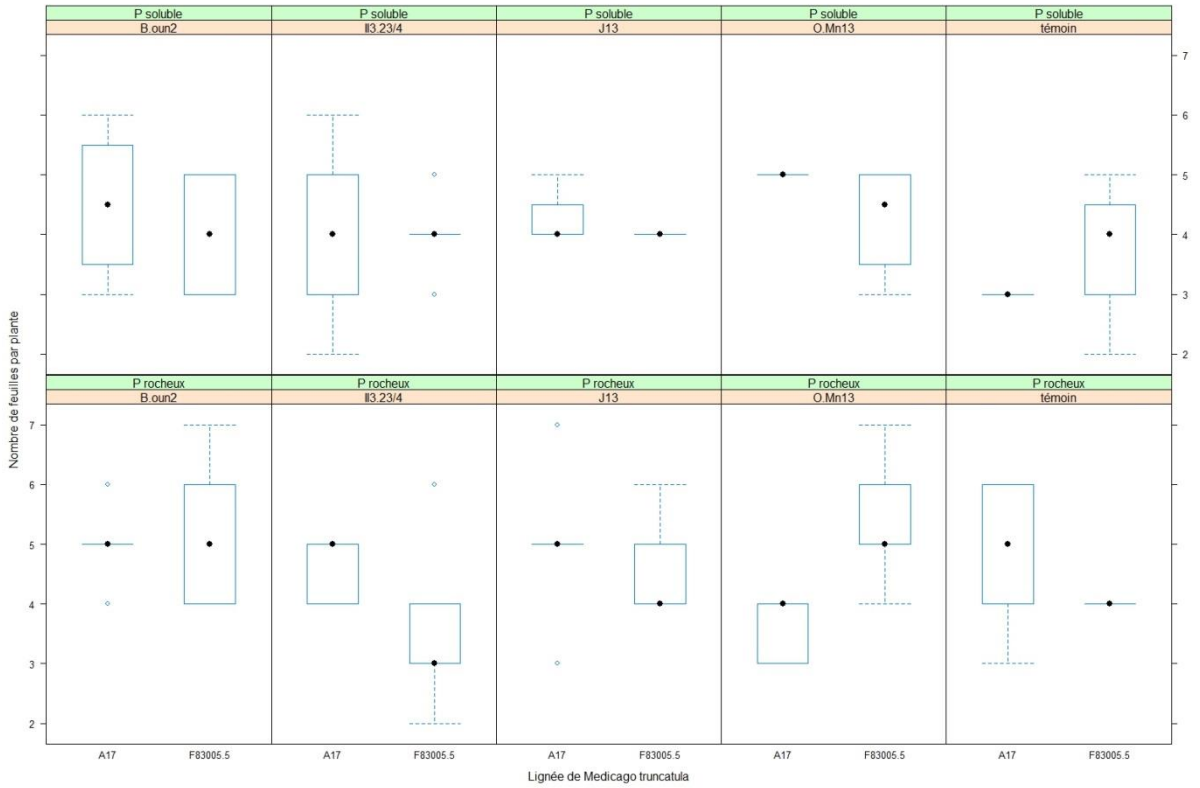


Figure 41. Nombre de feuilles produites des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13) en présence de deux formes différentes de phosphates.
Les deux formes de phosphates sont : le Phosphate rocheux insoluble et le phosphate soluble sous forme d'un mélange de KH_2PO_4 et de K_2HPO_4. Les valeurs ont été obtenues à partir de 5 plantes pour chaque combinaison lignée*isolat et chaque traitement.

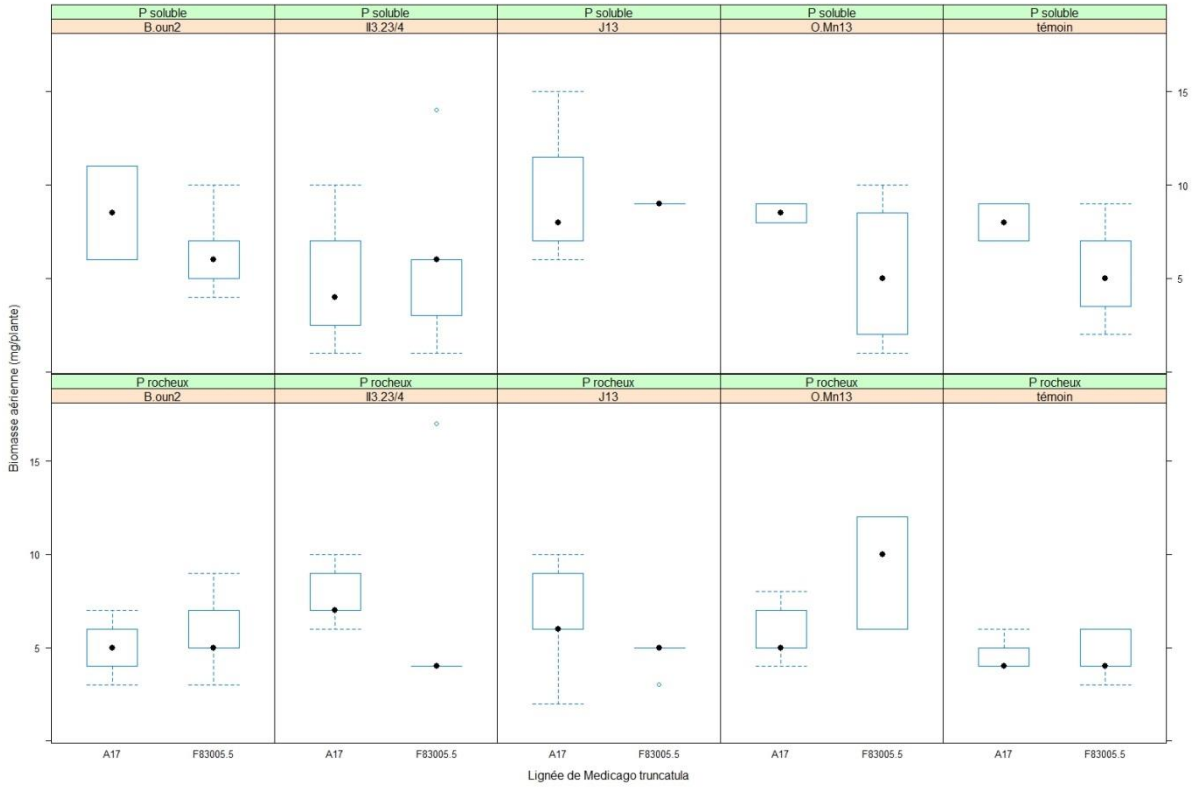


Figure 42. Biomasse aérienne des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13) en présence de deux formes différentes de phosphates.

Les deux formes de phosphates sont : le phosphate rocheux insoluble et le phosphate soluble sous forme d'un mélange de KH_2PO_4 et de K_2HPO_4. Les valeurs ont été obtenues à partir de 5 plantes pour chaque combinaison lignée*isolat et chaque traitement.

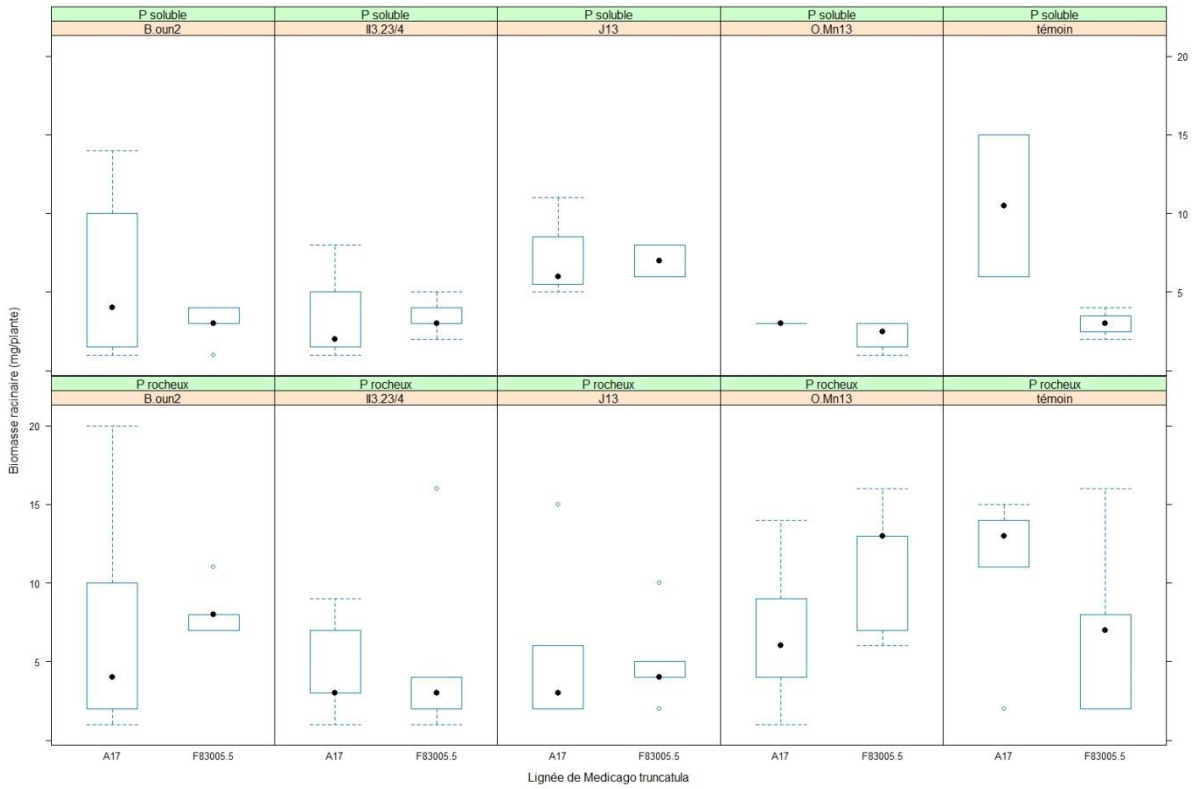


Figure 43. Biomasse racinaire des accessions de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) inoculées avec des isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13) en présence de deux formes différentes de phosphates.

Les deux formes de phosphates sont : le phosphate rocheux insoluble et le phosphate soluble sous forme d'un mélange de KH_2PO_4 et de K_2HPO_4. Les valeurs ont été obtenues à partir de 5 plantes pour chaque combinaison lignée*isolat et chaque traitement.

Compte tenu des résultats trouvés dans l'essai de l'effet de la symbiose sur la croissance des racines, la croissance racinaire de toutes les plantes de cet essai a aussi été mesurée (**Figure 43**). Les analyses ANOVA (**Annexe 45**) ne montrent pas de différence entre les deux lignées, ni pour l'inoculation avec les 4 isolats de rhizobium, mais une seule significative entre deux sources de P avec une p-value=0,0143. La moyenne de la biomasse racinaire chez les plantes traitées avec du phosphate rocheux est à 7,18 mg/plante, alors que celle chez les plantes traitées au phosphate soluble est de 4,45 g/pante.

Il semble donc que la nodulation n'a aucun effet bénéfique sur la croissance de la plante dans ces conditions qui généralement sont peu favorables à leur développement. Il n'est donc pas possible de conclure que la capacité de solubiliser le P in vitro de 3 des isolats pourrait avoir un bénéfice pour la plante symbiosée.

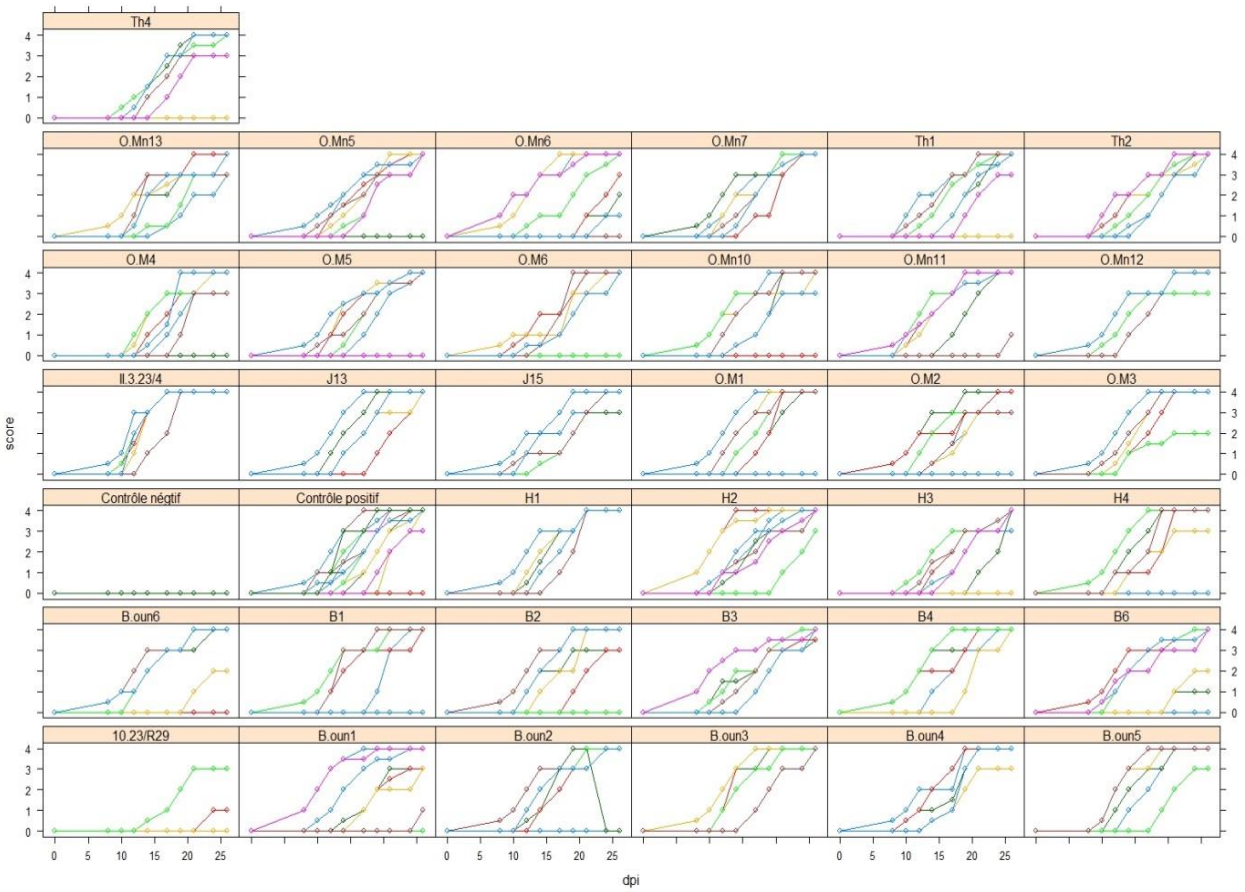


Figure 44. Evolution des symptômes de la maladie chez la lignée F83005.5 inoculée avec 35 isolats de rhizobium à 2 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 10 jours après le semis en culture sur Jiffy.

Chaque petit carré représente l'évolution de la maladie pour un groupe de plante inoculées avec le même isolat de rhizobium, chaque courbe de couleur représente l'évolution de la maladie représentée par des scores (sur l'axe des ordonnées) chez une seule plante en fonction des jours après inoculation (dpi pour Days Post-Inoculation).

IV. Etude de la possibilité de biocontrôle par les isolats tunisiens de rhizobium

1. Effet des Rhizobium sur l'infection de *M. truncatula* par *V. alfalfae*

Etant donné que *V. alfalfae* est un champignon du sol qui attaque les racines des plantes de *M. truncatula*, qu'il est responsable de nombreux dégâts, et que certaines souches de rhizobium ont montré une induction de résistance chez d'autres légumineuses contre certaines maladies fongiques, il a été décidé de tester la capacité de ces isolats de rhizobium à lutter contre *V. alfalfae*, en s'appuyant sur des tests *in vitro*, ainsi qu'*in planta*, à l'aide de l'étude des cinétiques d'infection des plantes symbiosées de *M. truncatula* par Vaa sous infestation artificielle

1. 1. Essai de protection contre V. alfalfae avec plantes âgées de 10 jours

Dans une première expérience, les conditions de l'inoculation étaient similaires à la procédure standard au laboratoire, c'est-à-dire à l'âge de 10 jours. Une seule lignée de *M. truncatula* a été utilisée, la lignée F83005.5, qui est sensible à *V. alfalfae*. La **Figure 44** montre les courbes d'évolution des symptômes chez la lignée F83005.5 inoculée avec 35 isolats de rhizobium. Les isolats ont été inoculés à 2 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 10 jours après le semis en culture sur Jiffy dans un phytotron à 25°C. En plus des 35 isolats de rhizobiums, des plantes témoins positifs inoculées qu'avec V31.2 et des plantes témoins négatifs non inoculées, ni avec des rhizobiums ni avec le champignon, ont été ajouté à l'essai.

L'objectif de l'essai est de voir l'effet de l'inoculation sur l'évolution de la maladie. Il apparait ainsi que toutes les courbes des plantes inoculées avec les différents isolats de rhizobium ont la même tendance que les courbes des plantes témoins positifs (non-préinoculés par rhizobium). Ainsi, l'agressivité de V31.2 sur la lignée F83005.5 semble rester inchangée suite à l'inoculation des rhizobiums. L'analyse ANOVA de l'AUDPC (pour "area under the disease progress curve" = aire sous la courbe de progression de la maladie) montre une faible différence significative avec une p-value de 0,0898 (**Annexe 46**). Les plantes inoculées avec II3.23/4 ou avec B.oun3 semble avoir une AUDPC un peu plus élevée que les plantes non inoculées avec aucun isolat de rhizobium, alors que celle inoculées avec 10.23/R29 semble avoir une AUDPC moins élevée, mais le test SNK ne les met pas dans des groupes de moyennes distinctes (**Annexe 47**).

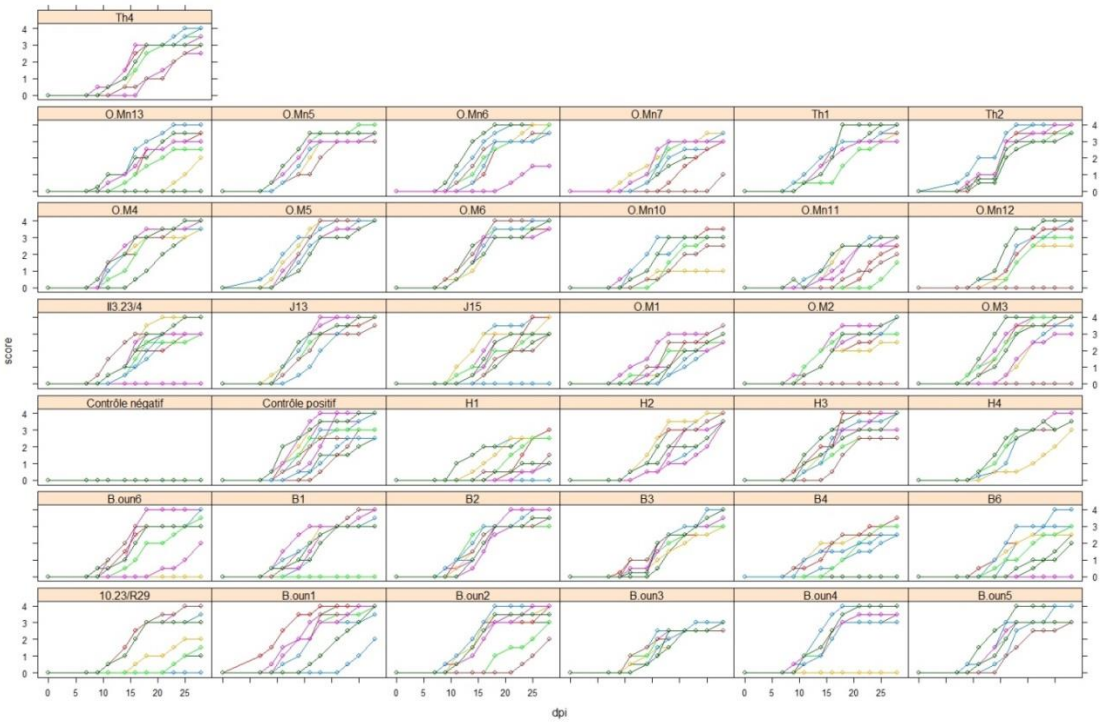


Figure 45. Evolution des symptômes de la maladie chez la lignée F83005.5 inoculée avec 35 isolats de rhizobium à 6 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 13 jours après le semis en culture sur Jiffy.
Chaque petit carré représente l'évolution de la maladie pour un groupe de plante inoculées avec le même isolat de rhizobium, chaque courbe de couleur représente l'évolution de la maladie représentée par des scores (sur l'axe des ordonnées) chez une seule plante en fonction des jours après inoculation (dpi pour Days Post-Inoculation).

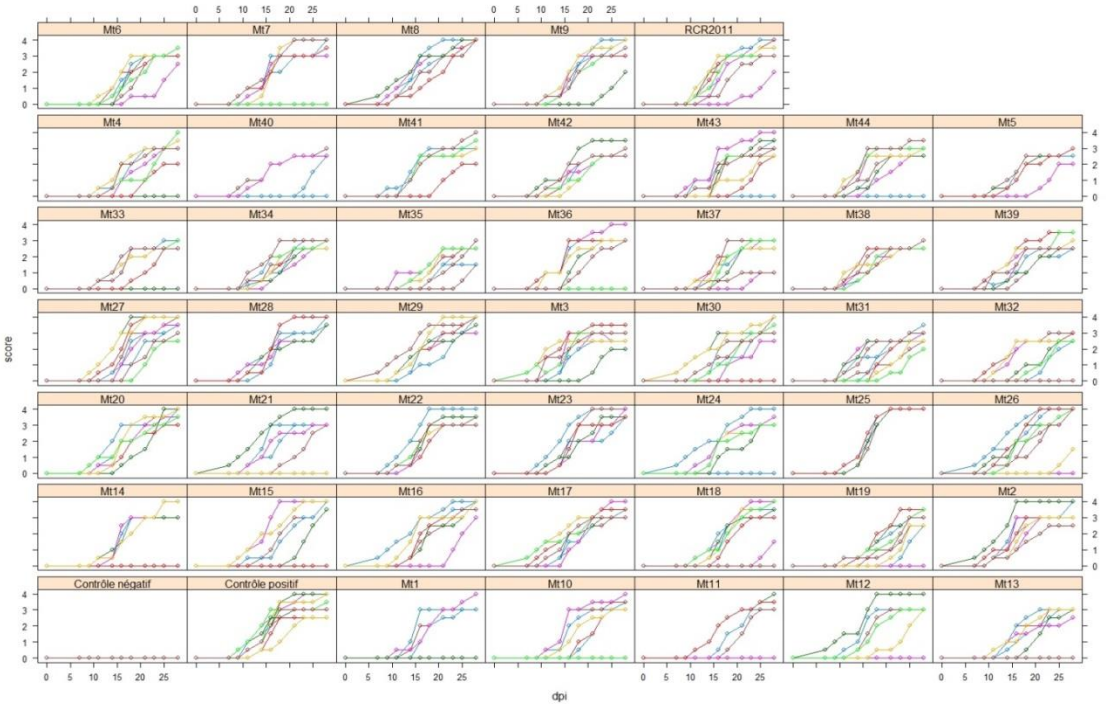


Figure 46. Evolution des symptômes de la maladie chez la lignée F83005.5 inoculée avec 44 mutant de RCR2011 à 6 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 13 jours après le semis en culture sur Jiffy.
Chaque petit carré représente l'évolution de la maladie pour un groupe de plante inoculées avec le même isolat de rhizobium, chaque courbe de couleur représente l'évolution de la maladie représentée par des scores (sur l'axe des ordonnées) chez une seule plante en fonction des jours après inoculation (dpi pour Days Post-Inoculation).

L'analyse de variance du paramètre MSS (Maximum Symptom Score = score maximal de symptôme, à la fin de l'expérience) ne montre aucune différence significative ni entre les isolats de rhizobium entre eux ni en comparaison avec les témoins positifs (**Annexe 48**).

1. 2. Essai de protection contre V. alfalfae avec plantes âgées de 13 jours

Dans une deuxième expérience, les plantes ont poussé 6 jours avant l'inoculation avec rhizobium afin d'avoir des racines mieux développées pour initier la symbiose. L'inoculation avec *V. alfalfae* était réalisée après 7 jours de croissance de plus.

a. préinoculation avec les isolats tunisiens de Rhizobium

La **Figure 45** montre les courbes d'évolution des symptômes de la maladie chez la lignée F83005.5 pré-inoculée avec 35 isolats de rhizobium ; des plantes témoins positifs inoculées seulement avec V31.2 et des plantes témoins négatifs non inoculées ni avec des rhizobiums ni avec le champignon ont été rajouté à l'essai.

On remarque que les courbes des plantes inoculées avec les différents isolats de rhizobium n'ont pas toutes la même tendance que les courbes des plantes témoins positif. L'agressivité de V31.2 sur la lignée F83005.5 semble varier suite à l'inoculation des rhizobiums. Certaines courbes semblent avoir une courbure moins accentuée que celles des témoins positifs, comme par exemple avec l'isolat B.oun3. L'analyse ANOVA de l'AUDPC montre une différence hautement significative avec une p-value de $1{,}11e^{-12}$ (**Annexe 49**). L'analyse de variance de MSS (Maximum Symptom Score = score maximal de symptôme) montre aussi une différence significative avec une p-value de $3{,}52e^{-9}$ (**Annexe 50**). L'**Annexe 51** montre les valeurs moyennes d'AUDPC et de MSS calculées chez les plantes inoculées avec les différents isolats de Rhizobium.

b. Pré-inoculation avec des mutants de la souche de Rhizobium RCR2011

Les isolats tunisiens naturels n'ayant pas montré un effet antagoniste contre *V. alfalfae*, des mutants de la souche RCR2011 ont été créés afin d'augmenter la probabilité de trouver un rhizobium (naturel ou mutant) capable d'inhiber la croissance du champignon.

La **Figure 46** montre les courbes d'évolution des symptômes de la maladie chez la lignée F83005.5 inoculée avec RCR2011 et 44 de ses mutants ; des plantes témoins positifs inoculées seulement avec V31.2 et des plantes témoins négatifs non inoculées, ni avec des isolats de rhizobium ni avec le champignon ont été ajouté à l'essai.

Tableau 18. AUDPC de *M. truncatula* inoculées avec 11 isolats de Rhizobium (H4, B1, II3.23/4, 10.23/R29, H3, O.M6, B.oun5, O.M2, B.oun2, O.M3, Mt13) en plus du contrôle positif.

Les valeurs ont été obtenues à partir d'au moins 8 plantes pour chaque traitement. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en excluant les témoins négatifs. Les isolats avec la même lettre sont dans le même groupe. PJ : plantes jeunes, PA : plantes âgées.

Isolat de Rhizobium	**AUDPC**
PJ	0,0136 a
PA	0,0126 b

Les courbes de l'évolution des symptômes de la maladie montrent que la maladie n'évolue pas de la même façon sous l'effet des différents mutants. Il apparait des courbes avec des symptômes plus forts, comme le cas des plantes inoculées avec le mutant Mt25, d'autres qui ont une évolution similaire aux plantes non pré-inoculées avec du rhizobium (par exemple les plantes inoculées avec Mt23, Mt28, Mt17), mais aussi des courbes de symptômes plus faibles comme les plantes pré-inoculées avec les mutants Mt13, Mt40, Mt35, Mt19, Mt33 et Mt4. Les analyses ANOVA de l'AUDPC et du MSS confirment ces observations, et montrent une différence hautement significative pour l'AUDPC entre les isolats de rhizobium avec une p-value de $1{,}2e^{-5}$ (**Annexe 52**) et avec une p-value de $1{,}16e^{-5}$ pour le MSS (**Annexe 53**). Or le test de Student Newman keuls ne montre pas de groupes de moyenne très différents du groupe des plantes contrôle positifs (**Annexe 54**).

1. 3. Comparaison entre inoculation à des plantes jeunes et des plantes âgées

En se basant sur les résultats du chapitre 1. 1 et 1. 2, dix isolats naturels de Rhizobium (H4, B1, II3.23/4, 10.23/R29, H3, O.M6, B.oun5, O.M2, B.oun2, O.M3) et 1 mutant RCR2011 (Mt13) ont été sélectionnés pour ce test. L'essai a été fait sur 2 âges différents, afin de voir l'effet de l'inoculation précoce et tardive de ces rhizobiums sur la pathogénicité de la souche V31.2 de *Verticillium alfalfae*. Les courbes de symptômes sont établies et les valeurs de l'AUDPC et du MSS sont calculées.

L'analyse ANOVA de l'AUDPC (**Annexe 55**) montre une différence significative pour l'âge des plantes au moment de l'inoculation avec une p-value de 0,0162, et une différence subsignificative entre les différents isolats de Rhizobium et le contrôle positif. Le test SNK met tous les isolats de rhizobiums, y compris le contrôle positif, dans un même et unique groupe de moyenne qui varie entre 0,0150 et 0,0120 (**Tableau 18**). L'analyse ANOVA du MSS (**Annexe 56**) ne montre aucune différence significative pour l'âge des plantes et les isolats de rhizobium.

2. Essais d'antagonisme *in vitro en utilisant les isolats de rhizobium et des champignons pathogènes*

Le but de cet essai est de voir si les isolats de rhizobiums de cette collection sont capables d'inhiber la croissance de *V. alfalfae in vitro*. Une confrontation directe sur boîte de Pétri, avec milieu PDA, a été faite sur la souche V31.2 de *V. alfalfae* en première partie. Un criblage des mutants RCR2011 a été réalisé et aucun mutant n'a montré un effet antagoniste à

Tableau 19. Pourcentages d'inhibition de la souche V31.2 à partir de culture solide de rhizobium.
Les valeurs de la première répétition biologique sont obtenues à partir de 2 boîtes et les valeurs de la deuxième répétition biologique sont obtenues à partir de 3 boîtes.

Isolats de Rhizobium	Moyenne Pourcentage d'inhibition RB1	Moyenne pourcentage d'inhibition RB2
10.23/R29	0	0
B.oun1	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
B.oun2	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
B.oun3	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
B.oun4	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
B.oun5	11,52 ± 2,15	23,96 ± 6,52
B.oun6	Arrêt de croissance au contact	0
B1	0	1,90 ± 1,65
B2	27,21 ± 3,12	20,04 ± 5,61
B3	31,82 ± 0	18,30 ± 11
B4	36,44 ± 2,34	40,20 ± 11,68
B6	30,91 ± 1,29	28,03 ± 7,5
H1	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
H2	Arrêt de croissance au contact	0
H3	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
H4	0	0
II 3.23/4	29,50 ± 1,32	Arrêt de croissance au contact
J13	23,11 ± 1,26	14,34 ± 12,4
J15	29,70 ± 2,99	Arrêt de croissance au contact
O.M1	0	0
O.M2	0	6,81 ± 1,75
O.M3	Arrêt de croissance au contact	4,76 ± 1,65
O.M4	0	18,27 ± 16,13
O.M5	0	0
O.M6	0	Arrêt de croissance au contact
O.Mn10	26,19 ± 3,37	5,71 ± 7,56
O.Mn11	18,42 ± 26,05	0
O.Mn12	Arrêt de croissance au contact	30,34 ± 3,23
O.Mn13	Arrêt de croissance au contact	0
O.Mn5	0	0
O.Mn6	31,68 ± 4,39	34,13 ± 1,37
O.Mn7	0	26,43 ± 2,16
RCR2011	0	4,97 ± 1,6
Th1	17,69 ± 3,26	17,23 ± 10,2
Th2	0	9,39 ± 4,15
Th4	43,14 ± 6,62	33,20 ± 7,6

V31.2. En deuxième partie de ce chapitre, d'autres champignons disponibles au laboratoire ont été testés avec les isolats naturels de rhizobium.

2. 1. Antagonisme contre V31.2 sur milieu PDA

Des expériences d'antagonisme direct ont été faites entre la souche de *Verticillium alfalfae* V31.2 et les 36 isolats de rhizobium de la collection.

Dans la première expérience, les rhizobiums viennent d'une culture solide sur boîte de Pétri avec du milieu YEMA (**Tableau 19**), alors que dans la deuxième expérience, les rhizobiums proviennent d'une culture YEM liquide. Les pourcentages d'inhibition sont calculés à partir de boîte témoin où le champignon a poussé seul, sans ensemencement de rhizobium. Certains isolats ont montré un pouvoir inhibant et, dans ce cas, le pourcentage d'inhibition a été calculé par rapport aux boîtes témoins. Dans certains cas, la croissance du champignon s'arrête au contact de la strie de la bactérie et n'évolue plus. Dans d'autres cas, le champignon pousse sur la strie et continue sa croissance.

Il apparait que les pourcentages d'inhibition varient entre la première et la deuxième expérience, mais aussi entre les répétitions. Dans la première expérience, 5 isolats (10.23/R29 ; H4 ; O.M1 ; O.M5 et O.Mn5) ne montrent aucun effet inhibiteur contre la souche V31.2 de *Verticillium alfalfae* ni dans la première, ni dans la deuxième répétition 6 isolats (B.oun1 ; B.oun2 ; B.oun3 ; B.oun4 ; H1 et H3) où la croissance du champignon s'arrête au contact du rhizobium, 10 isolats (B.oun5 ; B2 ; B3 ; B4 ; B6 ; J13 ; O.Mn6 ; O.Mn10 ; Th1 et Th4) qui montrent une inhibition reproductible de V31.2 et ainsi 15 isolats (environ 45% du total des isolats de la collection) qui ne montrent pas le même effet inhibiteur en comparant les deux répétitions.

Dans la deuxième expérience dans laquelle des isolats rhizobiums ont été utilisés à partir de culture YEM liquide (**Tableau 20**), aucun isolat n'a montré un effet inhibiteur reproductible entre les deux répétitions biologiques, 2 isolats (B6 et H1) ne montrent pas d'inhibition dans les deux répétitions biologiques, 7 isolats (10.23/R29 ; H2 ; H4 ; O.M2 ; O.M5 ; O.M6 et Th1) où la croissance du champignon s'est arrêté au contact du rhizobium et enfin 27 isolats (soit 75%) où le résultat change d'une répétition à une autre.

La non reproductibilité des résultats entre les répétitions techniques et biologiques dans la deuxième expérience ne permet pas de sélectionner un isolat de rhizobium capable d'inhiber V31.2. Néanmoins, d'après la première expérience, dix isolats (B.oun5 ; B2 ; B3 ; B4 ; B6 ;

Tableau 20. Pourcentages d'inhibition de la souche V31.2 à partir de culture liquide de Rhizobium.
Les valeurs de la première répétition biologique sont obtenues à partir de 2 boîtes et les valeurs de la deuxième répétition biologique sont obtenues à partir de 3 boîtes.

Isolats de Rhizobium	**Moyenne Pourcentage d'inhibition RB1**	**Moyenne Pourcentage d'inhibition RB2**
10.23/R29	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
B.oun1	30,62 ± 0,55	Arrêt de croissance au contact
B.oun2	38,53 ± 9,95	0
B.oun3	28,79 ± 6,56	Arrêt de croissance au contact
B.oun4	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
B.oun5	39,01 ± 0,67	Arrêt de croissance au contact
B.oun6	50 ± 0	Arrêt de croissance au contact
B1	0	Arrêt de croissance au contact
B2	0	Arrêt de croissance au contact
B3	0	Arrêt de croissance au contact
B4	56,72 ± 2,95	Arrêt de croissance au contact
B6	0	0
H1	0	0
H2	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
H3	36,83 ± 1,16	Arrêt de croissance au contact
H4	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
II3.23/4	64,15 ± 1,45	Arrêt de croissance au contact
J13	28,19 ± 2,65	0
J15	Arrêt de croissance au contact	0
O.M1	7,43 ± 6,67	Arrêt de croissance au contact
O.M2	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
O.M3	25 ± 0	Arrêt de croissance au contact
O.M4	34,71 ± 2,64	Arrêt de croissance au contact
O.M5	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
O.M6	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
O.Mn10	38,27 ± 2,6	Arrêt de croissance au contact
O.Mn11	44,79 ± 3,61	0
O.Mn12	38,27 ± 2,6	Arrêt de croissance au contact
O.Mn13	44,79 ± 3,61	0
O.Mn5	35,42 ± 3,61	Arrêt de croissance au contact
O.Mn6	35,42 ± 3,61	Arrêt de croissance au contact
O.Mn7	0	Arrêt de croissance au contact
RCR2011	0	Arrêt de croissance au contact
Th1	Arrêt de croissance au contact	Arrêt de croissance au contact
Th2	45,83 ± 1,80	Arrêt de croissance au contact
Th4	35,01 ± 4,11	Arrêt de croissance au contact

J13 ; O.Mn6 ; O.Mn10 ; Th1 et Th4) pourraient être susceptibles d'inhiber *V. alfalfae*, même si le pourcentage d'inhibition reste faible.

2. 2. Essais d'antagonisme contre d'autres espèces de champignons

Le choix des champignons utilisés dans ce test a été fait grâce à leur disponibilité au laboratoire. Les souches de Verticillium sont connues pour leur pathogénicité contre *M. truncatula*, et le genre Fusarium est connu pour sa pathogénicité contre plusieurs espèces de légumineuses, y compris *M. truncatula*.

a. Antagonisme contre la souche LPP0323 de *Verticillium. non-alfalfae*

Un premier screening a donnée 4 isolats qui auraient une tendance antagoniste contre ce champignon. Ces isolats sont B.oun6 ; H3 ; H4 et O.Mn10. Or en répétant le test seul l'isolat H4 a montré un effet antagoniste envers LPP0323.

b. Antagonisme contre la souche JR2 de *Verticillium dahliae*

Un premier criblage **(Figure 47**) a été fait avec tous les isolats de rhizobium. Ce criblage a donné lieu à 6 isolats potentiellement antagonistes mais seul H2 a gardé ce potentiel lors d'un deuxième test.

c. Antagonisme contre Fusarium

- Aucun isolat de Rhizobium n'a montré un effet antagoniste contre une espèce de Fusarium sp isolée à partir de champs de luzerne à Port la nouvelle (**Figure 48**), et contre 3 autres souches de Fusarium obtenus du laboratoire de biochimie et de technobiologie (**Figure 49**).

L'étude du pouvoir antagoniste des isolats de Rhizobium testés contre différentes espèces de Verticillium et de Fusarium n'a pas permis de sélectionner un isolat capable de lutter contre ces pathogènes de plantes.

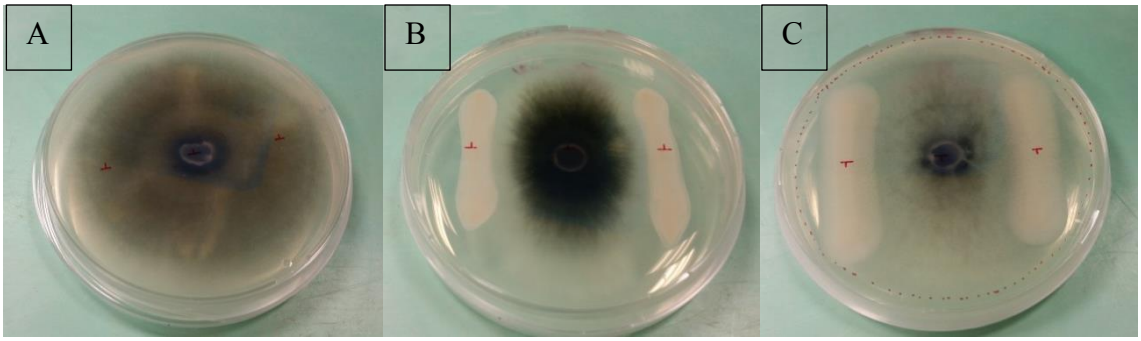


Figure 47. Confrontation directe entre la souche JR2 de *V. dahliae* et des isolats de rhizobium. A : boîte témoin ; B : H2 vs JR2 (le mycélium s'arrête au contact du rhizobium) ; C : Aspect d'une souche non antagoniste (le mycélium dépasse le strie de la bactérie).

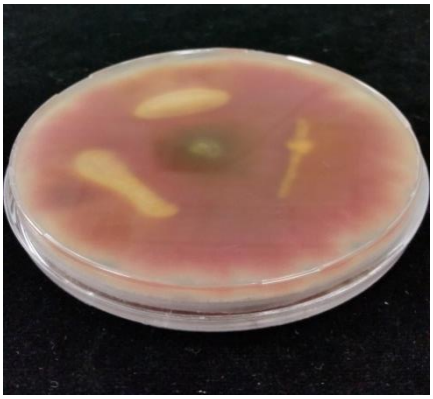


Figure 48. Confrontation directe avec Fusarium sp de Port la nouvelle.

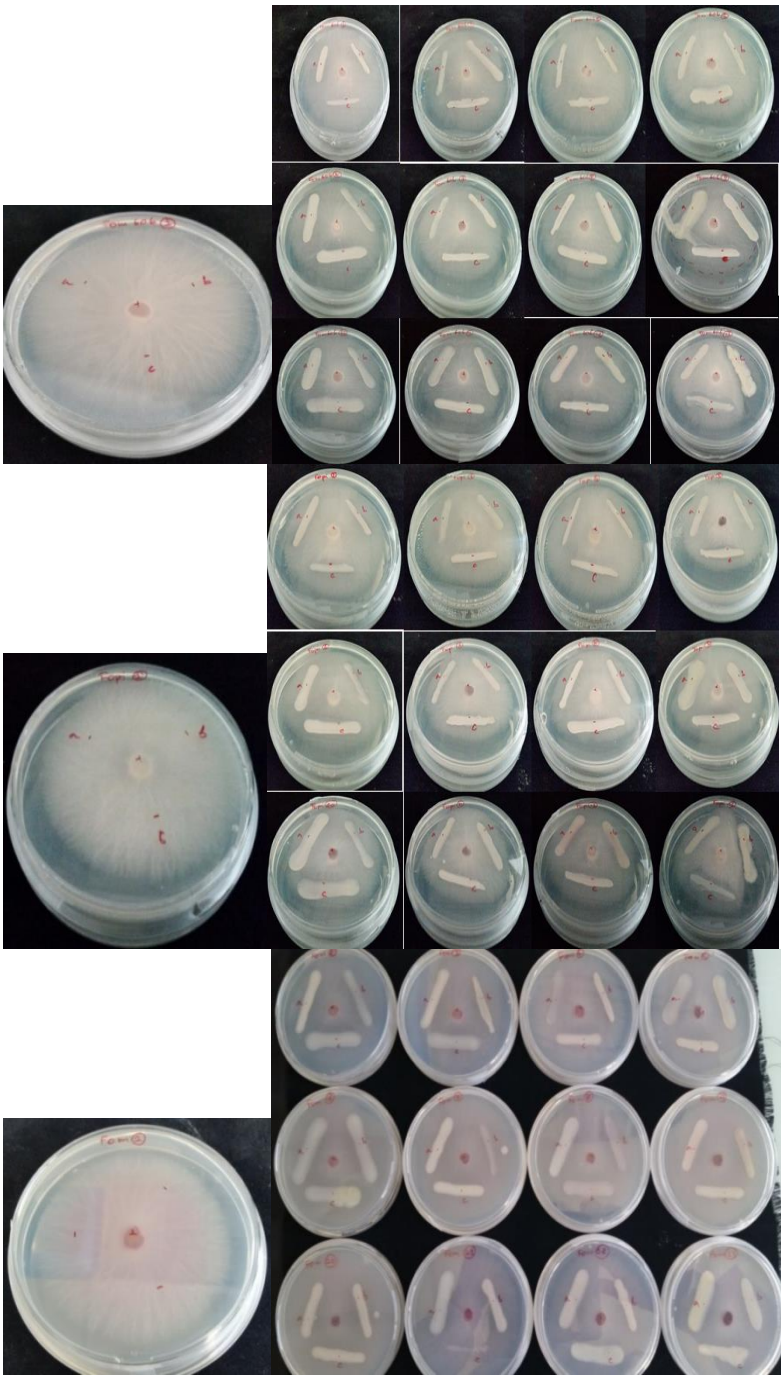


Figure 49. Confrontation directe avec Fusarium spp.

D. Discussion

I. Constitution d'une collection d'isolats de rhizobium

La collection des 31 isolats de rhizobium a été faite à partir de nodules de plantes de *M. truncatula* collectées au centre de la Tunisie.

Contrairement à l'espèce pérenne *M. sativa*, *M. truncatula* est une espèce annuelle qui pousse spontanément et abondamment dans tout le pays, de l'étage bioclimatique humide à l'étage saharien. Elle représente une proportion importante de la flore tunisienne indigène (Seklani et Hassen, 1990). Les six sites d'échantillonnage appartiennent à l'étage bioclimatique aride supérieur, caractérisé par une faible pluviométrie qui varie entre 300 et 500 mm/an.

Les populations naturelles de Rhizobia associées à *M. Truncatula* sont apparentées aux deux espèces *Sinorhizobium meliloti* et *S. medicae*. On en déduit donc que, mis à part les 5 souches ajoutés à la collection et qui appartiennent à l'espèce *S. meliloti*, les 31 isolats de la collection pourraient appartenir à l'une des deux espèces citées. Plusieurs études ont montré que l'établissement d'une symbiose entre une légumineuse et un rhizobium pourrait être affecté par plusieurs facteurs d'ordre pédoclimatiques ou liés à la plante hôte. Zribi et al. (2004) ont montré que certaines populations de *M. truncatula* récupérées dans certains sols étaient restrictives à l'égard d'une espèce rhizobiale.

II. Evaluation de la performance symbiotique des isolats de rhizobium

1. Infectivité

L'infectivité des 36 isolats de rhizobiums a été testée *in vitro* avec les 2 lignées de *M. truncatula* A17 et F83005.5.

Bien que les résultats de l'essai *in vitro* aient montré une grande variation de nodulation entre les couples isolat de rhizobium*lignée, la moyenne du nombre de nodules reste très faible et ne dépasse pas les 6 nodules par plante. Ceci est en accord avec les résultats montrés par Barbulova et Chiurazzi (2005), qui ont montré une faible nodulation de plantes de *Lotus japonicus* inoculées avec la souche R7A de *Rhizobium loti*, avec une moyenne de 8 nodules par plante. Des essais *in vitro* d'inoculation de *Sinorhizobium meliloti* sur des plantes de luzerne, sur 3 supports différents (vermiculite, papier filtre et gélose), ont montré que les plantes cultivées sur le support gélose ont développé le plus faible nombre de nodules ; 4,5 nodules par plante pour le support gélose contre 8,75 et 12,5 nodules par plante pour les supports papier filtre et vermiculite respectivement. La même étude (Obame, 1980), a mis en

évidence que tous les nodules apparaissent seulement sur les portions de racines se trouvant hors de la gélose et qu'aucune portion de racine sur la gélose ne présentait de nodules.

La comparaison de la nodulation *in vitro* avec celle en serre ou en phytotron a montré des résultats différents. La nodulation *in vitro* de la lignée A17 a été supérieure à celle de la lignée F83005.5. Le test de nodulation au phytotron avec les 4 isolats de rhizobium O.Mn13, II3.23/4, J13 et B.oun2 a montré le même résultat, alors que les résultats de l'essai avec les 12 isolats inoculés à des plantes cultivées en serre et au phytotron n'ont pas toujours été comparables aux résultats *in vitro*. Certains isolats ont montré plus de nodules chez F83005.5 que chez A17, d'autres n'ont montré aucun nodule au phytotron alors qu'ils ont montré des nodules en serre et *in vitro*. L'absence de nodules chez certaines combinaisons n'est donc pas liée à la spécificité hôte-symbionte, mais plutôt aux conditions de culture.

2. La nodulation et la fixation symbiotique d'azote sont fortement corrélées et dépendent du génotype de la plante et de la bactérie symbiotique

Seize isolats de Rhizobium provenant de différents sites d'échantillonnage et avec une capacité contrastée à solubiliser le phosphate ont été sélectionnés pour étudier la symbiose, son effet sur la croissance des plantes et d'éventuels effets sur la nutrition phosphatée. Ces 16 isolats de Rhizobium ont été inoculés à quatre lignées différentes de *M. truncatula* d'origine géographique différente et avec un comportement contrasté connu en matière de résistance aux maladies (Ramírez-Suero et al., 2010 ; Ben et al., 2013a,b ; Negahi et al., 2013) ou en matière de stress abiotique, comme le cadmium ou le stress salin (Rahoui et al., 2015 ; Arraouadi et al., 2011). Les lignées A17 et DZA315.16 diffèrent également dans leur interaction symbiotique avec la souche RCR2011 de *Sinorhizobium meliloti*. Plusieurs QTL impliqués dans le contrôle de la nutrition azotée ont été décrits (Moreau et al., 2012).

Comme discutés précédemment, les résultats de ces expériences montrent une grande variabilité dans la nodulation et ses effets sur le poids des parties aériennes, racinaires et la teneur en azote.

Dans l'essai sous serre, le nombre de nodules maximum correspond à la combinaison H3*A17, avec 54,33 nodules par plante. Dans le premier essai au phytotron, l'isolat Th2 inoculé à A17 a donné le nombre de nodules le plus élevé (98,89 nodules par plante). Dans le deuxième essai au phytotron, c'est l'isolat O.Mn13 inoculé à la lignée A17 qui donne le plus de nodules (66,39 nodules par plante). Dans les trois expériences de symbiose, le nombre

maximum de nodules a donc été obtenu chez la lignée A17. Il est possible de dire que la lignée A17 est bien adaptée à la symbiose avec beaucoup d'isolat de rhizobium.

La différence entre les résultats de l'essai sous serre et l'essai au phytotron pourraient être liée aux conditions de culture. Les conditions en serre sont moins contrôlées qu'au phytotron.

La biomasse aérienne de *M. truncatula* augmente considérablement avec l'inoculation de rhizobium. Les poids des plantes inoculées des lignées A17, F83005.5 et DZA315.16 ont augmenté d'au moins 1,5 fois, celui de TN8.3 inoculée avec O.Mn13 a même triplé. Ces résultats illustrent bien l'effet bénéfique de la symbiose de Rhizobium et son potentiel comme alternative aux engrais azotés chimiquement synthétisés. De même, Fitouri et al. (2012) ont signalé que l'inoculation rhizobienne de *Sulla coronarium* L. et de *Rhizobium sullae* HC14 favorisait la hauteur des plantes et la production de biomasse, comme une fertilisation avec 90 unités d'azote. Il faut noter que la lignée A17, moins performante que DZA315.16 dans l'interaction avec *Sinorhizobium meliloti* RCR2011 (Moreau et al., 2012), présentait des nombres de nodules plus élevés et une augmentation de la biomasse des plantes comme DZA315.16 avec les isolats tunisiens. Ceci met en évidence l'existence d'un fort effet du génotype et de l'isolat pour l'efficacité symbiotique.

L'essai mené en phytotron avec les 4 isolats de rhizobium B.oun2, II3.23/4, J13 et O.Mn13 a montré que la symbiose avec des isolats de rhizobium augmente la bimasse aérienne des plantes d'au moins une fois et demi par rapport la biomasse des plantes témoins. L'inoculation de l'isolat O.Mn13 à des plantes de *M. truncatula* de la lignée TN8.3 a entrainé une augmentation de 3 fois de la biomasse aérienne par rapport aux plantes témoins de la même lignée. Selon Marroqui et al. (2001), les effets du génotype de la plante et/ou de la bactérie peuvent jouer un rôle sur l'état énergétique de la bactérie et donc sur la fixation de l'azote, puisque ce processus nécessite une grande quantité d'énergie. Ils montrent dans leur étude que l'inoculation de plants de haricot avec une souche mutante de *Rhizobium tropici*, dont la respiration est améliorée grâce à une modification génétique, a entraîné une augmentation significative du nombre de nodules et du poids sec des plantes de 20% à 38% par rapport à l'inoculation avec la souche sauvage. De même, l'augmentation de la croissance des plantes stimulée par des mutants *R. tropici glgA* pourrait principalement être due soit à une grande efficacité de la fixation d'azote par les bactéroides, soit à l'augmentation de la nodulation (qui ne semble pas être due à l'altération de la respiration), soit aux deux. Cependant, vu que la plante en général a tendance à contrôler le nombre de nodules formés et vu que ceci est lié aux niveaux d'azote fixé par les Rhizobium, la nodulation est souvent

augmentée chez les plantes inoculées avec des rhizobiums défectueux pour la fixation de l'azote.

Selon les mêmes auteurs, la respiration bactérienne est essentielle pour la fixation symbiotique de l'azote de deux manières : l'ATP nécessaire à la fixation de l'azote provient de la phosphorylation oxydative et la respiration élimine l'oxygène en empêchant l'inactivation de la nitrogénase par l'oxygène.

Yurgel et al. (1998), ont mis en évidence des mutants de *Sinorhizobium meliloti* ayant augmenté la respiration et la performance symbiotique sur des plantes d'alfalfa (*Medicago sativa* cv Wega). La biomasse aérienne sèche des plantes inoculées avec ces mutants a dépassé de plus de 56% celle des plantes inoculées avec la souche sauvage.

Malgrés ces constations, Marroqui et al. (2001) n'ont pas pu déterminer si l'amélioration des performances symbiotiques était due à l'absence de glycogène ou à l'augmentation du potentiel respiratoire.

Les effets du génotype sur la synthèse de l'éthylène peuvent également être impliqués. Chez la luzerne, environ 95 à 99% des progressions de fil d'infection avortent dans le cortex (Vasse et al., 1993), probablement en raison du taux élevé d'éthylène. Cependant, certaines souches de rhizobium améliorent la nodulation en abaissant les niveaux d'éthylène dans leurs légumineuses hôtes, en produisant des enzymes dégradant le précurseur de l'éthylène ou l'inhibiteur de la biosynthèse de l'éthylène rhizobiotoxine (Okazaki et al., 2004). L'abaissement du niveau d'éthylène chez les légumineuses a pour résultat l'augmentation du nombre de nodules et de la biomasse de la plante de 25 à 40% (Ma et al., 2004).

L'inoculation de 4 isolats de rhizobium à des plantes de *M. truncatula* a montré un effet positif sur la fixation symbiotique d'azote. Toutes les plantes inoculées par des rhizobiums ont eu une augmentation de la quantité d'azote totale dans la partie aérienne. Dans certains cas, la quantité d'azote a été deux fois plus importante que chez les plantes témoins, comme chez les plantes d'A17 inoculées avec la souche J13 de *S. meliloti*. La corrélation nombre de nodules/fixation d'azote a été confirmée par les plantes de la lignée F83005.5, inoculées avec l'isolat de rhizobium B.oun2. La quantité d'azote totale était comparable à celle des plantes témoins, ce qui pourrait très probablement être dû au faible nombre de nodules formés. Marroqui et al. (2001) concluent que la performance symbiotique accrue des plantes de *Phaseolus vulgaris*, inoculées par une souche mutante A554 de *R.tropici*, pourrait être due à

une fixation accrue de l'azote par des nodules individuels ou à une augmentation de la nodulation.

Une forte interaction génotype * isolat a été observée dans cette étude. Les lipochitooligosaccharides rhizobiens, connus sous le nom de facteurs Nod et qui sont nécessaires pour la reconnaissance spécifique de l'hôte, pour la morphogenèse des nodules et pour l'infection bactérienne, présentent une variation structurelle qui défit la base de la spécificité hôte-symbiote, en particulier au niveau de l'espèce (Radutoiu et al., 2007). En plus des facteurs Nod, les rhizobiums utilisent également des effecteurs sécrétés ou des MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) comme des polysaccharides de surface pour faciliter leur invasion de l'hôte (Wang et al., 2017).

3. Fort effet du génotype et de l'isolat de rhizobium sur l'efficacité symbiotique

Contrairement à la biomasse des parties aériennes, la biomasse racinaire de toutes les plantes inoculées avec des rhizobiums a été considérablement réduite. Tous les rapports poids inoculés / poids témoins sont inférieurs à 1.

Ceci est en accord avec certaines observations, selon lesquelles en présence d'azote sous forme d'urée, des plants de *Pisum sativum* ont une meilleure croissance racinaire que les plantes qui dépendent strictement de la symbiose fixatrice d'azote atmosphérique. Ceci montre donc que les coûts en carbone de la fixation de N_2 limitent la croissance des racines. En revanche, la croissance des racines chez les plantes qui dépendent strictement de la fixation symbiotique d'azote n'a pas été affectée chez *Vicia faba* malgré les coûts de carbone élevés pour la réduction de N_2 (Schulze et al., 2000).

Voisin et al. (2002) suggèrent que plus la fixation d'azote symbiotique est inhibée, plus la croissance des racines est améliorée et que, durant la période de croissance végétative précoce, la croissance des racines est en compétition avec la morphogenèse des nodules dans un sol avec une faible disponibilité en N minéral.

Des cytochromes ont été décrites comme composants majeurs de la chaîne respiratoire en aérobiose chez certains rhizobium comme *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium etli*, *Azorhizobium caulinodans* (Barquera et al., 1991 ; Poole, 1998 ; Kitts et Ludwig, 1994) et *R. tropici* (Gabel et al., 1994). Une cytochrome c oxydase de type cbb3, avec une forte affinité pour l'oxygène, facilite la respiration dans les nodules où les

niveaux d'oxygène sont faibles. Les sous-unités de cette oxydase sont codées par les gènes fixNOQP, qui ont été décrits dans la plupart des rhizobiums (Poole, 1998).

D'après (Soberon et al. 1997), l'induction des gènes fix NOQP dans des conditions de vie libre a augmenté la respiration chez deux mutants de *R. etli* (espèce apparenté de *R. tropici*). L'un de ces mutants a augmenté la teneur en azote des plantes de *Phaseolus vulgaris* de 22 à 25% par rapport à la souche de type sauvage (Miranda et al., 1996).

La différenciation bactérienne que subit *Sinorhizobium meliloti* dans les nodules de *M. truncatula* est associée à l'expression de centaines de peptides hôtes appelés NCRs (nodule-specific cysteine-rich) (Zielke et al., 2010). Selon Liu et al. (2014), aucun génotype hôte ou souche rhizobienne n'est alors systématiquement associé aux meilleures performances de fixation de l'azote car l'efficacité de la fixation de l'azote dépend des interactions génotype/génotype entre les partenaires symbiotiques. En fonction du génotype de l'hôte, la même souche bactérienne pourraient donc former des nodules fonctionnels (Fix^+) ou non fonctionnels (Fix^-)ou même ne pas former de nodules (Nod^-) (Liu et al., 2014).

Le phenotype Fix^- des nodules de A17 inoculée par la souche Rm41 de *S. meliloti* serait le résultat d'une incompatibilité entre les deux partenaires de la symbiose, puisque la même bactérie établit une symbiose efficace avec d'autres génotype de *M. truncatula* comme DZA315.16 (Liu et al., 2014). Yang et al. (2017) montre que les Rhizobium Rm41 sont capables de coloniser les cellules nodulaires d'A17 mais subissent une lyse après la différenciation en bactéroides.

Le criblage de la core collection d'accessions de *M. truncatula* utilisant plusieurs souches de *S. meliloti* par Liu et al. (2014) a montré qu'environ 40% des combinaisons plante-souche produisaient des nodules mais ne fixaient pas l'azote. Contrairement aux résultats de Liu et al. (2014), l'inoculation des 4 isolats de rhizobium aux différentes lignées de *M. truncatula* de l'essai au phytotron a montré que seule la combinaison B.oun2*F83005.5 sur un total de 16 combinaisons (6,25%) a produit des nodules mais qui à priori n'ont pas fixé d'azote. La quantité d'azote chez cette combinaison est plus faible que celle retrouvée chez les plantes témoins de F83005.5. Néanmoins, ces plantes ont subi une augmentation de la biomasse aérienne et une réduction de la biomasse racinaire comme toutes les autres plantes ayant montré beaucoup plus de nodules.

Un faible nombre de nodules (12,45 nodules par plante) a été trouvé sur les racines de plantes de F83005.5 inoculées avec l'isolat B.oun2, Or Wang et al. (2018), concluent que le

phenotype Fix$^-$ n'est pas dû à un manque d'infection mais à une dégradation bactérienne après différenciation.

III. Efficacité des isolats de rhizobium pour la solubilisation du phosphate

1. Capacités des isolats de rhizobium à solubiliser le phosphate *in vitro*

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) comprennent celles qui sont libres, des endophytes qui peuvent coloniser une partie ou la totalité des tissus intérieurs d'une plante, et celles qui forment des relations symbiotiques spécifiques avec des plantes telles que Rhizobia spp. et Frankia spp. (Glick, 2012).

Parmi les microorganismes du sol, certaines PGPR peuvent améliorer la croissance des plantes en fournissant des nutriments, comme le phosphore, directement à la plante ou en facilitant leur absorption. La capacité des micro-organismes à solubiliser les complexes phosphoreux a longtemps été attribuée à leur capacité à réduire le pH de l'environnement. Les acides organiques tels que le citrate, le lactate ou le succinate sécrétés par le PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) contribuent à la solubilisation du phosphate dans la rhizosphère; or cet effet est encore plus visible dans les sols basiques (Khan et al., 2010).

Aujourd'hui, plusieurs études ont montré que les microorganismes jouent un rôle important dans les trois composantes majeures du cycle P du sol. Les principaux mécanismes de solubilisation de P employés par les microorganismes du sol comprennent : (i) la libération de composés tels que les anions d'acides organiques, les siderophores, les protons, les ions hydroxyles, le CO_2, (ii) la minéralisation biochimique qui consiste en la libération d'ions inorganiques de P à partir de la forme organique par une catalyse enzymatique externe à la membrane cellulaire et (iii) la minéralisation biologique du phosphate à travers la libération de phosphore pendant la dégradation des substrats (McGill et Cole, 1981).

Dans cette étude, l'intérêt se porte sur des Rhizobia isolés à partir de nodules de *M. truncatula* au centre de la Tunisie et à leurs effets bénéfiques sur la plante hôte. Certains isolats de rhizobium ont montré une capacité à solubiliser le phosphate insoluble pour le rendre disponible aux plantes, et sont donc considérés comme des bactéries solubilisantes du phosphate (Charana Walpola et Yoon, 2012). Cette capacité de rhizobium est beaucoup moins étudiée que la fixation de l'azote dans les nodules, bien qu'elle ne semble pas être rare. En effet, dans cette collection de 36 isolats, 22 ont montré la capacité de solubiliser $CaHPO_4$ *in vitro*. La solubilisation du P inorganique par les PSB se produit principalement par la production d'acides organiques qui sont le produit du métabolisme microbien, principalement

la respiration oxydative ou la fermentation des sources organiques du carbone (Trolove et al. 2003). Ceci se produit en abaissant le pH via la voie d'oxydation directe qui se produit sur la face externe de la membrane cytoplasmique (Zaidi et al., 2009), en augmentant la chélation des cations liés à P, en rivalisant avec P pour les sites d'adsorption sur le sol, ou encore en formant des complexes solubles avec des ions métalliques (Ca, Al, Fe) associés au P insoluble (Omar, 1997). Bien que l'hypothèse de la diminution du pH soit la plus étudiée, Altomare et al. (1999), propose que l'acidification du milieu ne soit pas le mécanisme majeur de solubilisation, car la capacité de réduire le pH dans certains cas n'est pas corrélée à la capacité de solubiliser le P minéral.

Les principaux acides organiques libérés par les PSM dans la solubilisation du P insoluble sont l'acide gluconique (Bar-Yosef et al., 1999), l'acide oxalique, l'acide citrique (Kim et al., 1998), l'acide lactique, l'acide tartrique, l'acide aspartique (Venkateswarlu et al., 1984). Certains acides inorganiques comme l'acide chloridrique HCL (Kim et al., 1998), l'acide nitrique et l'acide sulfurique H_2S (Dugan et Lundgren, 1965) ont été décrits pour leur aptitude à solubiliser le P inorganique.

Tous les sites d'échantillonnage ont montré au moins un isolat capable de solubiliser le phosphate inorganique $CaHPO_4$ *in vitro*. Dans certains sites d'échantillonnage, comme à Sidi Ali Ben Aoun, tous les isolats de rhizobium ont montré une aptitude à solubiliser $CaHPO_4$ *in vitro,* alors que dans d'autres sites comme à Ouled Mnasser, très peu d'isolats ont montré cette aptitude. Compte tenu de ces résultats, il était donc tentant de penser que cela pouvait être lié à une adaptation locale aux conditions du sol. Or, aucune corrélation entre le site de l'échantillonnage et la solubilisation de phosphate n'a été mise en évidence. Trois hypothèses pourraient être avancées : une absence de corrélation, une taille de l'échantillon trop petite ne permettant pas d'établir des corrélations, ou un déséquilibre du nombre d'isolat au niveau des échantillons.

Contrairement au Phosphate inorganique, le phosphate organique ne peut être minéralisé que par des enzymes, telles que : (i) les phosphatases acides non-spécifiques (NSAPs) dont les plus abondants sont les phosphomonoestérases (Nannipieri et al., 2011) -pour lesquels certaines études comme : (Tarafdar et al., 2001), suggèrent que les phosphatases d'origine microbienne possèdent une plus grande affinité pour le Phosphate organique que les phosphatases d'origine racinaire, (ii) les phytases (Maougal et al., 2014), qui provoquent la libération du Phosphate à partir de la dégradation des phytates (Richardson et Simpson,

2011), (iii) les phosphonatases (Kumar et al., 2013) et les C-P lyases (Salimpour et al., 2010), qui clivent la liaison C-P des organophosphonates (Rodríguez et al., 2006).

2. Réponse des plantes de *Medicago truncatula* à la carence en phosphate soluble et effet de la présence de Rhizobia sur la croissance des plantes

La solubilisation de P à partir de microorganismes de la rhizosphère, y compris des bactéries favorisant la croissance des plantes et des champignons autres que les champignons mycorhiziens arbusculaires, a été suggérée comme un moyen naturel d'améliorer la nutrition des plantes. La plupart des études sur la solubilisation de P par des microorganismes est basée sur des essais *in vitro* avec différentes formes de P minéral, qui ne reflètent toutefois pas toujours ce qui peut se produire dans l'environnement naturel du sol (Bashan et al., 2013).

Dans la présente étude, les expériences de l'effet du $CaHPO_4$ sur la croissance des plantes en présence de rhizobium a montré un effet génotype sur la nodulation, mais aucune différence sur les autres paramètres de croissance étudiés.

L'essai sur sable avec $CaHPO_4$ comme seule source de phosphore a montré que toutes les plantes présentent beaucoup moins de nodules que dans l'essai sur un substrat terreau/perlite. Les niveaux de phosphore influencent la croissance des plantes directement et indirectement. Dans les interactions symbiotiques entre les légumineuses, il a été démontré que les niveaux de phosphore et d'autres apports nutritifs complémentaires influent sur la nodulation et la fixation de l'azote. Chez *Vigna unguiculata*, les niveaux élevés de phosphore ont augmenté la biomasse, le nombre de nodules et la teneur en azote (Jemo et al., 2017).

D'autre part, comme à l'essai au phytotron sur un substrat terreau/perlite, sur le substrat sable/perlite avec $CaHPO_4$ comme seule source de phosphore, la lignée A17 présente un nombre de nodules plus élevé que chez la lignée F83005.5. La même remarque s'applique sur l'essai en présence de phosphate rocheux et de phosphate soluble, dans lequel les plantes de F83005.5 inoculées avec J13 présentent plus de nodules que chez les plantes d'A17 inoculées avec le même isolat de rhizobium en présence de phosphate rocheux. L'effet du génotype sur la nodulation apparaît donc dans ces essais à l'exception de ce dernier cas. Dans le même contexte, il apparaît une différence significative de nodulation entre les isolats de rhizobium utilisés dans le test de solubilisation du phosphate rocheux en présence de plante. Kouas et al. (2008), et Abdi et al. (2012), suggèrent que les différences de nodulation et de croissance végétative sous une carence en phosphate pourraient être liées au génotype, à la souche de rhizobium et aux conditions expérimentales.

Dans les essais menés sur le substrat sable/perlite, les plantes sont de très petites tailles, ce qui montre que les conditions de culture sont très limitantes pour la croissance et le développement probablement à cause du manque d'éléments nutritifs. L'absence ou la déficience d'azote durant les premiers jours de culture et avant la formation de nodules pourrait être la cause de la mauvaise croissance des plantes.

Abdi et al. (2017), ont montré des relations évidentes entre la croissance, la nodulation et le statut interne de phosphore et d'azote en réponse à l'apport de Ca_3HPO_4. La souche de Rhizobium Ar02 isolée de nodules de plantes de *Phaseolus vulgaris* de sol déficient en phosphore de région semi-aride du nord de la Tunisie a été inoculée à trois variétés de haricot commun. Les résultats ont montré que la quantité de phosphore contenu dans les parties aériennes des plantes avait légèrement augmenté par rapport aux plantes témoins. Cette augmentation est statistiquement non significative.

L'amélioration de la nutrition de l'hôte en phosphate par les champignons mycorhiziens arbusculaires est bien documentée pour les écosystèmes naturels et les agroécosystèmes, le mycélium externe jouant un rôle clé dans l'absorption de phosphore en raison de la forte expansion de l'interface plante-sol (Smith et Smith, 2011). Cependant, selon plusieurs études comme Bagyaraj et al. (2015) , l'absorption de phosphate par des champignons mycorhiziens arbusculaires soit sous forme minérale, soit sous forme organique, est très probablement due à la solubilisation par des microorganismes solubilisant de phosphate associés.

Parallèlement aux résultats de Abdi et al. (2017), Les nodules retrouvés dans les essais avec $CaHPO_4$ ou phosphate rocheux comme seule source de phosphore sont de très petite taille. Schulze et Drevon (2005) ont montré que la formation de petits nodules est une forme d'adaptation à la carence en phosphore chez la luzerne.

IV. Antagonisme et protection des plantes

Les Rhizobia sont des bactéries connues pour leur aptitude à coloniser les racines des légumineuses et à créer une symbiose avec ces plantes. Cette symbiose est nécessaire pour la fixation d'azote atmosphérique à travers la formation de nodules. Or la fixation d'azote n'est pas la seule caractéristique des Rhizobia car elles ont aussi l'aptitude à stimuler la croissance des plantes et à réduire l'incidence des maladies sur les cultures. L'activité antagoniste des Rhizobia contre les pathogènes du sol est principalement liée à la production d'antibiotiques (Chandra et al., 2007), à l'acide cyanhydrique (Martínez-Viveros et al., 2010), à certaines enzymes mycolytiques (Sridevi et Mallaiah, 2008), aux siderophores, mais aussi à l'induction

de la résistance systémiques chez les plantes et l'amélioration de l'expression des gènes de défense chez la plante (Ramos et al., 1997).

Dans la littérature, plusieurs espèces de rhizobium ont été décrites comme des inhibiteurs naturels de certains agents pathogènes du sol. Parmi ces espèces, on peut citer ; *Rhizobium leguminosarum* décrit par Singh et al. (2010) contre *Fusarium oxysporum* chez le pois chiche, *Rhizobium japonicum* décrit par Al-Ani et al. (2012) contre *Macrophomina phaseolina* et *Fusarium solani* chez le soja, ainsi que d'autres espèces de Rhizobia non identifiées contre *Sclerotium rolfsii*, *Cylindrocladium parasiticum*, *Pythium* sp. Etc.

Dans cette étude, l'intérêt s'est porté en premier lieu sur l'activité antagoniste des isolats de rhizobium de cette collection contre la souche V31.2 de *Verticillium alfalfae*. Les résultats ont montré une grande variation entre les répétitions techniques et biologiques. Deux essais ont été réalisés, l'un à partir de culture solide de rhizobium et l'autre à partir de culture liquide. L'essai à partir de la culture liquide des Rhizobia a montré que seule la première répétition biologique a donné quelques inhibitions alors que, dans la deuxième répétition biologique, le champignon s'est développé au-delà de la strie du rhizobium ou s'est arrêté à son contact. Ceci pourrait être dû à la faible concentration des bactéries sur la strie. Dans ce sens, Al-Ani et al. (2012) ont montré que plus la concentration du filtrat de la souche de *Rhizobium japonicum* est faible plus la croissance radiale du *Fusarium solani* et de *Macrophomina phaseolina* est grande et plus le pourcentage d'inhibition diminue. Dans le premier essai où les Rhizobia ont été ensemencé à partir de culture solide, 10 isolats de rhizobium ont montré des résultats reproductibles, dont la souche J13 de *Sinorhizobium meliloti*.

Les isolats qui ont eu un effet antagoniste ont montré des zones d'inhibition. Selon Swadling et Jeffries (1996), les zones d'inhibition sont dues principalement à la production d'antibiotique, de métabolites toxiques ou de siderophores. D'après Berg et al. (2001), la composition des mécanismes antagonistes était spécifique à chaque isolat de la rhizosphère.

Plusieurs études (Kumar et al., 2013) ont mis en évidence une aptitude de quelques espèces de rhizobium à inhiber certaines espèces de Fusarium et à protéger les plantes contre la maladie qui en découle. Or tous les isolats de cette collection de rhizobium ont été testés vis-à-vis de 4 espèces de Fusarium et aucun isolat n'a montré un pouvoir inhibiteur.

L'infection artificielle de plantes de *Medicago truncatula* de la lignée F83005.5 a confirmé la sensibilité de cette lignée vis à vis de V31.2. Negahi et al. (2013) montre que la lignée

F83005.5 est plus sensible à la souche de *Verticillium alfalfae* V31.2 que vis à vis d'autres souches de la même espèce comme VA1, VA2 et LPP0323. Sbeiti (2015), montre que la souche V31.2 est plus agressive contre la lignée F83005.5 à 25°C qu'à 20 et 28°C. Mis à part l'agressivité, 25°C est aussi la température optimale pour la sporulation et la croissance de V31.2. Il est connu que la nodulation et la fixation symbiotique de l'azote sont très affectées par les températures extrêmes. Montafiez et al. (1995), montrent que indépendamment de la souche de rhizobium inoculée, la nodulation, l'azote provenant de la fixation atmosphérique et la croissance des plantes de *Glycine max* étaient les plus faibles à 15°C, avec une amélioration significative aux températures élevées et généralement meilleures à 25°C. D'après Bordeleau et Prévost (1994), la température affecte les légumineuses de manière non spécifique et par des processus métaboliques tels que la respiration, la photosynthèse, le transport et la transpiration.

Des tests de protection en phytotron à 25°C de la lignée F83005.5 contre la souche de Verticillium V31.2 ont été faits. Trente-six isolats de Rhizobium naturels et 44 mutants de RCR2011 ont été testés pour leur effet protecteur de la lignée F83005.5 et antagoniste à la souche V31.2 de *Verticillium alfalfae*.

En faisant des tests de protection avec une inoculation à des âges différents, l'âge des plantes à l'inoculation semble avoir un lien avec l'effet des Rhizobium sur le champignon. Il apparaît qu'en inoculant les isolats de Rhizobium et la souche de Verticillium à des plantes jeunes, les rhizobiums ne montrent aucun effet protecteur sur ces plantes. Les analyses statistiques des AUDPC et des MSS ne semblent pas concluant. Or, l'inoculation des isolats de rhizobium et du champignon à des plantes âgées montre des différences hautement significatives entre les isolats de rhizobium pour les paramètres AUDPC et MSS. Les tests de Student Newman et Keuls ne montrent pas de différences entre les plantes témoins et les plantes inoculées. Les mêmes résultats ont été retrouvés pour les mutants RCR2011. Ces différences entre les résultats de l'inoculation des plantes âgées et des plantes jeunes pourraient aussi être dues au manque de répétitions biologiques.

Contrairement à ces résultats, l'étude d'Erdogan et Benlioglu (2009) a confirmé qu'une réduction de l'AUDPC par rapport aux témoins non-bactérisés variait de 39,2% à 50,9% et de 22,1% à 36,8% dans les essais réalisés respectivement en 2005 et 2006 grâce à une bactérisation de semences de cotton par 4 souches fluorescentes (FP22, FP23, FP30 et FP35) de pseudomonoas spp. ainsi que la souche HRO-C48 de *Serratia plymuthica*.

Pour confirmer l'effet de l'âge des plantes à l'inoculation, un essai a été fait dans les mêmes conditions et en même temps avec 11 isolats de rhizobium et un contrôle positif (plantes inoculées avec seulement V31.2). L'essai a été fait avec une inoculation à deux âges différents. L'analyse de la variance de l'AUDPC a montré une différence significative entre les âges d'inoculation et subsignificatif entre les isolats de rhizobium. Ce résultat confirme ce qui a été trouvé auparavant. L'effet de l'âge et des isolats rhizobium n'est pas significatif dans le cas des MSS. Ces résultats montrent donc que l'âge des plantes à l'inoculation agit principalement sur la cinétique du développement de la maladie mais pas sur les symptômes à la fin de l'expérience. Il apparaît aussi que les isolats de rhizobium testés de cette collection, ainsi que les mutants RCR2011, ne montrent pas d'effet protecteur contre la verticilliose causée par la souche V31.2 de *Verticillium alfalfae*.

Malgré les résultats qui montrent que les isolats de rhizobium utilisés présentent une inhibition avec des niveaux variables d'effets sur la croissance radiale de *Verticillium alfalfae* V31.2 dans des conditions *in vitro*. Le criblage des isolats de rhizobium antagoniste à V31.2 n'a pas été concluant à cause du manque de reproductibilité entre les répétitions biologiques.

E. Conclusion et Perspectives

Par association avec des bactéries rhizosphériques appelées rhizobium, les légumineuses ont le pouvoir d'établir une association symbiotique fixatrice d'azote atmosphérique (N_2) au sein de structures racinaires appelées nodules, d'où leur importance. Cette caractéristique les rend indépendantes de source d'azote sous forme de nitrates ou d'ammoniaque présents dans le sol ou apportés par des engrais.

L'objectif de la présente étude était de déterminer des associations rhizobium/*M. truncatula* présentant la meilleure performance symbiotique, ayant l'aptitude à solubiliser le phosphate insoluble et capable de protéger les plantes de *M. truncatula* contre la verticilliose.

Dans une première étape, des plantes de *M. truncatula* ont été collectées, leurs nodules ont été séparés et des Rhizobia ont été isolés. 31 isolats purs de rhizobium ont été obtenus et conservés. Le premier chapitre de ce travail a été dédié au pouvoir et à l'efficacité symbiotique de ces isolats de rhizobium dans la croissance et le développement des plantes. Un test de nodulation *in vitro* en inoculant les 36 isolats de rhizobium aux deux lignées de *M. truncatula* A17 et F83005.5, a montré une différence hautement significative entre les isolats de rhizobium et les deux lignées de *M. truncatula*, ainsi qu'une forte interaction génotype*rhizobium. Le test a montré qu'environ 28% de ces isolats ne sont pas capables de noduler la lignée F83005.5 et environ 14% ne sont pas capables de noduler la lignée A17. Les isolats ne nodulant pas les lignées de *M. truncatula* utilisées proviennent des différents sites d'isolement.

Ensuite, 16 isolats de rhizobium ont été testés directement sur la plante en pot pour évaluer leur efficacité symbiotique et leur effet sur les paramètres de croissance de la plante. L'inoculation de rhizobium chez 4 lignées de *M. truncatula* a donc montré un effet positif sur la nodulation et l'amélioration des paramètres de croissance étudiés. Douze isolats parmi ces 16 ont été testés en serre et en phytotron, et ont montré quelques différences, en grande partie en ce qui concerne la nodulation. Certaines combinaisons génotype*rhizobium n'ont pas montré de nodules au phytotron, d'autres en serre. Ces combinaisons n'étaient pas forcément les mêmes combinaisons qui n'ont pas montré une nodulation *in vitro*. Quelques hypothèses ont été proposées pour expliquer cette différence, telles que les variations dans les conditions de culture, la perte de leur aptitude à noduler par mutation ou autre, ou d'une erreur de manipulation. Pour vérifier ces hypothèses, il serait judicieux de refaire ces essais afin

d’annuler l’effet répétition s’il y en a. Ces essais ont montré aussi que dans plusieurs cas, la nodulation a amélioré la biomasse aérienne.

Quatre isolats parmi les 16 ont été testés séparément et les résultats ont montré que l’inoculation de rhizobium a amélioré la production de la biomasse aérienne des plantes et a engendré une baisse considérable de la biomasse racinaire par rapport aux plantes témoins. Les teneurs en azote dans les parties aériennes de la plante ont aussi été affectées par l’inoculation de rhizobium. À l'exception des plantes F83005.5 inoculées avec l'isolat B.oun2, qui présentaient une très faible quantité d'azote dans les parties aériennes (et qui avaient également le plus petit nombre de nodules), toutes les plantes inoculées ont montré une augmentation équivalente à au moins une fois et demie la quantité d'azote chez les plantes témoins. Par conséquent, la nodulation améliore non seulement la croissance et la biomasse de *M. truncatula*, mais aussi sa valeur nutritionnelle en tant que plante fourragère. De mita (2012), suggère que des souches pourraient cesser de fixer l'azote et se diviser ou stocker le sucre plus tôt que des souches plus compétitives.

Cependant, le nombre de nodules et les augmentations de la biomasse végétale et de la teneur en azote n'étaient pas strictement corrélés, illustrant le fait que plusieurs couches de contrôle génétique et métabolique sont impliquées dans l'utilisation de l'azote pour la croissance et le développement des plantes. Selon plusieurs études, le génotype de la plante et du rhizobium n’agit pas seul sur la nodulation. En plus des effets du génotype des plantes hôtes et des bactéries, la nodulation et ses conséquences pour la plante et la viabilité de la communauté microbienne dans le sol pourraient être affectées par la température, le stress hydrique et la texture du sol (Mendes et Bottomley, 1998 ; Zahran, 1999). Ces facteurs n'ont pas été inclus dans la présente étude. Les résultats présentés dans ce travail, montrent que les microorganismes du sol tels que Rhizobia peuvent avoir de multiples effets bénéfiques et sont sans aucun doute un outil utile et durable pour augmenter les rendements agricoles. Mais ils montrent également que les spécificités de la souche et du génotype végétal, ainsi que les facteurs environnementaux, rendront difficile le développement de produits standardisés pour une telle approche. L'avenir réside probablement dans l'utilisation de mélanges de microorganismes, idéalement adaptés aux conditions environnementales locales. Pour aller plus loin, il faut donc continuer à chercher une souche de rhizobium efficace de point de vue agronomique en refaisant ces essais et aller jusqu’à la production de gousse afin d’évaluer l’effet de la nodulation sur les rendements.

Il serait intéressant de tester *in vitro* et en pot la nodulation de ces isolats de rhizobium utilisés dans la présente étude, avec d'autres lignées de *M. truncatula* et, notamment, des lignées tunisiennes, afin de comparer leur pouvoir nodulant et fixateur d'azote chez les différentes lignées. Cet essai permettrait d'établir des liens entre la nodulation de ces isolats de rhizobium et les facteurs éco-géographiques. Les études sur la gamme d'hôtes et l'infectiosité croisée sont importantes pour identifier des souches rhizobiennes susceptibles d'être utilisées comme inoculants en agriculture. Il est donc nécessaire de faire des essais au champ avec les souches de rhizobium sélectionnées pour leur efficacité symbiotique. Cependant, il a été démontré que les souches introduites dans un sol sont soumises à la concurrence des rhizobiums natifs ainsi que d'autres micro-organismes de ce sol. Par exemple, les agriculteurs peuvent être confrontés au problème des souches hautement compétitives mais peu efficaces qui remplacent les souches inoculées dans les nodules de leurs cultures (Kosslak et al., 1983).

Le deuxième chapitre de la thèse traite de la solubilisation du phosphate par les isolats de rhizobium. Les résultats ont montré qu'environ 60% des isolats sont capables de solubiliser le phosphate inorganique insoluble $CaHPO_4$. Comme la solubilisation du phosphate inorganique pourrait se faire par divers mécanismes, il est évident de devoir chercher les mécanismes utilisés par chaque isolat de rhizobium. Un essai pour identifier quel acide organique (ou inorganique), à quelle concentration et s'il y a un seul ou plusieurs acides organiques impliqués est nécessaire. En comparaison avec les essais de Collavino et al., (2010) réalisés avec du phosphate tricalcique $Ca_3(PO_4)_2$, les index de solubilisation trouvés dans leurs essais sont largement inférieurs aux index trouvés dans cette étude. Il serait donc important de faire des essais de solubilisation d'autres sources de phosphate inorganique par les isolats de rhizobium tunisiens.

D'autres essais en présence de phosphate insoluble en pot, comme le $CaHPO_4$ ou le phosphate rocheux à l'état brut, ont montré quelques effets bénéfiques sur la croissance aérienne des plantes. Mais ces effets restent très faibles. En présence de $CaHPO_4$, une différence significative du nombre de nodules entre les deux lignées de *M. truncatula* a été mise en évidence, mais aucun autre effet n'a été démontré. Avec $CaHPO_4$ comme seule source de phosphate, la lignée A17 montre un plus grand nombre de nodules que F83005.5. Le même résultat a été retrouvé dans les tests sur substrat terreau. En comparant l'effet du phosphate soluble vs le phosphate rocheux sur les plantes de *M. truncatula*, il apparaît que la nodulation, le nombre de feuilles et la biomasse racinaire augmentent dans le cas du

traitement avec du phosphate rocheux. Aucun effet du génotype ni de l'isolat de rhizobium n'a été détecté excepté pour la nodulation où il apparaît un effet rhizobium. Compte tenu que le phosphate rocheux brut ramène d'autres éléments comme du potassium, du fer, du carbone etc, la question qui se pose est de savoir si l'amélioration des paramètres de croissance par rapport aux témoins provient de la solubilisation du phosphate par les isolats de rhizobium ou de l'effet des autres éléments.

Dans le dernier chapitre, dans un premier temps, une évaluation de la capacité des isolats de rhizobium à lutter contre la verticilliose a été faite. Le genre Verticillium est un agent pathogène à large spectre d'hôte qui provoque d'énormes pertes de cultures chaque année et les pesticides chimiques sont inefficaces face à ce ravageur. Ainsi, des essais d'infection artificielle et d'inoculation de rhizobium ont permis le suivi de l'évolution des symptômes de la maladie. Les courbes de l'évolution de la maladie, ainsi que les analyses statistiques, n'ont pas permis d'identifier d'isolats permettant de protéger les plantes de *M. truncatula* contre la verticilliose. L'analyse statistique de l'AUDPC et du MSS n'ont pas montré non plus de résultats concluants. Des tests d'antagonisme direct ont aussi été réalisés entre la souche de Verticillium V31.2 et les isolats de rhizobium. D'autres espèces telles que Fusarium sp. et *Verticillium dahliae* ont aussi été testées. Les isolats de rhizobium de la collection tunisienne ont montré un faible effet inhibiteur contre *Verticillium alfalfae* mais qui s'est avéré non reproductible. Plusieurs espèces de bactéries comme Pseudomonas et Bacillus qualifiées de PGPR ont montrés leur aptitude à protéger les légumineuses contre certains champignons pathogènes comme Fusarium spp. (Karimi et al., 2012) et Rhizoctonia spp. (Elkahoui et al., 2014 ; Mrabet et al., 2013). Des essais d'antagonisme et de protection des plantes contre V31.2 avec ces bactéries pourraient donner des résultats satisfaisant pour la lutte contre la verticilliose.

La co-inoculation avec des PGPR autres que des Rhizobia peuvent améliorer la nodulation par les Rhizobia en modifiant l'architecture des racines ou en diminuant les niveaux d'éthylène dans la racine, en libérant l'ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) désaminase. En ce sens, Shaharoona et al. (2006) ont rapporté que la co-inoculation du haricot mungo (*Vigna radiata L.*) avec la PGPR associée au Bradyrhizobium améliorait la nodulation de 48% par rapport à l'inoculation avec le Bradyrhizobium seul. Cet effet synergique peut également être provoqué par des taux de survie plus élevés des deux microorganismes dans la rhizosphère, comme rapporté par Afzal et al. (2010).

En résumé, la co-inoculation de rhizobium avec une autre espèce de PGPR pourrait être une bonne solution pour l'amélioration de la fixation symbiotique, les paramètres de croissance de la plante ainsi que la protection contre les pathogènes.

References bibliographiques

Abdi, N. (2012). Symbiotic responses to insoluble phosphorus supply in common bean (Phaseolus vulgaris L.): Rhizobia symbiosis. Afr. J. Biotechnol. 11 (19).

Abdi, N., Bargaz, A., L 'taief, B., Hmissi, I., Bouraoui, M. et Sifi, B. (2017). Rhizobial Symbiosis Efficiency Increases in Common Bean under Sparingly Soluble Calcium-Phosphorus. J. Plant Nutr. 40 (13) : 1829-1841.

Afzal, A., Asghari, B., et Mussarat, F. (2010). Higher soybean yield by inoculation with N-fixing and P-solubilizing bacteria. Agron. Sustainable Dev. 30 (2) : 487-495.

Al-ani, R.A., Adhab, M.A., Mahdi, M.H. et Abood, H.M. (2012). Rhizobium japonicum as a Biocontrol Agent of Soybean Root Rot Disease Caused by Fusarium solani and Macrophomina phaseolina. Plant Prot. Sci. 48 (4) : 149-155.

Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T. et Harman, G.E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus Trichoderma harzianum Rifai 1295-22. Appl. Environ. Microbiol. 65 (7) : 2926-2933.

Antoun, H. (2012). Beneficial Microorganisms for the Sustainable Use of Phosphates in Agriculture. Procedia Eng. 46 : 62-67.

Arianoutsou, M. et Thano, C. A. (1996). Legumes in the Fire-Prone Mediterranean Regions: an Example From Greece. Int. J. Wildland Fire 6 (2) : 77-82.

Arraouadi, S., Chardon, F., Huguet, T., Aouani, M.E. et Badri, M. (2011). QTLs Mapping of Morphological Traits Related to Salt Tolerance in *Medicago Truncatula*. Acta Physiologiae Plantarum 33 (3) : 917-926.

Ausubel, F.M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? Nat. Immunol. 6 : 973-979.

Bado, B.V. (2002). Rôle des légumineuses dans la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina Faso. Thèse de doctorat publiée, Université LAVAL. Québec. 197 pages.

Bagyaraj, D.J., Sharma, M.P. et Maiti, D. (2015). Phosphorus nutrition of crops through arbuscular mycorrhizal fungi. Curr. Sci. 108 (7) : 1288-1293.

Bar-Yosef, B., Rogers, R.D., Wolfram, J.H. et Richman, E. (1999). Pseudomonas cepacia–mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. Soil Sci. Soc. Am. J. 63 (6) : 1703-1708.

Barbulova, A. et Chiurazzi, M. (2005). A procedure for Lotus japonicus in vitro nodulation studies. In 'Lotus japonicus handbook'. (Ed. AJ Marquez). (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht).

Barquera, B., Garcia-Horsman, A. et Escamilla, J.E. (1991). Cytochrome d expression and regulation pattern in free-living Rhizobium phaseoli. Archi. microbiol. 155 (2) : 114-119.

Barton, L., McLay, C.D.A., Schipper, L.A. et Smith, C.T. (1999). Annual denitrification rates in agricultural and forest soils: a review. Aust. J. Soil Res. 37 : 1073-1093.

Bashan, Y., Kamnev, A.A. et de-Bashan, L.E. (2013). Tricalcium Phosphate Is Inappropriate as a Universal Selection Factor for Isolating and Testing Phosphate-Solubilizing Bacteria That Enhance Plant Growth : A Proposal for an Alternative Procedure. Biol. Fertil. Soils 49 (4) : 465-479.

Beattie, G.A., et Handelsman, Jo. (1989). A rapid method for the isolation and identification of Rhizobium from root nodules. J. Microbiol. Methods 9 (1) : 29-33.

Ben, C., Debellé, F., Berges, H., Bellec, A., Jardinaud, M.F., Anson, P., Huguet, T., Gentzbittel, L. et Vailleau, F. (2013a). MtQRRS1, an R -Locus Required for Medicago Truncatula Quantitative Resistance to Ralstonia Solanacearum. New Phytol. 199 (3) : 758-772.

Ben, C., Toueni, M., Montanari, S., Tardin, M.C., Fervel, M., Negahi, A., Saint-Pierre, L. et al. (2013b). Natural Diversity in the Model Legume *Medicago Truncatula* Allows Identifying Distinct Genetic Mechanisms Conferring Partial Resistance to *Verticillium* Wilt. J. Exp. Bot. 64 (1) : 317-332.

Berg, G., Fritze, A., Roskot, N. et Smalla, K. (2001). Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. J. of appl. microbiol. 91 (6) : 963-971.

Berlanger, I. et Powelson, M.L. (2000). Verticillium wilt.

Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, G., Bécard, G., Rosenberg, C. et Barker, D.G. (2001). Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the

study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. Mol. Plant-Microbe Interact. 14 (6) : 695-700.

Bordeleau, L.M. et Prévost, D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. Plant Soil 161:115-125.

Bretag, T.W., et Ramsey, M. Foliar diseases caused by fungi: Ascochyta spp. In: Kraft JM, Pfleger FL (eds) Compendium of pea diseases and pests (pp. 24–28), 2nd edition. APS Press. 2001.

Canfield, D.E., Glazer, A.N. et Falkowski, P.G. (2010). The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. sc. 330 (6001) : 192-196.

Castilho, A., Cunha, M., Afonso, A.R., Morais-Cecílio, L., Fevereiro, P.S. et Viegas, W. (2005). Genomic Characterization and Physical Mapping of Two Fucosyltransferase Genes in *Medicago Truncatula*. Genome 48 (1) : 168-176.

Cavaillès, E. (2009). La relance des légumineuses dans le cadre d'un plan protéine : quels bénéfices environnementaux ? Dijon, France : Commissariat général au développement durable Service de l'économie, de l'évaluation et de l'intégration du développement durable.

Chabaud, M., de Carvalho-Niebel, F. et Barker, D.G. (2003). Efficient Transformation of *Medicago Truncatula* Cv. Jemalong Using the Hypervirulent *Agrobacterium Tumefaciens* Strain AGL1. Plant Cell Reports 22 (1) : 46-51.

Chalk, P. M. (1998). Dynamics of biologically fixed N in legume-cereal rotations. Aust. J. Agric. Res. 49 : 303-316.

Chandra, S., Choure, K., Dubey, R.C. et Maheshwari, D.K. (2007). Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotiorum* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). Braz. J. Microbiol. 38:124-130

Charana Walpola, B., et Yoon, M.H. (2012). Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils : A review. Afr. J. Microbiol. Research 6 (37).

Collavino, M.M., Sansberro, P.A., Mroginski, L.A. et Aguilar, O.M. (2010). Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid

soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. Biol. Fertil. Soils 46 :727-738

Costa, E., Pérez, J. et Kreft, J.U. (2006). Why is metabolic labour divided in nitrification?. Trends Microbiol. 14 (5) : 213-219.

Crespi, M., et Gálvez, S. (2000). Molecular mechanisms in root nodule development. J. Plant Growth Regul. 19 (2) : 155-166.

De Meyer, S.E., Van Hoorde, K., Vekeman, B., Braeckman, T. et Willems, A. (2011). Genetic Diversity of Rhizobia Associated with Indigenous Legumes in Different Regions of Flanders (Belgium). Soil Biol. Biochem. 43 (12) : 2384-2396.

De Mita, S. (2012). For better or for worse: cooperation and competition in the legume rhizobium symbiosis. New Phytol. 194 (4) : 885-887.

Delalande, M., Greene, S., Hughes, S., Nair, R., Huguet, T., Aouani, M.E. et Prosperi, J.M. (2007). Wild accessions / populations. *Medicago truncatula* handbook. 1-27.

Dighe, N.S., Shukla, D., Kalkotwar, R.S., Laware, R.B., Bhawar, S.B. et Gaikwad, R.W. (2010). Nitrogenase Enzyme: A Review. Der Pharmacia Sinica 1 (2) : 77-84.

Dise, N.B., Rothwell, J.J., Gauci, V., Van der Salm, C. et De Vries, W. (2009). Predicting dissolved inorganic nitrogen leaching in European forests using two independent databases. Sci. Total Environ. 407 : 1798-1808.

Djébali, N. (2008). Etude des mécanismes de résistance de la plante modèle *Medicago truncatula* vis-à-vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées: *Phoma medicaginis* et *Aphanomyces euteiches*. thèse de doctorat. pp209.

Djébali, N., Jauneau, A., Ameline-Torregrosa, C., Chardon, F., Jaulneau, V., Mathé, C., Bottin, A., Cazaux, M., Pilet-Nayel, M.L., et Baranger, A. (2009). Partial resistance of *Medicago truncatula* to Aphanomyces euteiches is associated with protection of the root stele and is controlled by a major QTL rich in proteasome-related genes. Mol. Plant-Microbe Interact. 22 (9) : 1043-1055.

Doyle, J.J. (1998). Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. Trends Plant Sci. 3 (12): 473-478.

Doyle, J.J. (2003). The Rest of the Iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context. Plant Physiol. 131 (3) : 900-910.

Dugan, P.R. et Lundgren, D.G. (1965). Energy supply for the chemoautotroph Ferrobacillus ferrooxidans. J. bacteriol. 89 (3) : 825-834.

Dupont, L., Alloing, G., Pierre, O., El Msehli, S., Hopkins, J., Hérouart, D. et Frendo, P. (2012). The Legume Root Nodule: From Symbiotic Nitrogen Fixation to Senescence, Senescence, Dr. Tetsuji Nagata (Ed.), ISBN: 978-953-51-0144-4, InTech.

Elkahoui, S., Djébali, N., Yaich, N., Azaiez, S., Hammami, M., Essid, R. et Limam, F. (2014). Antifungal activity of volatile compounds-producing Pseudomonas P2 strain against *Rhizoctonia solani*. World J. Microbiol. Biotechnol. 31 (1) : 175-185.

Erdogan, O. et Benlioglu, K. (2010). Biological control of Verticillium wilt on cotton by the use of fluorescent Pseudomonas spp. under field conditions. Biol. Control 53 : 39-45.

Fitouri Dhane, S., Ben Jeddi, F., Zribi, K., Rezgui, S. et Mhamdi, R. (2012). Effet de l'inoculation par une souche osmotolerante de Rhizobium sullae sur la croissance et la production en proteine du sulla (Sulla coronarium L.) sous déficit hydrique. J. Appl. Biosci. 51 : 3642-3651.

Fradin, E.F. et Thomma, B.P. (2006). Physiology and Molecular Aspects of Verticillium Wilt Diseases Caused by V. Dahliae and V. Albo-Atrum. Mol. Plant Pathol. 7 (2) : 71-86.

Freeman (2008). An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. Plant Health Instr.

Gabel, C., Bittinger, M.A. et Maier, R.J. (1994). Cytochrome aa3 gene regulation in members of the family Rhizobiaceae : comparison of copper and oxygen effects in *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium tropici*. Appl. Environm. microbiol. 60 (1) : 141-148.

Gage, D.J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68 (2) : 280-300.

García, M.C., Marina, M.L., Laborda, F. et Torre, M. (1998). Chemical characterization of commercial soybean products. Food Chem. 62 (3) : 325-331.

Gepts, P. (2005). Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. Plant Physiol. 137 (4) : 1228-35.

Glick, B.R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications. Scientifica 2012 : 1-15.

Graham, P.H. et Vance, C.P. (2003). Legumes : Importance and Constraints to Greater Use. Plant Physiology 131 (3) : 872-877.

Hirsch, A.M. (1992). Tansley review no. 40. Developmental biology of legume nodulation. New Phytol. 211-237.

Hmissi, I., Abdi, N., Bargaz, A., Bouraoui, M., Mabrouk, Y., Mouldi, S. et Sifi, B. (2015). Inoculation with Phosphate Solubilizing Mesorhizobium Strains Improves the Performance of Chickpea (*Cicer Aritenium* L.) Under Phosphorus Deficiency. J. Plant Nutr. 38 (11) : 1656-71.

Inderbitzin, P., et Krishna, V.S. (2014). Verticillium systematics and evolution : how confusion impedes Verticillium wilt management and how to resolve it. Phytopath 104 (6) : 564-574.

Jha, C.H., et Saraf, M. (2015). Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. E3 J. Agric. Res. Develop. 5 (2): 108-119

Jemo, M., Saad, S., Bekkaoui, F., Oluwatosin, A.K., Olomide, A.H., Elsayed, F.A.A., Abdulaziz, A.A. et Lam-Son, P.T. (2017). Comparative Analysis of the Combined Effects of Different Water and Phosphate Levels on Growth and Biological Nitrogen Fixation of Nine Cowpea Varieties. Front. Plant Sc. 8.

Jones, J.D.G. et Dangl, J.L. (2006). The Plant Immune System. Nature 444 (7117) : 323-329.

Karimi, K., Amini, J., Harighi, B. et Bahramnejad, B. (2012). Evaluation of biocontrol potential of Pseudomonas and Bacillus spp. against Fusarium wilt of chickpea. Aust. J. Crop Sc. 6 (4) : 695-703

Kennedy, A.R. (1995). The evidence for soybean products as cancer preventative agents. J. Nutr. Vol. 125 : 733-743.

Khan, M.S., Zaidi, A. et Ahmad, E. (2014). Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms. In Phosphate Solubilizing Microorganisms, édité par Mohammad Saghir Khan, Almas Zaidi, et Javed Musarrat, 31- 62. Cham : Springer International Publishing.

Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M. et Wani, P.A. (2010). Plant Growth Promotion by Phosphate Solubilizing Fungi – Current Perspective. Archives of Agronomy and Soil Science 56 (1) : 73-98.

Kharrat M. Amri I, Cherif M et Harrabi M. Surveillance des maladies de la fève en Tunisie. Proceeding du Symposium Régional sur les maladies des Céréales et des Légumineuses Alimentaires. 11-14 Novembre 1996, Rabat, Maroc (1996), p. 21-26.

Khasawneh, F.E et Doll, E.C. (1979). The use of phosphate rock for direct application to soils. In Advances in agronomy, 30 :159-206. Elsevier.

Kjeldhal, J. (1883). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Korpern. Zeitschrift für analytische Chemie 22 (1) : 366-382.

Kim, K.Y., Jordan, D. et Mcdonald, G.A. (1998). Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. Biol Fertil Soils 26 (2) : 79-87.

Kitts, C.L. et Ludwig, R.A. (1994). Azorhizobium caulinodans respires with at least four terminal oxidases. J. bacteriol. 176 (3) : 886-895.

Kosslak, R.M., Bohlool, B.B, Dowdle, S. et Sadowsky, M.J. (1983). Competition of Rhizobium japonicum Strains in Early Stages of Soybean Nodulation. J. Appl. Environ. Microbiol. 46 (4) : 870-873.

Kouas, S., Alkama, N., Abdelly, C. et Drevon., J.J. (2008). Proton Release by Nodulated Roots Varies among Common Bean Genotypes (Phaseolus Vulgaris) under Phosphorus Deficiency. J. Plant Nutr. Soil Sci. 171 (2) : 242- 248.

Kumar, Vinod, Prashant Singh, Milko A. Jorquera, Punesh Sangwan, Piyush Kumar, A. K. Verma, et Sanjeev Agrawal. (2013). Isolation of Phytase-Producing Bacteria from Himalayan Soils and Their Effect on Growth and Phosphorus Uptake of Indian Mustard (Brassica Juncea). World J. Microbiol.Biotech 29 (8) : 1361-1369.

Lahrech, N.E.H. (2011). Etude de la variabilité chez quelques lignées Medicago truncatula soumises au stress salin. 214p. thèse de magistère.

Lannou, C., Papaïx, J., Monod, H., Raboin, L.M. et Goyeau, H. (2013). Gestion de la résistance aux maladies à l'échelle des territoires cultivés. Innovations Agro. 29 : 33-44.

Lazrek-Ben Friha, F. (2008). Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de Medicago truncatula et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse de doctorat. pp 250.

Lesins, K.A. et Lesins, I. (1979). Genus Medicago (Leguminosae). Dordrecht : Springer Netherlands.

Lievens, B., Rep, M. et Thomma, B.P.H.J. (2008). Recent Developments in the Molecular Discrimination of Formae Speciales of Fusarium Oxysporum. Pest Manag. Sci. 64 (8) : 781-788.

Liu, J., Yang, S., Zheng, Q. et Zhu, H. (2014). Identification of a dominant gene in Medicago truncatula that restricts nodulation by Sinorhizobium meliloti strain Rm41. BMC. Plant Biol. 14 (1) : 167.

Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., and Ton, J. (2011). Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. Mol. Plant. Microbe Interact. 24 : 183-193.

Ma, W., Charles, T.C. et Glick, B.R. (2004). Expression of an Exogenous 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase Gene in *Sinorhizobium Meliloti* Increases Its Ability To Nodulate Alfalfa. Appl. Environ. Microbiol. 70 (10) : 5891-5897.

Mackey, K.R.M., et Paytan, A. (2009). Phosphorus Cycle. Encyclopedia of Microbiology. (Moselio Schaechter, Editor), pp. 322-334 Oxford: Elsevier.

Maddox, C.E., Laur, L.M., and Tian, L. (2010). Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Against the Phytopathogen Xylella fastidiosa. Curr. Microbiol. 60: 53-58.

Maougal, R.T., Brauman, A., Plassard, C., Abadie, J., Djekoun, A. et Drevon, J.J. (2014). Bacterial Capacities to Mineralize Phytate Increase in the Rhizosphere of Nodulated Common Bean (*Phaseolus Vulgaris*) under P Deficiency. Eur. J. Soil Biol. 62 : 8-14.

Marra, L.M., De Oliveira, S.M., Roberto, C., Soares, F.S. et De Souza Moreira, F.M. (2011). Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. Scientia Agricola 68 (5) : 603-609.

Marroqui, S., Zorreguieta, A., Santamaria, C., Temprano, F., Soberon, M., Megias, M. et Downie, J.A. (2001). Enhanced Symbiotic Performance by *Rhizobium Tropici* Glycogen Synthase Mutants. J. Bacteriol. 183 (3): 854-864.

Martínez-Viveros, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G. et Mora, M.L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. J. Soil Sci. Plant Nutr. 10: 293-319

McGill, W.B. et Cole, C.V. (1981). Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. Geoderma 26 (4) : 267-286.

Mendes, Ieda C., et Peter J. Bottomley. 1998. « Distribution of a population of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii among different size classes of soil aggregates ». Appl. Environ. Microbiol. 64 (3) : 970-975.

Miranda, J., Membrillo-Hernandez, J., Tabche, M.L. et Soberón, M. (1996). *Rhizobium etli* cytochrome mutants with derepressed expression of cytochrome terminal oxidases and enhanced symbiotic nitrogen accumulation. Appl. Microbiol. Biotech. 45 (1-2) : 182-188.

Montafiez, A., Danso, S.K.A. et Hardarson, G. (1995). The effect of temperature on nodulation and nitrogen fixation by five *Bradyrhizobium japonicum* strains. Appl. Soil Ecol. 2 : 165-174.

Moreau, D., Burstin, J., Aubert, G., Huguet, T., Ben, C., Prosperi, J.M., Salon, C. et Munier-Jolain, N. (2012). Using a Physiological Framework for Improving the Detection of Quantitative Trait Loci Related to Nitrogen Nutrition in *Medicago Truncatula*. Theor. Appl. Genet. 124 (4) : 755-768.

Morris, J.B. (1997). Special-purpose legume genetic resources conserved for agricultural, industrial, and pharmaceutical use. Econ. Bot. 51 (3) : 251-263.

Mrabet, M., Djebali, N., Elkahoui, S., Miloud, Y., Saïdi, S., Tarhouni, B. et Mhamdi, R. (2013). Efficacy of selected Pseudomonas strains for biocontrol of *Rhizoctonia solani* in potato. Phytopathol. Mediterr. 52 (3) : 449-456.

Mysore, K.S. and Ryu, C.-M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? Trends Plant Sci. 9 : 97-104.

Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L. et Renella, G. (2011). Role of Phosphatase Enzymes in Soil. Dans Phosphorus in Action, édité par Else Bünemann, Astrid Oberson, et Emmanuel Frossard, 26 : 215-43. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg.

Negahi, A., Sarrafi, A., Ebrahimi, A., Maury, P., Prospéri, J.M., Ben, C. et Rickauer, M. (2013). Genetic Variability of Tolerance to *Verticillium Albo-Atrum* and *Verticillium Dahliae* in *Medicago Truncatula*. Eur. J. Plant Pathol. 136 (1) : 135-143.

O'Brien, J.A., Daudi, A., Butt, V.S., and Bolwell, G.P. (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. Planta 236 : 765-779.

Obame, L.E. (1980). MORPHOGENESE ET NODULATION IN VITRO DE LA LUZERNE (Medicago sativa L var. EUROPE). thèse de doctorat. pp99.

Oenema, O., Witzke, H.P., Klimont, Z., Lesschen, J.P. et Velthof G.L. (2009). Integrated assessment of promising measures to decrease nitrogen losses from agriculture in EU-27. Agric. Ecosyst. Environ. 133 : 280-288.

Okazaki, S., Nukui, N., Sugawara, M. et Minamisawa, K. (2004). Rhizobial Strategies to Enhance Symbiotic Interactions : Rhizobitoxine and 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase. Microb. Environ. 19 (2) : 99-111.

Oldroyd, G.E.D. et Dixon, R. (2014). Biotechnological solutions to the nitrogen problem. Curr. Opin. Biotechnol. 26 : 19-24.

Omar, S.A. (1997). The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular–arbusular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. World J. Microbiol. Biotech. 14 (2) : 211-218.

Paetau, I., Chen, C.Z. et Jane, J.L. (1994). Biodegradable plastic made from soybean products. 1. Effect of preparation and processing on mechanical properties and water absorption. J. Ind. Eng. Chem. 33 (7) : 1821-1827.

Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J. et Lannou, C. (2009). Aggressiveness and Its Role in the Adaptation of Plant Pathogens. Plant Pathol. 58 (3) : 409-424.

Peters, N.K. et Verma, D.P.S. (1990). Phenolic compounds as regulators of gene expression in Plant Microbe Interactions. Mol. Plant Microbe Interact. 3 (1) : 4-8.

Plassard, C., Robin, A., Le Cadre-Barthélémy, E., Marsden, C., Trap, J., Herrmann, L., Waithaisong, K., Lesueur, D., Blanchart, E. et Lardy, L. (2015). Améliorer la biodisponibilité du phosphore: comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol. Innovations Agro. 43: 115-138.

Poole, R.K. (1998). Advances in Microbial Physiology. San Diego : Academic P.

Postel, S. et Kemmerling, B. (2009). Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. Semin. Cell Dev. Biol. 20: 1025-1031.

Prather. M., Ehalt, D., Dentener, F., Derwent, R., Dlugokencky, E., Holland, E., Isaksen, I., Katima, J., Kirchhoff, V., Matson, P., Midgley, P. et Wang, M. (2001). Atmospheric chemistry and greenhouse gases. In: Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van der Linden PJ, Dai X, Maskell K and Johnson C.A. (eds), Climate change 2001: the scientific basis. Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, NY.

Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E.M.H., Albrektsen, A.S., James, E.K., Thirup, S. et Stougaard, J. (2007). LysM domains mediate lipochitin–oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. EMBO J. 26 (17) : 3923-3935.

Rahoui, S., Chaoui, A., Ben, C., Rickauer, M., Gentzbittel, L. et El Ferjani, E. (2015). Effect of Cadmium Pollution on Mobilization of Embryo Reserves in Seedlings of Six Contrasted *Medicago Truncatula* Lines. Phytochem. 111 : 98-106.

Ramírez-Suero, M., Khanshour, A., Martinez, Y. et Rickauer, M. (2010). A Study on the Susceptibility of the Model Legume Plant *Medicago Truncatula* to the Soil-Borne Pathogen Fusarium Oxysporum. Eur. J. Plant Pathol. 126 (4) : 517-530.

Ramos, T., Bellaj, M.E., Idrissi-Tourane, A.E., Daayf, F. et Hadrami, I.E. (1997). Les Phénolamides des Rachis de Palmes, Composants de la Réaction de Défense du Palmier Dattier vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. albedinis, Agent Causal du Bayoud. J. Phytopathol. 145: 487-493.

Remigi, P., Zhu, J., Young, J.P.W, et Masson-Boivin, C. (2016). Symbiosis within Symbiosis : Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. Trends Microbiol. 24 (1) : 63- 75.

Rennenberg, H., Dannenmann, M., Gessler, A., Kreuzwieser, J., Simon, J. et Papen, H. (2009). Nitrogen balance in forest soils: nutritional limitation of plants under climate change stresses. Plant Biol. 11 (1) : 4-23.

Richardson, A.E. et Simpson, R.J. (2011). Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. Plant Physiol. 156 (3) : 989-996.

Richardson, A.E. (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. Aus. J. Plant Physiol. 28 (9) : 897-906.

Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T. et Bashan, Y. (2006). Genetics of Phosphate Solubilization and Its Potential Applications for Improving Plant Growth-Promoting Bacteria. Plant Soil 287 (1-2) : 15-21.

Rodriguez-Haas, B., Finney, L., Vogt, S., Gonzalez-Melendi, P., Imperialac, J. et Gonzalez-Guerrero, M. (2013). Iron distribution through the developmental stages of *Medicago truncatula* nodules. Metallomics 5: 1247-1253.

Rosenberg, C., Boistard, P., Dénarié, J. et Casse-Delbart, F. (1981). Genes Controlling Early and Late Functions in Symbiosis are Located on a Megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet. 184 (2) : 326-333.

Rubio, L.M. et Ludden, P.W. (2005). Maturation of Nitrogenase: a Biochemical Puzzle. J. Bacteriol. 187 (2): 405-414.

Russelle, M. (2001). Alfalfa. American. Scientist. 252-259.

Salimpour, S., Khavazi, K., Nadian, H., Besharati, H. et Miransari, M. (2010). Enhancing Phosphorous Availability to Canola ('Brassica napus' L.) Using P Solubilizing and Sulfur Oxidizing Bacteria. Aust. J. Crop Sci. 4 (5) : 330-334.

Sarabia, M., Jakobsen, I., Grønlund, M., Carreon-Abud, Y. et Larsen, J. (2017). Rhizosphere Yeasts Improve P Uptake of a Maize Arbuscular Mycorrhizal Association. App. Soil Ecol.

Sattler, S. and Funnell-Harris, D. (2013). Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens. Plant Biotechnol. 4: 70.

Sbeiti, A. (2015). Effet du changement climatique sur la reponse des Plantes et des pathogenes, lors du developpement de la Maladie racinaire provoquee par les

champignons Pathogenes du sol du genre verticillium, chez deux Especes du genre medicago. Thèse de doctorat. pp 143.

Schmidt, R. (2000). Synteny : recent advances and future prospects. Current opinion in plant biology 3 (2) : 97-102.

Schulze, J. et Drevon, J.J. (2005). P-Deficiency Increases the O2 Uptake per N2 Reduced in Alfalfa. J. Exp. Bot. 56 (417) : 1779-1784.

Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A., and De Bolle, M.F.C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. Plant Physiol. Biochem. 46 : 941-950.

Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. et Gobi, T.A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus 2013, 2 (1) : 587.

Shaharoona, B., Arshad, M. et Zahir, Z.A. (2006). Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Containing ACC-Deaminase on Maize (*Zea Mays* L.) Growth under Axenic Conditions and on Nodulation in Mung Bean (*Vigna Radiata* L.). Lett. App. Microbiol. 42 (2) : 155- 159.

Taktek, S., Trépanier, M., Magallon Servin, P., St-Arnaud, M., Yves Piché, Fortin, J.A., Antoun, H. (2015). Trapping of phosphate solubilizing bacteria on hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus Rhizophagus irregularis DAOM 197198. Soil Biol. Biochem. 90 : 1-9.

Toueni, M., Ben, C., Le Ru, A., Gentzbittel, L. et Rickauer, M. (2016). Quantitative Resistance to Verticillium Wilt in *Medicago truncatula* Involves Eradication of the Fungus from Roots and Is Associated with Transcriptional Responses Related to Innate Immunity. Front. Plant Sci. 7:1431.

Herdina, J.H.S. (1990). Growth, nitrogen accumulation and partitioning, and N2 fixation in faba bean (*Vicia faba* cv. Fiord) and pea (*Pisum sativum* cv. Early Dun). Field crops res. 24 (3-4) : 173-188.

Schulze, J., Beschow, H., Adgo, E. et Merbach, W. (2000). Efficiency of N2 fixation in Vicia faba L. in combination with different Rhizobium leguminosarum strains. J. Plant Nutr. Soil Sci. 163 : 367-373.

Seklani H., Hassen H., 1990. Contribution à 1' étude des espèces spontanées du genre Medicago en Tunisie. Annales de l'INRA de Tunisie 63(20), 3-15.

Sims, J.T. et Pierzynski, G.M. (2005). Chemistry of phosphorus in soils. In: Chemical Processes in Soils. SSSA Book Series, vol. 8. Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 151-192.

Smith, S.E. et Smith, F.A. (2011). Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth : New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. Annu. Rev. Plant Biol. 62 (1) : 227-250.

Smil, V. (1999). Nitrogen in crop production : An account of global flows. Global Biogeochem. Cycles 13 (2) : 647-662.

SoberoÂn, M., Lopez, O., Miranda, J., Tabche, M.L. et Morera, C. (1997). Production in *Rhizobium etli*. Mol. Gen. Genet. 254 : 665-673.

Sprent, J.I. et Parsons, R. (2000). Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. Field Crops Res. 65 (2) : 183-196.

Sridevi, M. et Mallaiah, K. (2008). Factors effecting chitinase activity of Rhizobium sp. from Sesbania sesban. Biologia 63: 307-312

Sun, Q., Sun, Y., Walker, M.A., and Labavitch, J.M. (2013). Vascular Occlusions in Grapevines with Pierce's Disease Make Disease Symptom Development Worse. Plant Physiol. 161: 1529-1541.

Swadling, I.R. et Jeffries, P. (1996). Isolation of Microbial Antagonists for Biocontrol of Grey Mould Disease of Strawberries. Biocontrol Sci. Technol. 6 (1) : 125-36.

Tarafdar, J.C., Yadav, R.S. et Meena, S.C. (2001). Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. J. Plant Nutr. Soil Sci. 164 (3) : 279-282.

Trolove, S.N., Hedley, M.J., Kirk, G.J.D., Bolan, N.S. et Loganathan, P. (2003). Progress in Selected Areas of Rhizosphere Research on P Acquisition. Aus. J. Soil Res. 41 (3) : 471.

Vance, C.P., Graham, P.H. et Allan, D.L. (2000). Biological nitrogen fixation : phosphorus-a critical future need ? In Nitrogen fixation : From molecules to crop productivity, 509-514. Springer.

Vasse, J., de Billy, F. et Truchet, G. (1993). Abortion of Infection during the *Rhizobium meliloti*-Alfalfa Symbiotic Interaction is Accompanied by a Hypersensitive Reaction. Plant J. 4 (3) : 555-566.

Vassilev, N., Vassileva, M., Fenice, M. et Federici, F. (2001). Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. Bioresource Technology 79 (3) : 263-271.

Venkateswarlu, B., Rao, A.V., Raina, P. et Ahmad, N. (1984). Evaluation of phosphorus solubilization by microorganisms isolated from arid soil. J. Indian. Soc. Soil Sci. 32 : 273-277.

Vincent, J. M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford: Blackwell Scientific.

Voisin, Anne-Sophie, Christophe Salon, Nathalie G. Munier-Jolain, et Bertrand Ney. 2002. « Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (Pisum sativum L.). » *Plant and Soil* 242 (2): 251-62.

Wang, D., Yang, S., Tang, F. et Zhu, H. (2012). Symbiosis Specificity in the Legume - Rhizobial Mutualism : Host Specificity in Root Nodule Symbiosis. Cell. Microbiol. 14 (3) : 334-342.

Wang, Q., Liu, J. et Zhu, H. (2018). Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-Rhizobium Interactions. Front. Plant Sci. 9.

Wang, Q., Yang, S, Liu, J., Terecskei, K., Ábrahám, E., Gombár, A., Domonkos, A, Szucs, A., Körmöczi, P. et Wang, T. (2017). Host-secreted antimicrobial peptide enforces symbiotic selectivity in *Medicago truncatula*. Proc. Natl. Acad. Sci. 114 (26) : 6854-6859.

Wattiaux, M.A. et Howard, T.M. (2001). Technical Dairy Guide: Nutrition and Feeding. University of Wisconsin.

Weir, B.S. (2016). The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia

Yang, S., Wang, Q., Fedorova, E., Liu, J., Qin, Q., Zheng, Q., Price, P.A. et al. (2017). Microsymbiont Discrimination Mediated by a Host-Secreted Peptide in *Medicago Truncatula*. Proc. Natl. Acad. Sci. 114 (26) :6848-6853.

Young, N.D., Debellé, F., Oldroyd, G.E.D., Geurts, R., Cannon, S.B., Udvardi, M.K., Benedito, V.A. et al. (2011). The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. Nature.

Young, N.D., Mudge, J. et Ellis, T.H.N. (2003). Legume genomes: more than peas in a pod. Curr. Opin. Plant Biol. 6 : 199-204.

Yurgel, S.N., Sobero´n, M., Sharypova, L.A., Miranda, J., Morera, C. et Simarov. B.V. (1998). Isolation of Sinorhizobium meliloti Tn5 mutants with altered cytochrome terminal oxidase expression and improved symbiotic performance. FEMS Microbiol. Lett. 165 : 167-173.

Zahran, H.H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiol. molec. biol. reviews 63 (4) : 968-989.

Zaidi, A., Khan, M., Ahemad, M. et Oves, M. (2009). Plant Growth Promotion by Phosphate Solubilizing Bacteria. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 56 (3) : 263-284.

Zhu, H., Choi, H.K., Cook, D.R. et Shoemaker, R.C. (2005). Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. Plant Physiol. 137 (4) : 1189-1196.

Zielke, O., Arrowsmith, J.R., Ludwig, L.G. et Akçiz, S.O. (2010). Slip in the 1857 and earlier large earthquakes along the Carrizo Plain, San Andreas fault. Sci. 327 (5969) : 1119-1122.

Zribi, K., Mhamdi, R., Huguet, T. et Aouani, M.E. (2004). Distribution and Genetic Diversity of Rhizobia Nodulating Natural Populations of *Medicago Truncatula* in Tunisian Soils. Soil Biol. Biochem. 36 (6) : 903-908.

Annexes

Annexe 1. Analyse de variance du nombre de nodules produits par les deux lignées A17 et F83005.5 cultivées *in vitro* et inoculées avec les 36 isolats de Rhizobium tunisiens. Chaque boîte carrée contient 4 à 6 plantes de la même lignée de *M. truncatula* et inoculées par le même isolat de Rhizobium.

```
> anovanodIV <-aov(Nb.nodules ~Lignée*Rhizobium, data=nodulationIV)
> summary(anovanodIV)
                 Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Lignée            1  177.1  177.06 110.997  < 2e-16 ***
Rhizobium        37  526.6   14.23   8.922  < 2e-16 ***
Lignée:Rhizobium 37  185.8    5.02   3.147 2.85e-08 ***
Residuals       300  478.5    1.60
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 2. Analyse de variance du nombre de nodules produits par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en serre et inoculées avec 12 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4) en incluant les témoins. Les nodules ont été comptés après 8 semaines de culture. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovanod <-aov(Nb.nodules~Lignée*Isolat, data=nodulationss)
> summary(anovanod)
               Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Lignée          3  64186   21395  329.87 <2e-16 ***
Isolat         11  10544     959   14.78 <2e-16 ***
Lignée:Isolat  33  26906     815   12.57 <2e-16 ***
Residuals     370  23998      65
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 3. Analyse de variance du nombre de nodules produits par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 12 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4) en excluant les témoins. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovanod <-aov(Nb.nodules~Lignée*Isolat.de.rhizobium, data=nodulationss)
> summary(anovanod)
                            Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Lignée                       3  19944    6648   52.83 <2e-16 ***
Isolat.de.rhizobium         11  73717    6702   53.26 <2e-16 ***
Lignée:Isolat.de.rhizobium  33  52463    1590   12.63 <2e-16 ***
Residuals                  346  43538     126
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 4. Nombre de nodules sur des racines de M*edicago truncatula* inoculées avec 12 isolats de Rhizobium de Tunisie cultivées en serre et au phytotron. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK). Les combinaisons Isolat*Lignée avec la même lettre sont dans le même groupe.

Essai sous serre	
Isolat*Lignée	**Moyenne de nombre de nodules**
H3*A17	54,33 a
Th4*A17	49,13 ab
B3*A17	45,25 bc
O.Mn6.A17	43,63 bc
O.Mn11*F83005.5	41,33 bc
O.Mn11*A17	41,11 bc
Th1*F83005.5	40,44 bc
B.oun1*A17	39 bcd
Th2*A17	39 bcd
B6*A17	35,44 cd
O.M5*A17	34,63 cd
H3*F83005.5	29 de
H2*A17	24,67 ef

Essai au phytotron	
Isolat*Lignée	**Moyenne de nombre de nodules**
Th2*A17	98,89 a
H3*F83005.5	62,89 b
B.oun1*A17	50 c
O.Mn5*A17	40,88 cd
Th2*F83005.5	34,67 de
B.oun1*F83005.5	31,89 def
H3*A17	30,33 defg
O.Mn6*A17	29,33 defgh
B6*A17	27,33 defghi
Th4*DZA315.16	25,44 defghij
O.Mn11*A17	24,67 defghij
B.oun1*DZA315.16	24,22 defghij
B6*F83005.5	23,56 defghij

H2*F83005.5	20 fg
Th4*F83005.5	18,63 fgh
O.Mn5*A17	18,56 fgh
O.Mn6*F83005.5	17,78 fghi
B6*F83005.5	17,67 fghi
B3*DZA315.16	16,56 fghi
B3*F83005.5	15,33 fghij
Th2*F83005.5	15 fghijk
Th2*DZA315.16	13,22 fghijkl
Th1*DZA315.16	13 fghijkl
H3*DZA315.16	12,33 ghijkl
Th4*DZA315.16	11,44 ghijkl
Th4*TN8.3	10,56 ghijkl
O.Mn6*DZA315.16	9,56 ghijkl
O.Mn11*DZA315.16	8,67 ghijkl
B6*DZA315.16	7,33 ghijkl
O.M5*DZA315.16	7,22 ghijkl
Th1*A17	7,11 ghijkl
H2*DZA315.16	7 ghijkl
O.Mn5*DZA315.16	5,78 hijkl
B.oun1*DZA315.16	5,22 ijkl
O.M5*F83005.5	3,56 jkl
O.Mn5*TN8.3	3,11 jkl
B.oun1*TN8.3	2,89 jkl
H3*TN8.3	2,11 kl
Th1*TN8.3	1,89 kl

Th2*DZA315.16	21,11 efghijk
O.Mn11*F83005.5	20,89 efghijk
B.oun1*TN8.3	19,57 efghijkl
O.Mn11*DZA315.16	19,22 efghijkl
B6*DZA315.16	18,22 efghijkl
H3*DZA315.16	17,78 efghijkl
O.Mn5*F83005.5	17,33 efghijkl
O.Mn5*TN8.3	15,33 fghijkl
Th4*F83005.5	12,56 ghijkl
O.Mn6*F83005.5	12,11 ghijkl
O.Mn5*DZA315.16	11,89 ghijkl
O.Mn6*DZA315.16	11,78 ghijkl
B6*TN8.3	11 ghijkl
O.Mn6*TN8.3	10,33 hijkl
Th4*A17	9,89 hijkl
O.Mn11*TN8.3	9,78 hijkl
Th2*TN8.3	8,25 ijkl
H3*TN8.3	5,57 jkl
B3*A17	2,89 kl
Th4*TN8.3	1,57 kl
Th1*A17	0,5 l
H2*A17	0,33 l
O.M5*TN8.3	0,33 l
O.M5*A17	0,22 l
B3*F83005.5	0,11 l
B3*DZA315.16	0 l

Th2*TN8.3	1,5 l	B3*TN8.3	0 l
B3*TN8.3	0,78 l	H2*DZA315.16	0 l
O.M5*TN8.3	0,78 l	H2*F83005.5	0 l
B.oun1*F83005.5	0 l	H2*TN8.3	0 l
B6*TN8.3	0 l	O.M5*DZA315.16	0 l
H2*TN8.3	0 l	O.M5*F83005.5	0 l
O.Mn11*TN8.3	0 l	Témoin*A17	0 l
O.Mn5*F83005.5	0 l	Témoin*DZA315.16	0 l
O.Mn6*TN8.3	0 l	Témoin*F83005.5	0 l
Témoin*A17	0 l	Témoin*TN8.3	0 l
Témoin*DZA315.16	0 l	Th1*DZA315.16	0 l
Témoin*F83005.5	0 l	Th1*F83005.5	0 l
Témoin*TN8.3	0 l	Th1*TN8.3	0 l

Annexe 5. Analyse de variance du nombre de feuilles produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en serre et inoculées avec 12 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovanod <-aov(Nb.feuilles~Lignée*Isolat, data=nodulation)
> summary(anovanod)
              Df Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
Lignée         3  16406    5469  61.651 < 2e-16 ***
Isolat        12  12361    1030  11.612 < 2e-16 ***
Lignée:Isolat 36   5766     160   1.806 0.00377 **
Residuals    401  35571      89
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 6. Analyse de variance du nombre de feuilles produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 12 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
>
> anovanod <-aov(Nb.feuilles~Lignée*Isolat.de.rhizobium, data=nodulation)
> summary(anovanod)
                           Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Lignée                      3   4318  1439.3   8.743 1.28e-05 ***
Isolat.de.rhizobium        12  27067  2255.6  13.701  < 2e-16 ***
Lignée:Isolat.de.rhizobium 36   9622   267.3   1.623   0.0153 *
Residuals                 376  61903   164.6
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 7. Nombre de feuilles produites par 4 accessions de M*edicago truncatula* inoculées avec 12 isolats de Rhizobium de Tunisie cultivées en serre et au phytotron. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK). Les combinaisons Isolat*Lignée avec la même lettre sont dans le même groupe.

Essai sous serre	
Isolat*Lignée	**Moyenne de nombre de feuilles**
Th1*F83005.5	46,89 a
Th2*DZA315.16	44 ab
O.Mn11*A17	42,11 abc
Th2*A17	41,83 abc
Th4*A17	41,25 abc
O.Mn11*F83005.5	39 abcd
H3*A17	38,78 abcd
B.oun1*A17	38,11 abcde
H3*DZA315.16	36,56 abcdef
B3*A17	36,5 abcdef
Th1*A17	35,44 abcdefg
Th1*DZA315.16	35,13 abcdefg
Th4*DZA315.16	34,89 abcdefgh
Th2*F83005.5	34,13 abcdefgh

Essai au phytotron	
Isolat*Lignée	**Moyenne de nombre de feuilles**
B.oun1*A17	63,88 a
B.oun1*DZA315.16	61,33 ab
B.oun1*F83005.5	60,22 ab
Th2*A17	55,22 abc
Th2*F83005.5	53 abcd
Th2*DZA315.16	48,56 abcde
B.oun1*TN8.3	44,57 abcde
O.Mn5*A17	43,38 bcde
H3*F83005.5	43,33 bcde
H2*A17	42,11 bcde
O.Mn5*TN8.3	41,33 bcdef
Th1*A17	40,5 bcdef
Témoin*F83005.5	40,38 bcdef
Th1*TN8.3	40,33 bcdef

B3*DZA315.16	33,89 abcdefghi
O.M5*A17	33,88 abcdefghi
B6*A17	33,33 abcdefghi
O.Mn11*DZA315.16	33,33 abcdefghi
Th4*TN8.3	32,44 abcdefghij
O.Mn6*A17	31,75 abcdefghijk
H3*F83005.5	31,56abcdefghijk
Th4*F83005.5	31,5 abcdefghijk
B.oun1*F83005.5	29 bcdefghijkl
O.Mn5*DZA315.16	28,22 bcdefghijkl
O.Mn5*A17	28 bcdefghijkl
H2*A17	27,78 bcdefghijkl
B.oun1*DZA315.16	27,67 bcdefghijkl
H2*DZA315.16	27,67 bcdefghijkl
B6*DZA315.16	27,44 bcdefghijkl
O.M5*DZA315.16	25,78 cdefghijkl
H2*F83005.5	25,56 cdefghijkl
O.Mn6*DZA315.16	24,11 defghijklm
O.Mn5*F83005.5	23,38 defghijklm
B6*F83005.5	23,22 defghijklm
O.Mn6*F83005.5	23 defghijklm
Témoin*DZA315.16	22,78 defghijklm
H3*TN8.3	22,56 defghijklm
B3*F83005.5	22,33 defghijklm
Th1*TN8.3	22,11 defghijklm
O.M5*F83005.5	21 efghijklm

Témoin*A17	40,22 bcdef
Th4*F83005.5	40,22 bcdef
O.Mn5*F83005.5	39,56 bcdef
H3*A17	37,11 cdef
Th4*A17	37,11 cdef
O.Mn5*DZA315.16	36,78 cdef
O.Mn11*A17	35,33 cdef
O.Mn6*DZA315.16	35,33 cdef
H2*F83005.5	34,33 cdef
Th1*F83005.5	33,44 cdef
B6*F83005.5	32,89 cdef
O.Mn6*TN8.3	32,67 cdef
O.Mn11*TN8.3	32,56 cdef
O.Mn6*A17	32,11 cdef
H3*TN8.3	32 cdef
B3*TN8.3	31,5 cdef
B6*A17	31,33 cdef
B3*DZA315.16	30,88 cdef
O.Mn6*F83005.5	30,78 cdef
Témoin*DZA315.16	29,89 def
B6*DZA315.16	29,78 def
O.M5*DZA315.16	29,78 def
O.Mn11*F83005.5	29,44 def
H2*DZA315.16	29 def
O.Mn11*DZA315.16	29 def
O.M5*A17	28,67 def

Témoin*F83005.5	20,56 fghijklm		B3*A17	28,22 def
Témoin*A17	20,44 fghijklm		H2*TN8.3	27,63 def
B3*TN8.3	20,22 fghijklm		Th4*DZA315.16	27,44 def
O.Mn11*TN8.3	18,67 ghijklm		H3*DZA315.16	27,33 def
O.M5*TN8.3	17,67 hijklm		B3*F83005.5	27,11 def
B.oun1*TN8.3	16,67 ijklm		Th1*DZA315.16	27 def
B6*TN8.3	16,13 jklm		O.M5*F83005.5	26,88 def
O.Mn5*TN8.3	15,78 jklm		B6*TN8.3	25,67 ef
H2*TN8.3	14,78 klm		Témoin*TN8.3	25,38 ef
Th2*TN8.3	14,38 lm		Th2*TN8.3	24,13 ef
O.Mn6*TN8.3	12,88 lm		Th4*TN8.3	22,43 ef
Témoin*TN8.3	8,88 m		O.M5*TN8.3	15,67 f

Annexe 8. Analyse de variance de la biomasse aérienne fraîche produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en serre et inoculées avec 12 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovapfa <-aov(PFA~Lignée*Isolat, data=nodulation)
> summary(anovapfa)
               Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Lignée          3  268.3   89.43  64.571 <2e-16 ***
Isolat         12  200.4   16.70  12.059 <2e-16 ***
Lignée:Isolat  36   57.7    1.60   1.156  0.251
Residuals     401  555.3    1.38
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 9. Analyse de variance de la biomasse aérienne fraîche produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 12 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
>
> anovapfa <-aov(PFA~Lignée*Isolat.de.rhizobium, data=nodulation)
> summary(anovapfa)
                            Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Lignée                       3  172.3   57.44  65.764  < 2e-16 ***
Isolat.de.rhizobium         12  169.9   14.16  16.210  < 2e-16 ***
Lignée:Isolat.de.rhizobium  36   76.4    2.12   2.429 1.86e-05 ***
Residuals                  376  328.4    0.87
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 10. Analyse de variance de la biomasse aérienne sèche produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en serre et inoculées avec 12 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovapsa <-aov(PSA~Lignée*Isolat, data=nodulation)
> summary(anovapsa)
               Df Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
Lignée          3 10.064   3.355  113.83 < 2e-16 ***
Isolat         12  6.376   0.531   18.03 < 2e-16 ***
Lignée:Isolat  36  1.995   0.055    1.88 0.00208 **
Residuals     401 11.818   0.029
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 11. Analyse de variance de la biomasse aérienne sèche produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 12 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun1 ; B3 ; B6 ; H2 ; H3 ; O.M5 ; O.Mn11 ; O.Mn5 ; O.Mn6 ; Th1 ; Th2 ; Th4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
>
> anovapsa <-aov(PSA~Lignée*Isolat.de.rhizobium, data=nodulation)
> summary(anovapsa)
                            Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Lignée                       3  4.063  1.3542  83.231  < 2e-16 ***
Isolat.de.rhizobium         12  2.513  0.2094  12.872  < 2e-16 ***
Lignée:Isolat.de.rhizobium  36  2.298  0.0638   3.923 8.86e-12 ***
Residuals                  376  6.118  0.0163
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 12. Production de biomasse aérienne sèche de 4 lignées de M*edicago truncatula* inoculées avec 12 isolats de Rhizobium de Tunisie cultivées en serre et au phytotron. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison

lignée*isolat. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK). Les combinaisons Isolat*Lignée avec la même lettre sont dans le même groupe.

Essai sous serre	
Rhizobium*Lignée	**Poids sec aérien**
Th1*F83005.5	0,77 a
H3*A17	0,75 ab
Th1*A17	0,74 ab
O.Mn11*F83005.5	0,71 abc
Th2*DZA315.16	0,71 abc
Th4*A17	0,7 abcd
Th4*DZA315.16	0,67 abcde
Th2*A17	0,66 abcdef
O.Mn11*A17	0,66 abcdef
B.oun1*A17	0,63 abcdef
H3*DZA315.16	0,63 abcdefg
Th1*DZA315.16	0,63 abcdefg
H3*F83005.5	0,58 abcdefgh
Th4*F83005.5	0,57 abcdefghi
B3*DZA315.16	0,56 abcdefghij
O.M5*A17	0,55 abcdefghij
Th2*F83005.5	0,54 abcdefghij
O.Mn5*A17	0,48 abcdefghijk
B6*DZA315.16	0,46 bcdefghijkl
O.Mn11*DZA315.16	0,46 bcdefghijkl
B3*A17	0,45 cdefghijklm
O.M5*DZA315.16	0,44 cdefghijklm

Essai au phytotron	
Rhizobium*Lignée	**Poids sec aérien**
B.oun1*A17	0,82 a
Th1*F83005.5	0,56 b
H2*A17	0,52 bc
Th2*A17	0,51 bcd
B.oun1*F83005.5	0,51 bcde
Th1*A17	0,48 bcdef
Th2*F83005.5	0,47 bcdef
Th4*F83005.5	0,46 bcdef
O.Mn5*A17	0,45 bcdefg
Témoin*A17	0,45 bcdefg
Th2*DZA315.16	0,43 bcdefgh
H3*A17	0,43 bcdefgh
H3*F83005.5	0,41 bcdefghi
B.oun1*DZA315.16	0,4 bcdefghij
Th4*A17	0,39 bcdefghij
O.M5*A17	0,35 bcdefghijk
B6*DZA315.16	0,35 bcdefghijk
H2*F83005.5	0,34 bcdefghijkl
Témoin*F83005.5	0,34 bcdefghijkl
O.M5*F83005.5	0,34 bcdefghijkl
O.Mn11*A17	0,32 cdefghijklm
O.M5*DZA315.16	0,31 cdefghijklm

H2*A17	0,42 cdefghijklmn
O.Mn5*DZA315.16	0,41 defghijklmno
B6*A17	0,41 defghijklmno
H2*F83005.5	0,4 efghijklmno
H2*DZA315.16	0,39 efghijklmnop
B3*F83005.5	0,38 efghijklmnop
O.Mn6*A17	0,38 efghijklmnop
B.oun1*F83005.5	0,36 fghijklmnopq
B6*F83005.5	0,36 fghijklmnopq
O.Mn5*F83005.5	0,36 fghijklmnopq
O.Mn6*F83005.5	0,36 fghijklmnopq
B.oun1*DZA315.16	0,33 ghijklmnopq
O.Mn6*DZA315.16	0,33 ghijklmnopq
O.M5*F83005.5	0,32 hijklmnopq
Th4*TN8.3	0,3 hijklmnopqr
Témoin*F83005.5	0,27 ijklmnopqr
Th1*TN8.3	0,27 ijklmnopqr
H3*TN8.3	0,26 jklmnopqr
Témoin*DZA315.16	0,23 klmnopqr
Témoin*A17	0,23 klmnopqr
B.oun1*TN8.3	0,17 lmnopqr
Th2*TN8.3	0,16 lmnopqr
O.Mn11*TN8.3	0,15 mnopqr
B3*TN8.3	0,14 mnopqr
O.Mn5*TN8.3	0,12 nopqr
O.M5*TN8.3	0,12 opqr

Th4*DZA315.16	0,3 cdefghijklmn
B6*F83005.5	0,29 cdefghijklmn
O.Mn6*TN8.3	0,28 cdefghijklmn
O.Mn5*F83005.5	0,28 cdefghijklmn
O.Mn5*TN8.3	0,28 defghijklmn
O.Mn11*F83005.5	0,27 defghijklmn
O.Mn6*F83005.5	0,27 efghijklmn
B3*F83005.5	0,27 efghijklmn
Th1*DZA315.16	0,26 efghijklmn
B3*DZA315.16	0,26 efghijklmn
H3*DZA315.16	0,26 efghijklmn
B3*A17	0,26 fghijklmn
O.Mn5*DZA315.16	0,25 fghijklmn
H2*DZA315.16	0,23 fghijklmn
B.oun1*TN8.3	0,23 fghijklmn
B6*A17	0,23 fghijklmn
O.Mn6*DZA315.16	0,21 ghijklmn
O.Mn6*A17	0,21 ghijklmn
Th1*TN8.3	0,2 hijklmn
B6*TN8.3	0,2 hijklmn
O.M5*TN8.3	0,18 ijklmn
O.Mn11*DZA315.16	0,18 ijklmn
Témoin*TN8.3	0,17 ijklmn
Témoin*DZA315.16	0,15 jklmn
H3*TN8.3	0,13 klmn
O.Mn11*TN8.3	0,1 klmn

Témoin*TN8.3	0,11 opqr		Th2*TN8.3	0,1 lmn
H2*TN8.3	0,09 pqr		B3*TN8.3	0,08 mn
B6*TN8.3	0,07 qr		H2*TN8.3	0,07 mn
O.Mn6*TN8.3	0,02 r		Th4*TN8.3	0,06 n

Annexe 13. Analyse de variance du nombre de nodules produits par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13). Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovanod <-aov(Nodules.number ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulationss)
> summary(anovanod)
                            Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                    3   6877  2292.3  20.680 5.15e-10 ***
Rhizobium.isolates           3   1147   382.4   3.450   0.0204 *
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 9   5702   633.6   5.716 4.28e-06 ***
Residuals                   80   8868   110.8
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 14. Analyse de variance de la biomasse aérienne fraîche produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) avec inclusion des plantes témoins dans l'analyse. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovaSFW <-aov(SFW ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulation)
> summary(anovaSFW)
                            Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                    3  33.34   11.11  12.515 5.15e-07 ***
Rhizobium.isolates           4 191.90   47.97  54.023  < 2e-16 ***
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 12   7.33    0.61   0.688    0.759
Residuals                  100  88.80    0.89
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 15. Analyse de variance de la biomasse aérienne fraîche produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) en excluant les témoins. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovaSFWss <-aov(SFW ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulationss)
> summary(anovaSFWss)
                          Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                  3  33.69  11.231   11.01 3.99e-06 ***
Rhizobium.isolates         3  46.66  15.553   15.24 6.23e-08 ***
Mtr.lines:Rhizobium.isolates  9   4.69   0.521    0.51    0.863
Residuals                 80  81.65   1.021
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 16. Analyse de variance de la biomasse aérienne sèche produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) avec inclusion des plantes témoins dans l'analyse. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovaSDW <-aov(SDW ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulation)
> summary(anovaSDW)
                           Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                   3  1.391  0.4637  12.627 4.57e-07 ***
Rhizobium.isolates          4  5.245  1.3112  35.704  < 2e-16 ***
Mtr.lines:Rhizobium.isolates  12  0.747  0.0622   1.694   0.0791 .
Residuals                 100  3.672  0.0367
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 17. Analyse de variance de la biomasse aérienne sèche produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) avec exclusion des plantes témoins dans l'analyse. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovaSDWss <-aov(SDW ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulationss)
> summary(anovaSDWss)
                           Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                   3 1.0012  0.3337   9.051 3.15e-05 ***
Rhizobium.isolates          3 0.0188  0.0063   0.170   0.9164
Mtr.lines:Rhizobium.isolates  9 0.6171  0.0686   1.860   0.0702 .
Residuals                  80 2.9499  0.0369
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 18. Analyse de variance de la biomasse racinaire fraîche produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) avec

inclusion des plantes témoins dans l'analyse. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovaRFW <-aov(RFW ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulation)
> summary(anovaRFW)
                             Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                     3  2.400  0.8000   3.855   0.0117 *
Rhizobium.isolates            4  8.056  2.0139   9.704 1.13e-06 ***
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 12 12.595  1.0496   5.058 1.59e-06 ***
Residuals                   100 20.753  0.2075
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 19. Analyse de variance de la biomasse racinaire fraîche produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) avec exclusion des plantes témoins dans l'analyse. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovaRFWss <-aov(RFW ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulationss)
> summary(anovaRFWss)
                           Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                   3  2.119  0.7064   4.344 0.006895 **
Rhizobium.isolates          3  3.222  1.0739   6.604 0.000481 ***
Mtr.lines:Rhizobium.isolates  9  9.272  1.0302   6.335 9.94e-07 ***
Residuals                  80 13.009  0.1626
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Annexe 20. Biomasse racinaire fraîche de 4 lignées de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium de Tunisie (O.Mn13, J13, B.oun2, II3.23/4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison isolat/lignée (3 plantes par pot) dans chaque expérience. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en excluant les témoins. Les combinaisons lignées*isolats de Rhizobium avec la même lettre sont dans le même groupe.

Rhizobium*Lignée	**Poids frais racinaire (g/plante)**
O.Mn13.TN8.3	1,98 a
J13.DZA315.16	1,90 ab
O.Mn13.A17	1,74 abc
J13.TN8.3	1,70 abc
II3.23/4.DZA315.16	1,68 abc
B.oun2.F83005.5	1,56 abcd
O.Mn13.DZA315.16	1,40 abcde
B.oun2.A17	1,34 abcde

B.oun2.DZA315.16	1,32 abcde
O.Mn13.F83005.5	1,30 abcde
II3.23/4.F83005.5	1,19 bcde
J13.F83005.5	1,09 cde
J13.A17	0,84 de
B.oun2.TN8.3	0,81 e
II3.23/4.TN8.3	0,80 e
II3.23/4.A17	0,74 e

Annexe 21. Analyse de variance de la biomasse racinaire sèche produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) avec inclusion des plantes témoins dans l'analyse. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovaRDW <-aov(RDW ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulation)
> summary(anovaRDW)
                            Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                    3 0.0452 0.01506   1.002    0.395
Rhizobium.isolates           4 1.0999 0.27497  18.288 2.65e-11 ***
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 12 0.0773 0.00644   0.429    0.949
Residuals                  100 1.5035 0.01504
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 22. Analyse de variance de la biomasse racinaire sèche produites par les quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) avec exclusion des plantes témoins dans l'analyse. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovaRDWss <-aov(RDW ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulationss)
> summary(anovaRDWss)
                            Df Sum Sq  Mean Sq F value Pr(>F)
Mtr.lines                    3 0.0155 0.005162   1.011 0.3925
Rhizobium.isolates           3 0.0449 0.014977   2.932 0.0385 *
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 9 0.0226 0.002512   0.492 0.8761
Residuals                   80 0.4086 0.005108
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 23. Biomasse racinaire sèche de 4 lignées de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium de Tunisie (O.Mn13, J13, B.oun2, II3.23/4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison isolat*lignée (3 plantes par pot) dans chaque expérience. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en excluant les témoins. Les isolats de Rhizobium avec la même lettre sont dans le même groupe.

Isolat de Rhizobium	**Poids sec racinaire (g/plante)**
O.Mn13	0,72 a
J13	0,68 b
B.oun2	0,67 b
II3.23/4	0,67 b

Annexe 24. Analyse de variance du rapport PSA/PSA de toutes les plantes des quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) avec inclusion des plantes témoins dans l'analyse. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
>
> anovaratio <-aov(SDW/RDW ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulation)
> summary(anovaratio)
                            Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Mtr.lines                    3  2.364   0.788   9.798  1e-05 ***
Rhizobium.isolates           4 19.369   4.842  60.202 <2e-16 ***
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 12  0.917   0.076   0.950  0.501
Residuals                  100  8.043   0.080
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 25. Rapport PSA/PSR de 4 lignées de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium de Tunisie (O.Mn13, J13, B.oun2, II3.23/4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison isolat/lignée (3 plantes par pot) dans chaque expérience. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en incluant les témoins. Les lignées avec la même lettre sont dans le même groupe.

Lignées de *M.truncatula*	**Moyenne ratio « PSA/PSR »**
A17	1,71 a
DZA315.16	1,62 ab
F83005.5	1,52 b

TN8.3	1,34 c

Annexe 26. Rapport PSA/PSR de 4 lignées de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium de Tunisie (O.Mn13, J13, B.oun2, II3.23/4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison isolat/lignée (3 plantes par pot) dans chaque expérience. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en incluant les témoins. Les isolats avec la même lettre sont dans le même groupe.

Isolats de Rhizobium	**Moyenne ratio « PSA/PSR »**
B.oun2	1,80 a
II3.23/4	1,77 a
J13	1,73 a
O.Mn13	1,70 a
Control	0,75 b

Annexe 27. Analyse de variance de la teneur d'azote de toutes les plantes des quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) avec inclusion des plantes témoins dans l'analyse. La teneur en azote a été analysée avec la méthode Kdjeldhal après séchage et broyage des plantes. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovanod <-aov(N ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulation)
> summary(anovanod)
                            Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                    3  251.0    83.7   4.343  0.00736 **
Rhizobium.isolates           4 2691.5   672.9  34.927 7.76e-16 ***
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 12  968.4    80.7   4.189 6.59e-05 ***
Residuals                   68 1310.0    19.3
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
32 observations deleted due to missingness
>
```

Annexe 28. Analyse de variance de la teneur d'azote des plantes des quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) avec exclusion des plantes témoins dans l'analyse. La teneur en azote a été analysée avec la méthode Kdjeldhal après séchage et broyage des plantes. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovanodss <-aov(N ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulationss)
> summary(anovanodss)
                             Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                     3  209.5   69.82   3.499   0.0210 *
Rhizobium.isolates            3  154.9   51.64   2.588   0.0616 .
Mtr.lines:Rhizobium.isolates  9  852.5   94.72   4.747 9.58e-05 ***
Residuals                    58 1157.3   19.95
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
22 observations deleted due to missingness
>
```

Annexe 29. Teneur en azote de 4 lignées de *M. truncatula* inoculées avec 4 isolats de Rhizobium de Tunisie (O.Mn13, J13, B.oun2, II3.23/4). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 3 pots pour chaque combinaison isolat/lignée (3 plantes par pot) dans chaque expérience. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en excluant les témoins. Les combinaisons lignée*isolat avec la même lettre sont dans le même groupe.

Isolat*Line	**Nitrogen content (‰)**
J13*A17	39,03 a
J13*DZA315.16	38,08 a
O.Mn13*F83005.5	37,90 a
B.oun2*A17	37,53 a
B.oun2*TN8.3	36,95 a
B.oun2*DZA315.16	36,68 a
O.Mn13*A17	36,40 a
J13*F83005.5	35,44 a
II3.23/4*F83005.5	34,07 a
II3.23/4*A17	33,80 a
O.Mn13*TN8.3	33,44 a
II3.23/4*DZA315.16	33,27 a
J13*TN8.3	33,14 a
O.Mn13*DZA315.16	32,55 a
II3.23/4*TN8.3	31,97 a

B.oun2*F83005.5	17,94 b

Annexe 30. Analyse de variance de la teneur d'azote de toutes les plantes des quatre lignées de *Medicago truncatula* A17, F83005.5, DZA315.16 et TN8.3 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) avec exclusion des plantes témoins et des plantes de la lignée F83005.5 inoculées avec B .oun2 dans l'analyse. La teneur en azote a été analysée avec la méthode Kdjeldhal après séchage et broyage des plantes. Les valeurs ont été obtenues à partir de 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovanodsss <-aov(N ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulationsss)
> summary(anovanodsss)
                            Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Mtr.lines                    3   99.0   33.00   1.602 0.1991
Rhizobium.isolates           3  171.8   57.27   2.780 0.0494 *
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 8  106.4   13.30   0.646 0.7361
Residuals                   56 1153.5   20.60
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
19 observations deleted due to missingness
>
```

Annexe 31. Indice de solubilisation de phosphate de CaHPO4 *in vitro* par des isolats tunisiens de Rhizobium à 15 jours d'incubation.

Seuls les 22 isolats qui solubilisent $CaHPO_4$ sont représentés. Les valeurs ont été obtenues à partir de 3 expériences indépendantes avec 4 répétitions pour chacune d'entre elles. Les groupes de moyennes représentés par des lettres sont obtenues à partir du test Student-Newman-Keuls (SNK). Les isolats avec la même lettre sont dans le même groupe.

Isolat de Rhizobium	**Valeur moyenne de PSI15**
J13	5,34 a
B.oun2	4,82 b
II3.23/4	4,63 b
H1	3,56 c
B.oun5	2,89 d
O.Mn12	2,82 d
B1	2,65 de

10,23/R29	2,48 def
B.oun1	2,47 def
B2	2,41 defg
O.M3	2,21 efg
B.oun4	2,21 efg
B4	2,08 fgh
RCR2011	2,04 fgh
O.M4	1,89 ghi
O.M5	1,86 ghi
B.oun6	1,59 hij
O.M2	1,57 hij
H3	1,44 ij
B.oun3	1,37 ij
Th4	1,34 ij
H4	1,13 j

Annexe 32. Analyse de la variance de l'index de solubilisation de Phosphate sous forme $CaHPO_4$ *in vitro* des 22 isolats de Rhizobium qui solubilisent le phosphate sur milieu Pikovskaya à 7 jours d'incubation. Les valeurs ont été obtenues à partir de 3 expériences indépendantes avec 4 répétitions pour chacune d'entre elles.

```
> anovaSI1 <-aov(SI1 ~Rhizobium.isolate, data=SIphosphate)
> summary(anovaSI1)
                  Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Rhizobium.isolate  21  530.1  25.245    96.7 <2e-16 ***
Residuals         224   58.5   0.261
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Annexe 33. Analyse de la variance de l'index de solubilisation de Phosphate sous forme $CaHPO_4$ *in vitro* des 22 isolats de Rhizobium qui solubilisent le phosphate sur milieu

Pikovskaya à 15 jours d'incubation. Les valeurs ont été obtenues à partir de 3 expériences indépendantes avec 4 répétitions pour chacune d'entre elles.

```
> anovaSI2 <-aov(SI2 ~Rhizobium.isolate, data=SIphosphate)
> summary(anovaSI2)
                   Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Rhizobium.isolate  21 311.63  14.839   73.13 <2e-16 ***
Residuals         224  45.46   0.203
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 34. Analyse de la variance de l'index de solubilisation de Phosphate sous forme $CaHPO_4$ *in vitro* des 36 isolats de Rhizobium sur milieu Pikovskaya. Les valeurs ont été obtenues à partir de 3 expériences indépendantes avec 4 répétitions pour chacune d'entre elles.

```
> anovaSI <-aov(Solubilisation.index ~Rhizobium.isolate*dates, data=SIphosphate)
> summary(anovaSI)
                        Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Rhizobium.isolate        35 1682.1   48.06  342.38 <2e-16 ***
dates                     1   33.2   33.22  236.63 <2e-16 ***
Rhizobium.isolate:dates  35   75.5    2.16   15.36 <2e-16 ***
Residuals               740  103.9    0.14
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 35. Analyse de la variance de l'index de solubilisation de Phosphate sous forme $CaHPO_4$ *in vitro* des 22 isolats de Rhizobium qui ont montré un pouvoir solubilisant du $CaHPO_4$ sur milieu Pikovskaya. Les valeurs ont été obtenues à partir de 3 expériences indépendantes avec 4 répétitions pour chacune d'entre elles.

```
> anovaSI <-aov(Solubilisation.index ~Rhizobium.isolate*dates, data=SIphosphate)
> summary(anovaSI)
                        Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Rhizobium.isolate        21  788.0   37.52  161.84 <2e-16 ***
dates                     1   54.8   54.82  236.44 <2e-16 ***
Rhizobium.isolate:dates  21   53.9    2.56   11.06 <2e-16 ***
Residuals               448  103.9    0.23
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 36. Analyse de variance du nombre de nodules produits par les deux lignées de *Medicago truncatula* A17 et F83005.5 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque expérience et chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovanodss <-aov(Nodules ~Lignée*Souche, data=phosphateenpotss)
> summary(anovanodss)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Lignée         1 2857.2  2857.2  36.617  4e-07 ***
Souche         3  107.2    35.7   0.458  0.713
Lignée:Souche  3   62.1    20.7   0.265  0.850
Residuals     40 3121.2    78.0
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Annexe 37. Analyse de variance du poids frais aérien par les deux lignées de *Medicago truncatula* A17 et F83005.5 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque expérience et chaque combinaison lignée*isolat.

```
>
> anovaPFA <-aov(PFA.mg. ~Lignée*Souche, data=phosphateenpot)
> summary(anovaPFA)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Lignée         1   2666    2666   0.777  0.382
Souche         4  12472    3118   0.909  0.466
Lignée:Souche  4   4007    1002   0.292  0.882
Residuals     50 171594    3432
```

Annexe 38. Analyse de variance du poids sec aérien par les deux lignées de *Medicago truncatula* A17 et F83005.5 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque expérience et chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovaPSA <-aov(PSA.mg. ~Lignée*Souche, data=phosphateenpot)
> summary(anovaPSA)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Lignée         1    437   437.4   0.574  0.452
Souche         4   1569   392.1   0.515  0.725
Lignée:Souche  4   1861   465.4   0.611  0.657
Residuals     50  38077   761.5
>
```

Annexe 39. Analyse de variance du poids frais racinaire par les deux lignées de *Medicago truncatula* A17 et F83005.5 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque expérience et chaque combinaison lignée*isolat.

```
>
> anovaPFR <-aov(PFR.mg. ~Lignée*Souche, data=phosphateenpot)
> summary(anovaPFR)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Lignée         1   1746    1746    0.57  0.454
Souche         4   6498    1624    0.53  0.714
Lignée:Souche  4   5150    1288    0.42  0.793
Residuals     50 153231    3065
>
```

Annexe 40. Analyse de variance du poids sec racinaire par les deux lignées de *Medicago truncatula* A17 et F83005.5 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque expérience et chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovaPSR <-aov(PSR.mg. ~Lignée*Souche, data=phosphateenpot)
> summary(anovaPSR)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Lignée         1     38    38.4   0.243  0.624
Souche         4    647   161.6   1.024  0.404
Lignée:Souche  4    605   151.4   0.959  0.438
Residuals     50   7890   157.8
>
```

Annexe 41. Analyse de variance du rapport PSA/PSR par les deux lignées de *Medicago truncatula* A17 et F83005.5 cultivées en phytotron et inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 expériences indépendantes avec 9 plantes dont 3 plantes par pots pour chaque expérience et chaque combinaison lignée*isolat.

```
> anovanod <-aov(PSA.PSR ~Lignée*Souche, data=phosphateenpot)
> summary(anovanod)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Lignée         1  18.20  18.203   6.916 0.0113 *
Souche         4  18.52   4.630   1.759 0.1519
Lignée:Souche  4  17.01   4.254   1.616 0.1848
Residuals     50 131.60   2.632
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 42. Analyse de variance du nombre de nodules produits par les deux lignées de *Medicago truncatula* A17 et F83005.5 cultivées en phytotron, inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) et traitées avec deux formes différentes de phosphate l'une soluble l'autre insoluble (phosphate rocheux). Les valeurs ont été obtenues à partir de 5 plantes pour chaque combinaison lignée*isolat et chaque traitement.

```
> anovanodss <-aov(nb.nodules ~lignée*isolat*traitement, data=phosphatess)
> summary(anovanodss)
                          Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
lignée                     1   70.1    70.1   2.311 0.134527
isolat                     3  730.5   243.5   8.023 0.000173 ***
traitement                 1  629.6   629.6  20.744  3.2e-05 ***
lignée:isolat              3   30.3    10.1   0.332 0.802031
lignée:traitement          1    1.8     1.8   0.058 0.810363
isolat:traitement          3  452.7   150.9   4.972 0.004154 **
lignée:isolat:traitement   3    7.0     2.3   0.077 0.972049
Residuals                 52 1578.3    30.4
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 43. Analyse de variance du nombre de feuilles produits par les deux lignées de *Medicago truncatula* A17 et F83005.5 cultivées en phytotron, inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) et traitées avec deux formes différentes de phosphate l'une soluble l'autre insoluble (phosphate rocheux). Les valeurs ont été obtenues à partir de 5 plantes pour chaque combinaison lignée*isolat et chaque traitement.

```
> anovaf <-aov(nb.feuilles ~lignée*isolat*traitement, data=phosphate)
> summary(anovaf)
                          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
lignée                     1   0.42   0.425   0.379 0.5405
isolat                     4   5.99   1.498   1.335 0.2668
traitement                 1   4.88   4.877   4.347 0.0411 *
lignée:isolat              4   5.80   1.449   1.292 0.2828
lignée:traitement          1   0.06   0.062   0.056 0.8142
isolat:traitement          4   2.89   0.722   0.643 0.6336
lignée:isolat:traitement   4   8.94   2.235   1.992 0.1066
Residuals                 63  70.68   1.122
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 44. Analyse de variance du poids frais aérien chez les deux lignées de *Medicago truncatula* A17 et F83005.5 cultivées en phytotron, inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) et traitées avec deux formes différentes de phosphate l'une soluble l'autre insoluble (phosphate rocheux). Les valeurs ont été obtenues à partir de 5 plantes pour chaque combinaison lignée*isolat et chaque traitement.

```
> anovaPFA <-aov(PFA..mg. ~lignée*isolat*traitement, data=phosphate)
> summary(anovaPFA)
                          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
lignée                     1    5.3   5.326   0.575  0.451
isolat                     4   32.1   8.030   0.866  0.489
traitement                 1   15.1  15.135   1.633  0.206
lignée:isolat              4   12.7   3.179   0.343  0.848
lignée:traitement          1   19.8  19.799   2.136  0.149
isolat:traitement          4   71.3  17.823   1.923  0.118
lignée:isolat:traitement   4   47.5  11.878   1.281  0.287
Residuals                 63  584.0   9.270
```

Annexe 45. Analyse de variance du poids frais racinaire chez les deux lignées de *Medicago truncatula* A17 et F83005.5 cultivées en phytotron, inoculées avec 4 isolats de Rhizobium tunisiens (B.oun2 ; II3.23/4 ; J13 ; O.Mn13) et traitées avec deux formes différentes de phosphate l'une soluble l'autre insoluble (phosphate rocheux). Les valeurs ont été obtenues à partir de 5 plantes pour chaque combinaison lignée*isolat et chaque traitement.

```
> anovaPFR <-aov(PFR..mg. ~lignée*isolat*traitement, data=phosphate)
> summary(anovaPFR)
                         Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
lignée                    1   23.9   23.93   1.219 0.2738
isolat                    4  116.2   29.05   1.480 0.2189
traitement                1  124.7  124.68   6.352 0.0143 *
lignée:isolat             4  102.7   25.67   1.308 0.2768
lignée:traitement         1   43.5   43.50   2.216 0.1416
isolat:traitement         4  127.3   31.83   1.622 0.1798
lignée:isolat:traitement  4   16.4    4.10   0.209 0.9327
Residuals                63 1236.5   19.63
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 46. Analyse de variance de l'AUDPC chez la lignée F83005.5 inoculée avec 35 isolats de rhizobium à 2 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 10 jours après le semis en culture sur Jiffy. Les valeurs ont été obtenues à partir de 8 plantes pour chaque traitement.

```
> anovaaudpcss<- aov(AUDPC ~ Rhizobium,data=Yousra1ss)
> summary(anovaaudpcss)
             Df   Sum Sq   Mean Sq F value Pr(>F)
Rhizobium    35 0.001911 5.460e-05   1.372 0.0898 .
Residuals   231 0.009190 3.978e-05
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 47. AUDPC de F83005.5 inoculées avec 35 isolats de Rhizobium de Tunisie. Les valeurs ont été obtenues à partir d'au moins 8 plantes pour chaque traitement. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en excluant les témoins négatifs. Les isolats avec la même lettre sont dans le même groupe.

Isolat de rhizobium	**AUDPC**
II3.23/4	0,0201 a
B.oun3	0,0188 a
H1	0,0168 ab
B.oun5	0,0167 ab
B4	0,0166 ab
H2	0,0163 ab
O.Mn12	0,0163 ab

O.M3	0,0156 ab
O.Mn7	0,0151 ab
J13	0,0147 ab
B.oun4	0,0145 ab
O.Mn13	0,0143 ab
O.Mn10	0,0141 ab
Th2	0,0141 ab
B.oun2	0,0140 ab
Contrôle positif	0,0139 ab
B2	0,0135 ab
B3	0,0135 ab
O.M1	0,0135 ab
H4	0,0134 ab
B.oun6	0,0134 ab
O.Mn11	0,0133 ab
J15	0,0130 ab
O.Mn5	0,0126 ab
O.M2	0,0124 ab
B.oun1	0,0118 ab
B1	0,0116 ab
O.M5	0,0114 ab
B6	0,0112 ab
O.M4	0,0110 ab
Th1	0,0109 ab
O.Mn6	0,0108 ab
Th4	0,0100 ab

O.M6	0,0096 ab
H3	0,0096 ab
10.23/R29	0,0042 b

Annexe 48. Analyse de variance du MSS chez la lignée F83005.5 inoculée avec 35 isolats de rhizobium à 2 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 10 jours après le semis en culture sur Jiffy. Les valeurs ont été obtenues à partir de 8 plantes pour chaque traitement.

```
> anovamssss<- aov(MSS ~ Rhizobium,data=Yousra1ss)
> summary(anovamssss)
             Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Rhizobium    35   70.2   2.005   1.333  0.111
Residuals   231  347.5   1.504
> 
```

Annexe 49. Analyse de variance de l'AUDPC chez la lignée F83005.5 inoculée avec 35 isolats de rhizobium à 6 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 13 jours après le semis en culture sur Jiffy. Les valeurs ont été obtenues à partir de 8 plantes pour chaque traitement.

```
> anovaaudpcss<- aov(AUDPC ~ Rhizobium,data=Yousra2natss)
> summary(anovaaudpcss)
             Df   Sum Sq   Mean Sq F value   Pr(>F)
Rhizobium    35 0.003316 9.476e-05    4.29 1.11e-12 ***
Residuals   315 0.006957 2.209e-05
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> 
```

Annexe 50. Analyse de variance du MSS chez la lignée F83005.5 inoculée avec 35 isolats de rhizobium à 6 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 13 jours après le semis en culture sur Jiffy. Les valeurs ont été obtenues à partir de 8 plantes pour chaque traitement.

```
> anovamssss<- aov(MSS ~ Rhizobium,data=Yousra2natss)
> summary(anovamssss)
             Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Rhizobium    35  94.53  2.7009   3.426 3.52e-09 ***
Residuals   315 248.35  0.7884
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> 
```

Annexe 51. AUDPC et MSS de F83005.5 inoculées avec 35 isolats de Rhizobium de Tunisie. Les valeurs ont été obtenues à partir d'au moins 8 plantes pour chaque traitement. Des

groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en excluant les témoins négatifs. Les isolats avec la même lettre sont dans le même groupe.

Isolats de Rhizobium	**AUDPC**	**MSS**
O.M5	0,0188 a	4,00 a
J13	0,0180 ab	3,85 ab
O.M6	0,0180 ab	3,80 ab
Th2	0,0175 ab	3,75 abc
O.M4	0,0173 abc	3,70 abc
B2	0,0162 abcd	3,45 abcd
H3	0,0162 abcd	3,50 abcd
O.Mn5	0,0160 abcd	3,28 abcde
B.oun1	0,0158 abcde	3,70 abc
Th1	0,0157 abcde	3,44 abcd
O.Mn6	0,0152 abcdef	3,56 abcd
B.oun5	0,0151 abcdef	3,20 abcde
B.oun2	0,0151 abcdef	3,55 abcd
Contrôle positif	0,0147 abcdef	3,21 abcde
H4	0,0146 abcdef	3,55 abcd
O.M3	0,0145 abcdef	3,40 abcd
B.oun4	0,0140 abcdef	2,90 abcde
Th4	0,0138 abcdef	3,40 abcd
B1	0,0133 abcdefg	3,05 abcde
H2	0,0133 abcdefg	3,80 ab
II3.23/4	0,0131 abcdefg	3,00 abcde
O.Mn10	0,0130 abcdefg	2,85 abcde
B.oun6	0,0130 abcdefg	3,15 abcde
B3	0,0129 abcdefg	3,45 abcd

B.oun3	0,0118 abcdefg	2,75 abcde
J15	0,0118 abcdefg	3,00 abcde
O.Mn12	0,0109 abcdefg	2,83 abcde
O.Mn7	0,0108 abcdefg	2,94 abcde
O.M2	0,0105 bcdefg	2,45 abcde
10.23/R29	0,0103 bcdefg	2,55 abcde
B4	0,0098 cdefg	2,36 bcde
O.M1	0,0094 cdefg	2,75 abcde
O.Mn11	0,0091 defg	2,65 abcde
O.Mn13	0,0079 efg	2,06 de
B6	0,0075 fg	2,22 cde
H1	0,0061 g	1,89 e

Annexe 52. Analyse de variance de l'AUDPC chez la lignée F83005.5 inoculée avec RCR2011 et 44 de ses mutants à 6 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 13 jours après le semis en culture sur Jiffy. Les valeurs ont été obtenues à partir de 8 plantes pour chaque traitement.

```
> anovaaudpcss<- aov(AUDPC ~ Rhizobium,data=Yousra2mutss)
> summary(anovaaudpcss)
             Df   Sum Sq   Mean Sq F value  Pr(>F)
Rhizobium    45 0.002479 5.510e-05    2.32 1.2e-05 ***
Residuals   346 0.008217 2.375e-05
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 53. Analyse de variance de MSS chez la lignée F83005.5 inoculée avec RCR2011 et 44 de ses mutants à 6 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 13 jours après le semis en culture sur Jiffy. Les valeurs ont été obtenues à partir de 8 plantes pour chaque traitement.

```
> anovamssss<- aov(MSS ~ Rhizobium,data=Yousra2mutss)
> summary(anovamssss)
             Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Rhizobium    45  103.8  2.3058   2.324 1.16e-05 ***
Residuals   346  343.3  0.9922
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 54. AUDPC et MSS de F83005.5 inoculées avecRCR2011 et 44 de ses mutants. Les valeurs ont été obtenues à partir d'au moins 8 plantes pour chaque traitement. Des groupes de moyennes ont été obtenus avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) en excluant les témoins négatifs. Les isolats avec la même lettre sont dans le même groupe.

Isolats de Rhizobium	**AUDPC**	**MSS**
Mt25	0,0173 a	4,00 a
Mt8	0,0166 ab	4,00 a
Mt22	0,0151 abc	3,22 abc
Mt29	0,0147 abc	3,64 abc
Mt23	0,0146 abc	3,75 ab
Contrôle positif	0,0146 abc	3,04 abc
Mt28	0,0145 abc	3,67 abc
Mt2	0,0143 abc	3,10 abc
RCR2011	0,0141 abc	3,30 abc
Mt17	0,0141 abc	3,22 abc
Mt20	0,0139 abc	3,62 abc
Mt16	0,0139 abc	3,78 ab
Mt3	0,0138 abc	2,75 abc
Mt27	0,0136 abc	3,56 abc
Mt36	0,0133 abc	3,00 abc
Mt26	0,0127 abc	3,28 abc
Mt9	0,0124 abc	3,33 abc

Mt41	0,0124 abc	3,05 abc
Mt7	0,0123 abc	2,83 abc
Mt39	0,0122 abc	2,85 abc
Mt14	0,0119 abc	2,86 abc
Mt24	0,0118 abc	2,86 abc
Mt30	0,0117 abc	3,00 abc
Mt44	0,0116 abc	2,60 abc
Mt38	0,0115 abc	2,55 abc
Mt6	0,0111 abc	3,19 abc
Mt42	0,0111 abc	2,65 abc
Mt34	0,0110 abc	2,65 abc
Mt18	0,0109 abc	2,95 abc
Mt43	0,0104 abc	2,80 abc
Mt1	0,0102 abc	2,60 abc
Mt21	0,0101 abc	2,29 abc
Mt5	0,0099 abc	2,58 abc
Mt31	0,0099 abc	2,78 abc
Mt15	0,0098 abc	2,79 abc
Mt37	0,0098 abc	2,35 abc
Mt12	0,0097 abc	2,37 abc
Mt10	0,0093 abc	2,50 abc
Mt32	0,0088 abc	2,15 abc
Mt11	0,0079 abc	2,25 abc
Mt4	0,0077 bc	2,30 abc
Mt33	0,0075 bc	1,83 bc
Mt19	0,0075 bc	2,61 abc

Mt35	0,0075 bc	2,33 abc
Mt40	0,0071 bc	2,00 bc
Mt13	0,0067 c	1,75 c

Annexe 55. Analyse de variance de l'AUDPC chez la lignée F83005.5 inoculée avec 10 isolats de rhizobium naturels (H4, B1, II3.23/4, 10.23/R29, H3, O.M6, B.oun5, O.M2, B.oun2, O.M3) et un mutant (Mt13) à 2 et 8 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 10 et 17 jours après le semis en culture sur Jiffy. Les valeurs ont été obtenues à partir de 8 plantes pour chaque traitement.

```
> anovaaudpcss<- aov(AUDPC ~ Rhizobium*Age,data=Yousra3ss)
> summary(anovaaudpcss)
               Df   Sum Sq   Mean Sq F value Pr(>F)
Rhizobium      11 0.000495 4.497e-05   1.588 0.0978 .
Age             1 0.000165 1.647e-04   5.816 0.0162 *
Rhizobium:Age  11 0.000486 4.416e-05   1.560 0.1065
Residuals     620 0.017555 2.831e-05
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Annexe 56. Analyse de variance du MSS chez la lignée F83005.5 inoculée avec 10 isolats de rhizobium naturels (H4, B1, II3.23/4, 10.23/R29, H3, O.M6, B.oun5, O.M2, B.oun2, O.M3) et un mutant (Mt13) à 2 et 8 jours après le semis et la souche de Verticillium V31.2 à 10 et 17 jours après le semis en culture sur Jiffy. Les valeurs ont été obtenues à partir de 8 plantes pour chaque traitement.

```
> anovamssss<- aov(MSS ~ Rhizobium*Age,data=Yousra3ss)
> summary(anovamssss)
               Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Rhizobium      11   11.8   1.071   0.982  0.461
Age             1    1.0   1.029   0.944  0.332
Rhizobium:Age  11   16.1   1.464   1.344  0.196
Residuals     620  675.7   1.090
>
```

Annexe 57. Article soumis dans Spanish Journal of Agricultural Research (SJAR)

Diversity of Tunisian *Rhizobia* for solubilization of phosphate and symbiosis with *Medicago truncatula*

Youssra Miloud-Iriart[1,2], Yassine Mabrouk[2,3], Imen Hemissi[4], Marwen Akermi[5], Omrane Belhadj[2] and Martina Rickauer[1]

[1] Ecolab, University of Toulouse, CNRS, 18 Chemin de Borde Rouge, 31326 Castanet-Tolosan, France.

[2] Laboratory of Biochemistry and Technobiology, Faculty of Sciencee Tunis, University of Tunis El Manar, 2092 El Manar Tunis, Tunisia.

[3] National Centre of Nuclear Science and Technologies, Technological site - 2020 Sidi Thabet, Tunisia. yassine.mabrouk@gmail.com

[4] National Institut of Agronomic Research of Tunisia, Rue Hédi Karray, 2049 Ariana, Tunisia.

[5] Faculty of Science of Gafsa, University Campus Sidi Ahmed Zarroug, 2112 Gafsa, Tunisia.

Youssra MILOUD-IRIART: Analysis and interpretation of data, statistical analysis, drafting of the manuscript,
Yassine MABROUK: Coordinating the research project
Imen HMISSI: Nitrogen dosage
Marwen AKERMI: Rhizobium collection
Omrane BELHADJ: Supervising the work
Martina RICKAUER: Supervising the work, critical revision of the manuscript for important intellectual content

7 tables, 6 figures and 13 Supplementary materials

Agricultural environment and ecology

The project was funded a PHC Utique program 13G0925.

The authors have declared that no competing interests exist"

Abstract

Legume plants play an important role in agriculture because of their ability to form symbioses with nitrogen-fixing *rhizobium* on their roots. In addition, some *Rhizobium* strains have the ability to solubilize phosphate thus providing assimilable phosphorus to host plants. The present study evaluates the ability of Tunisian *rhizobia* to solubilize phosphate and their symbiotic efficiency with *Medicago truncatula.* Thirty-six rhizobial isolates sampled from root nodules of *M. truncatula* from different regions in Tunisia were used in this work. About 60% of these isolates were able to solubilize phosphate *in vitro*. In a second step three selected phosphate solubilizing rhizobia and one isolate not able to solubilize phosphate *in vitro* were used for symbiosis studies with four *M. truncatula* lines in a growth chamber. Inoculation of the four *M. truncatula* lines with the selected rhizobial isolates showed significant interaction between isolates and lines for nodule formation. All tested rhizobial isolates increased shoot biomass of the plant, reduced root biomass and led to higher N content of aerial parts. The results of this study suggest that selected rhizobial isolates could be used as biofertilizers in poor soils to reduce the use of chemical nitrogen and phosphorus fertilizers.

Keywords: Biodiversity, Legume plants, Nitrogen fixation, Plant growth promoting bacteria, Rhizobia.

Introduction

Agricultural productivity is highly dependent on nitrogen (N) and phosphorus (P) availability in the soil, elements which are essential for plant growth.

Although 78 % of the atmospheric air is N, this gaseous form is unavailable for direct assimilation by plants. On the other hand, P is relatively immobile and present only in low concentrations in the soil. Farmers use various industrial N and P fertilizers to enhance crop yields, but industrial fertiliser production has high energy cost for N, and relies on resources which may be exhausted in the next 100 years for phosphate (Cordell *et al.,* 2009). In addition, leakage into ground water leads to pollution and eutrophication of the environment (Tóth *et al.,* 2007), whereas fixation as insoluble forms in the case of P strongly diminishes its biological availability (Sharma *et al.,* 2013). On the other hand, the soil contains a vast array of microorganisms among them species able to fix atmospheric nitrogen or solubilize phosphorus and which might be used to improve plant nutrition.

Plants of the legume family (*Fabaceae*) are able to establish a symbiotic interaction with soil bacteria termed Rhizobia which are able to fix atmospheric N in specific root structures, called nodules. Part of the fixed N is not used by the host plant but diffuses into the soil. This benefits to the whole agricultural system, by improving soil fertility, plant growth and limiting the use of chemical fertilizers (Ouma *et al.,* 2016). In agricultural settings, ca. 80% of this biologically fixed N derives from symbiosis involving legume plants and Rhizobia (Vance, 1998).

More generally, plants may benefit from the presence of plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in the soil (Freitas & Germida 1990). This interaction is not limited to legume plants and involves bacteria from various families. PGPR may solubilize nutrients for the plant, influence hormonal balance, or protect against pathogens (Vejan *et al.,* 2016), thus improving plant growth and yields.

The effects of rhizobia as PGPR have been described in numerous studies, they enhance plant growth and crop yield not only by nitrogen fixation but also by production of phytohormones IAA, gibberellins and cytokinins (Phillips & Torrey 1970), or by improving the supply of insoluble nutrients such as phosphorus (Zarrin *et al.,* 2006) by producing organic acids.

For sustainable agriculture it will be necessary to develop efficient management of beneficial soil microorganisms, be they bacteria or fungi, to reduce the need for industrial fertilizers.

In order to assess the potential of Tunisian Rhizobia as PGPR for legume plants, we determined the capacity to solubilize phosphate of symbiotic Rhizobia isolated from wild-growing *M. truncatula* in central Tunisia. We further assessed their efficiency of nodulation, biological nitrogen fixation and on growth of the host plant with a subset of 4 isolates differing in P solubilizing ability.

Material and Methods

Plant Material

Four lines of *M. truncatula* were used in this work, namely the reference line Jemalong A17 (Young et al. 2011), F83005.5 (France), DZA315.16 (Algeria), TN8.3 (Tunisia). They were grown in the greenhouse at Ecolab for seeds production.

Bacterial isolates

The rhizobial isolates were isolated in spring 2014 from nodules of healthy *M. truncatula* plants collected from six sites in the center of Tunisia, Ben Aoun, Thalapet, Bir el Hfay, Oued Miou, Sidi Bouzid, and Ouled Mnacer, as described by Beattie & Handelsman (1989). Plants were carefully uprooted and the root system was washed under running water to remove the adhesive soil particles. The nodules were surface sterilized in a solution of 1% sodium hypochlorite for 2 minutes and then washed repeatedly with sterile distilled water followed by 70% ethanol for 1 minute and again sterile distilled water. Each nodule was crushed in a sterile tube, and the pulp was streaked on Petri dishes containing Yeast Extract-Mannitol agar (YEMA) medium with 0.0025% Congo Red and incubated for 4 to 7 days at 28 degree Celsius.

Thirty–one rhizobial isolates were purified and were maintained on slopes of yeast extract mannitol agar (Vincent, 1970) and as glycerol stocks until use. Four further isolates were obtained from the Centre of Biotechnology Borj Cedria (**Table 1**).

In vitro phosphate solubilization

Solubilization assays were performed in Petri dishes with insoluble Calcium phosphate ($CaHPO_4$) as the sole source of P in a solid Pikovskaya medium containing ($g.L^{-1}$) (Glucose, 10; NaCl, 0.2; KCl, 0.295; $MgSO_4,7H_2O$, 0.41; NH_4NO_3, 0.373; $FeCl_3$, 0.003; Yeast extract, 3; Agar, 20), this growth medium was supplemented with 0.7g/l of $CaHPO_4$ as described in (Hmissi *et al.*, 2015).

From a fresh culture of rhizobium (48h on YEMA medium), a point was placed on the surface of the Pikovskaya medium and Petri dishes were incubated at 28°C. Pikovskaya medium containing $CaHPO_4$ has a milky appearance and Rhizobium isolates able to solubilize phosphate were distinguished by producing a translucent halo around the bacterial colony. The diameter of the colony (dc) and the total halo diameter including the colony (dh) were measured after 7 and 15 days of incubation in order to calculate the Phosphate Solubilization Index (PSI) as described by Marra et al. (2011): PSI=dh (mm) / dc (mm).

Three independent experiments with four technical replicates were performed for the thirty-six rhizobium isolates.

Symbiotic test

Seeds of *M. truncatula* were scarified, kept on moist filter in a Petri dish for three days at 4°C in dark, and were subsequently transferred to room temperature for 24 hours. Germinated seedlings were transferred to a mixture of sterilized Perlite/soil (2/1, v/v) in 500ml pots (3

plants per pot) and inoculated 2 days later by adding 3 ml of a bacterial suspension (10^7 bacteria/ml) to the basis of each plant. The plants were grown at 25°C with a photoperiod of 16h/8h. Two independent experiments were performed, each with 9 plants per line and condition. Four Rhizobium isolates were tested for their ability to nodulate four *M. truncatula* lines.

Eight weeks later, plants were harvested, nodules were counted and dry weight of shoots and roots were determined.

Measurement of plant nitrogen content

The dried aerial parts from 3 plants (from one pot) were pooled and ground to powder in a mortar with a pestle and then with a hammer mill (type LM 3100). Nitrogen content was determined with the Kjeldahl method as described by (Kjeldahl, 1883) .

Data and statistical analysis

All data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) using the appropriate model depending on the experimental designs used. ANOVA analyses are done on the average of 3 plants belonging to the same pot.

Pairwise treatment differences were determined by a Tukey's test or Newman-Keuls test using the "agricolae" package of the R system for statistical computing and graphing (R Core Team, 2012).

Results

Rhizobium isolates from Tunisia are able to solubilize phosphate

To obtain various Rhizobium isolates able to establish symbiosis with the legume model *M. truncatula*, sampling was conducted on wild growing plants of this species in 6 regions in the centre of Tunisia. A total of 31 pure isolates (**Table 1**) were obtained and maintained as glycerol stocks until use. In addition, 4 strains from the collection of CBBC and the sequenced reference strain RCR2011 were included.

Rhizobacteria may provide a form of P available for uptake by plants based on their ability to solubilize inorganic phosphate. Hence we assessed the ability of the 36 Rhizobium isolates to solubilize $CaHPO_4$. The $CaHPO_4$ – containing medium has a milky appearance and solubilization of phosphate is visible as a translucent halo around the bacterial colony. Many, but not all, Rhizobia isolates produced indeed a translucent halo on this medium. In total, twenty-two of the 36 isolates (i.e. 61%) were able to solubilize phosphate under our experimental conditions. The solubilization efficiency was calculated as PSI, after 7 (PSI7) and 15 days of culture (PSI15). As shown in **Fig. 1**, seven isolates (B.oun3, B.oun6, H3, H4, O.M2, O.M5 and Th4) were weakly solubilizing, with halos appearing only after 15 days of culture, and PSI values consistently lower than that of the other isolates. Fifteen rhizobial isolates showed pronounced phosphate solubilization with visible halos and PSI7 values ranging from 1.73 to 4.98. Maximum solubilization was observed for B.oun2 (SPI7 = 4.98) followed by J13 (PSI7 = 4.62). The solubilization index generally increased further after 15 days of culture, and was maximum for isolate J13 (PSI15 = 5.34) followed by B.oun2 (PSI15 = 4.82) and II3.23/4 (PSI15 = 4.63). The slightly lower values of PSI15 compared to PSI7 observed for 3 Rhizobium isolates (B.oun1, B.oun2, B4 and O.M4) are due to strong colony growth in the halo-zone. Mean values of PSI at 7 and 15 days and groups of means are shown in **Tables 2 and 3**. It should be noted that the ability to solubilize phosphate was found for strains from all 6 sampling sites.

Statistical analysis by ANOVA shows that the difference of PSI values between the various isolates is highly significant with p-values $2e^{-16}$ at 7 and 15 days (**Table S1[supplementary]**).

In order to study beneficial effects of Tunisian rhizobia isolates on their host plant *M. truncatula*, 4 isolates were selected for further work: B.oun2, J13 and II3.23/4 exhibited strong P solubilization activity, whereas OMn13 was not able to solubilize phosphate in our *in vitro* assay. These isolates also differed by their sites of origin.

Inoculation of four *Medicago truncatula* lines by different Rhizobium isolates shows strong interaction of genotype and isolate on nodulation

The four Tunisian Rhizobium isolates selected above were studied for their capacity to establish symbiosis with their host plant by inoculating four *M. truncatula* accessions from 4 different geographical origins.

Examination of the plants' root systems after two months of culture showed that inoculation with Rhizobium isolates induced the formation of nodules on all four *M. truncatula* accessions. Significant differences in nodule number were observed for the various combinations of lines and isolates (**Fig.2A, Table S4 [supplementary]**). The maximum number of nodules was obtained for O.Mn13 inoculated on line A17 (mean value 66.39 nodules per plant), followed by B.oun2 inoculated on the same line (mean value 54.45 nodules per plants) and the minimum for B.oun2 inoculated on line F83005.5 (mean value 12.45 nodules per plant).

None of the uninoculated control plants of the four *M. truncatula* lines exhibited nodules.

Statistical analysis by ANOVA (**Table S2 [supplementary]**) shows an extremely high variability of nodulation with a p-value of $5.15e^{-10}$ for effect of line, a p-value of 0.0204 for effect of Rhizobium isolate and $4.28e^{-6}$ for the interaction line*isolate. This interaction is also visible in **Fig. 2B.**

Inoculation of four *Medicago truncatula* lines by different Rhizobium isolates increases Shoot Weight

The most visible benefit from symbiosis with Rhizobium is an improvement of plant growth. Hence we assessed the biomass of aerial parts from inoculated and control plants.

Growth and leaf colour of all plants was improved by Rhizobium inoculation (**Fig. S1 [supplementary]**). The dry aerial biomass of Rhizobium-inoculated plants was consistently higher than that of the non-inoculated controls (**Fig. 3)**.

Statistical analysis of variance of the shoot dry weight parameter on all plants (**Table S3 [supplementary]**) showed that there was a highly significant isolate effect (p-value = $2e^{-16}$) probably due to low values of control plants, a highly significant effect of *M. truncatula* line (p-value = $4.57e^{-7}$) and a subsignificant interaction Rhizobium isolate**M. truncatula* line (p-value = 0.0791), as also revealed by Newman Keuls test (**Table 5**).

Statistical analysis of variance of the shoot dry weight (without control plants) showed that there was no effect of Rhizobium isolate (p-value = 0.9164) but the highly significant effect of *M. truncatula* line (p-value = $3.15e^{-5}$) and subsignificant interaction between line of *M. truncatula* and rhizobium isolate were conserved. Newman Keuls test places inoculated plants in two different groups; one containing plants from *M. truncatula* lines A17 (1.2g/plant), DZA315.16 (1.15g/plant) and F83005.5 (1.1g/plant) and the other plants from TN8.3 *M. truncatula* line (0.92 g/plant).

The ratio of biomass (**Table S4 [supplementary]**) from inoculated versus non-inoculated plants, also indicates significant difference in growth stimulation between lines, with highest values for line TN8.3 inoculated with either of the 4 isolates (from 2.18 for B.oun2 to 3.03 for O.Mn13), whereas the 3 other lines have quite similar ratios ranging from 1.5 to 1.94.

Inoculation of four *Medicago truncatula* lines by different Rhizobium isolates decreases Root Weight

Symbiosis with Rhizobium not only increased the aerial biomass of plants but had also consequences on their root development. Inoculation of the four rhizobium isolates from different sites of Tunisia consistently induced a decrease in root dry biomass for all plants (**Fig. 4**).

Analysis of variance (**Table S5 [supplementary]**) shows a highly significant effect of inoculation (p-value = $2.65e^{-11}$). ANOVA of root biomass of inoculated plants (**Table S6 [supplementary]**) a very significant effect of isolate (p-value = 0.0385), and two groups: plants inoculated with O.Mn13 in one group (with 0.72g/plant) and plants inoculated with the other three rhizobium isolates in another group (RDW means between 0.67 and 0.68g). No significant effect of line or a line*isolate interaction was observed.

All ratios of root dry weight from inoculated vs. control plants (**Table S4 [supplementary]**) are less than 1 and vary between 0.67 (II3.23/4 inoculated on F83005.5) and 0.86 (O.Mn13 inoculated to A17) illustrating that in all cases the control plants have more developed roots.

Rhizobium symbiosis leads to increase in nitrogen content of most but not all plants

Since fixation of atmospheric nitrogen is the main characteristic of rhizobial symbiosis, the total N content was determined from aerial parts of inoculated and non-inoculated plants. Some variability between genotypes was observed for non-inoculated controls, with nitrogen content mean values ranging from 16.94 to 22.22 ‰. ANOVA (**Table S7 [supplementary]**) showed that this difference was not significant (p-value = 0.277).

Symbiosis with the four Rhizobium isolates significantly increased nitrogen content in the four *M. truncatula* lines except in line F83005.5 inoculated with Rhizobium isolate B.oun2 (**Fig. 6**).

ANOVA (**Table S8 [supplementary]**) showed a highly significant effect of isolate (p-value= $7.76e^{-16}$), and line (p-value= 0.00736), and also a highly significant line*isolate interaction (p-value= $6.59e^{-5}$).

Thus, two groups of means are formed: uninoculated plants and line F83005.5 inoculated with B.oun2 in one group and all other inoculated plants regardless of line and isolate in the second group (**Table 7**). It should be noted that plants of line F83005.5 inoculated with B.oun2 also had the lowest number of nodules (**Fig. 1**).

When statistical analysis was performed without taking into account the control plants (**Table S9 [supplementary]**), the Rhizobium effect was still present but weaker (p-value= 0.0616). Two groups of means were revealed; the first contains F83005.5 *M. truncatula* plants inoculated with B.oun2 and the second contains all other inoculated plants regardless of line and Rhizobium isolate (data not shown). The pronounced difference between line F83005.5 inoculated with B.oun2 and all other inoculated lines is the reason for the observed genotype*isolate interaction mentioned above. When ANOVA was conducted with

inoculated plants only and excluding line F83005.5 inoculated with B.oun2 (**Table S10 [supplementary]**), a significant difference was only detected between isolates (p-value = 0.0494). However neither Newman-Keuls test nor HSD test revealed different means groups.

Hence it can be considered that the beneficial effect on nitrogen levels was roughly the same for most combinations of Rhizobium isolates and *M. truncatula* lines, but exceptions such as F83005.5 inoculated with B.oun2 show that this effect cannot be generalized.

Discussion

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) include those that are free-living, endophytes that can colonize some or a portion of a plant's interior tissues, and those that form specific symbiotic relationships with plants such as Rhizobia spp. and Frankia spp. (Glick, 2012). Among the soil microorganisms, some PGPRs may improve plant growth by providing nutrients directly to the plant or by facilitating their uptake. The capacity of phosphate solubilizing microorganisms to solubilize phosphorous complexes has been attributed to their ability to reduce the pH of the surroundings. Organic acids such as citrate, lactate or, succinate secreted by PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) contribute to phosphate solubilization in the rhizosphere; this effect is most visible in basic soils (Khan *et al.,* 2010**)**. The secreted organic acids can either directly dissolve the mineral phosphates as a result of anion exchange or can chelate both Fe and Al ions associated with phosphate (Hariprasad & Niranjana 2009).

Phosphorus levels influence plant growth directly and indirectly. In legume symbiotic interactions, P levels and other complementary nutrient inputs have been shown to influence nodulation and N-fixation. In cowpea, it has been shown that high P levels increased biomass, nodule number and N content (Jemo *et al.,* 2017) and in *Phaseolus vulgaris* phosphorus deficiency affected not only plant growth of *Phaseolus vulgaris* but also symbiotic nitrogen fixation (Christiansen & Graham, 2002).

In our study, we focus on rhizobia isolated from nodules of *M. truncatula* in the center of Tunisia and their beneficial effect on the host plant. Some rhizobia have shown an ability to solubilize insoluble phosphate to make it available to plants, and are therefore considered as Phosphate Solubilizing Bacteria (Walpola & Yoon, 2012). This capacity of rhizobia is much less studied than nitrogen fixation in nodules, although it does not seem to be rare. Indeed, in our collection of 36 isolates, 22 have shown the ability to solubilize $CaHPO_4$ *in vitro*.

P solubilizing ability was found in Rhizobium isolates from all sites. However, whereas all 6 isolates from Sidi Ali Ben Aoun were positive, only one out of 7 isolates from Ouled Mnasser showed P solubilization. Although the sampling size is too small to establish any correlations, it is tempting to think that this might reflect local adaptation to soil conditions.

Improved host P nutrition by arbuscular mycorrhizal fungi is well documented both for natural ecosystems and agroecosystems with the external mycelium playing a key role in P uptake due to the strong expansion of the plant-soil interface (Smith & Smith 2011). However, uptake of phosphate by arbuscular mycorrhizal fungi either from mineral or organic forms is most likely due to solubilization by associated Phosphate Solubilizing Microorganisms (Bagyaraj *et al.,* 2015; Zhang et *al.,* 2016). P solubilization from rhizosphere microorganisms including plant growth promoting bacteria and fungi other than arbuscular mycorrhizal fungi has been suggested as a natural way to improve plant P nutrition. Most studies on P solubilization by microorganisms are based on *in vitro* assays with different forms of mineral P, which however do not always reflect what may happen in the natural soil environment (Bashan *et al.,* 2013).

We studied the establishment of symbiosis and its effect on plant growth with 4 selected isolates from different sampling sites and with contrasted ability to solubilize phosphate. These 4 Rhizobium isolates were inoculated on four different lines of *M. truncatula* also from different geographical origin and with known contrasted behaviour concerning resistance to disease (Ramírez-Suero *et al., 2010*; Ben *et al.,* 2013a, b; Negahi *et al.,* 2013) or abiotic stress such as Cadmium or salt stress (Rahoui *et al.,* 2015; Arraouadi *et al.,* 2011). Line A17 and DZA315.16 are also differing in their symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti* strain RCR2011 and several QTL involved in the control of nitrogen nutrition have been described (Moreau *et al.,* 2012). The results of our experiments show high variability in nodulation and its effects on shoot and root weight and Nitrogen content.

The maximum number of nodules was obtained for O.Mn13 inoculated on line A17 (66.39 nodules per plant) and the minimum for B.oun2 inoculated on line F83005.5 (12.45 nodules per plant). A strong genotype*isolate interaction was observed.

Since the process of nitrogen fixation requires a large amount of energy in the form of ATP, plant and/or bacterium genotype effects on the energetic status of the bacteria might play a role. Inoculation of bean plants with a genetically modified *Rhizobium tropici* strain which had shunted carbon source allocation to ATP synthesis rather than glycogen synthesis, resulted in a significant increase in the number of nodules and in plant dry weight compared to inoculation with the wild-type strain (Marroqui *et al.,* 2001)

Genotype effects on ethylene synthesis may also be involved. In alfalfa, about 95 to 99% of infection thread progressions abort in the cortex (Vasse *et al.,* 1993), probably due to high levels of ethylene. However, some rhizobial strains enhance nodulation by lowering the ethylene levels in their host legumes by producing enzymes degrading the ethylene precursor or the ethylene biosynthesis inhibitor rhizobitoxine (Okazaki *et al.,* 2004). The result of lowering the level of ethylene in legume hosts is that both the number of nodules and the biomass of the plant may be increased by 25–40% (Ma *et al.,* 2004). Co-inoculation with PGPRs other than rhizobia may improve nodulation by rhizobia through modification of root architecture or decrease of ethylene levels in the root by releasing ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase. In this sense, Shaharoona et al. (2006) reported that coinoculation of mung bean (*Vigna radiata* L.) with Bradyrhizobium-associated PGPR improved nodulation by 48% compared to inoculation with *Bradyrhizobium* alone. This synergistic effect may also be caused by higher survival rates of both microbes n the rhizosphere, as reported by Afzal *et al.,* (2010),

The aerial biomass of *M. truncatula* increased considerably with rhizobia inoculation. All the inoculated plants of lines A17, F83005.5 and DZA315.16 increased at least 1.5 times their weight, those of TN8.3 inoculated with O.Mn13 even tripled in weight. These results illustrate well the beneficial effect of Rhizobium symbiosis and their potential as alternative for chemically synthesized N fertilizers. Likewise, Fitouri et al. (2012) reported that rhizobial inoculation of *Sulla coronarium L.* with *Rhizobium sullae* HC14 promoted plant height and biomass production similar to a fertilization with 90 units of nitrogen. It should be noted that line A17 which is less performing than DZA315.16 in the interaction with *Sinorhizobium*

meliloti RCR2011 (Moreau *et al.,* 2012), exhibited higher nodule numbers and increases in shoot biomass as DZA315.16 with the tunisian isolates. This highlights the existence of a strong effect of genotype and isolate for symbiotic efficiency.

In contrast to shoot biomass, the root biomass of all plants inoculated with rhizobia was considerably reduced, all ratios of inoculated weight / control weight are less than 1. This is in agreement with published observations that legumes grown in the presence of mineral N in the greenhouse usually had a more developed root system than plants depending strictly on N-fixing symbiosis (Schulze *et al.,* 1999). Voisin *et al.,* (2002) suggest that during the early vegetative growth period, root growth is in competition with nodule morphogenesis in soil with low mineral N availability and rooting density increased with the fertiliser N level.

With the exception of F83005.5 plants inoculated with isolate B.oun2, which showed a lower amount of nitrogen in the aerial parts than uninoculated control plants of the same line (and which also had the lowest number of nodules), all the other inoculated plants showed an increase at least one and a half times the amount of nitrogen in the controls. Hence nodulation not only improved growth and biomass of *M. truncatula* but also its nutritional value as a fodder plant. However, nodule number, and increases in plant biomass and nitrogen content were not strictly correlated, illustrating the fact that several layers of genetic and metabolic control are involved in the use of nitrogen for plant growth and development.

In addition to effects of genotype of both host plant and bacteria as reported in the present work, nodulation and its consequences for the plant and the viability of microbial community in the soil can be affected by temperature, drought stress and soil texture (Mendes & Bottomley 1998; Zahran, 1999). These factors were not included in our study. Our results show that soil microbes such as Rhizobia may have multiple beneficial effects and are without doubt a useful and sustainable tool to increase crop production in agriculture. But they also show that the specificities of strain and plant genotype, together with environmental factors, will make it difficult to develop standardized products for such an approach. The future lies probably in the use of mixtures of microbes, ideally adapted to local environmental conditions.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. K. Zribi (CBBC, Tunisia) for the gift of Rhizobium strains, Dr. A. Sbeiti (Ecolab) for help with statistical analyses, and Drs. C. Ben and L. Gentzbittel (Ecolab) for helpful discussions. Y. Miloud-Iriart was supported by grants from the French Ministry of Higher Education and Research, and the Ministry of Foreign affairs in the frame of PHC Utique program 13G0925, and from the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

References

Afzal A, Asghari B, Mussarat F, 2010. Higher Soybean Yield by Inoculation with N-Fixing and P-Solubilizing Bacteria. Agro sust develop 30 (2): 487-495.

Arraouadi S, Chardon F, Huguet T, Aouani ME, Badri M, 2011. QTLs Mapping of Morphological Traits Related to Salt Tolerance in *Medicago Truncatula*. Acta Physiol Plant 33 (3): 917-926.

Bagyaraj DJ, Sharma MP, Maiti D, 2015. Phosphorus Nutrition of Crops Through Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Curr Sci 108 (7): 1288-1293.

Bashan Y, Kamnev AA, Bashan LE, 2013. Tricalcium Phosphate Is Inappropriate as a Universal Selection Factor for Isolating and Testing Phosphate-Solubilizing Bacteria That Enhance Plant Growth: A Proposal for an Alternative Procedure. Bio and Fert Soils 49 (4): 465-479.

Beattie GA, Handelsman J, 1989. A Rapid Method for the Isolation and Identification of Rhizobium from Root Nodules. J microbiol methods 9 (1): 29-33.

Ben C, Debellé F, Berges H, Bellec A, Jardinaud MF, Anson P, Huguet T, Gentzbittel L, Vailleau F, 2013a. MtQRRS1, an R -Locus Required for *Medicago Truncatula* Quantitative Resistance to *Ralstonia Solanacearum*. New Phytologist 199 (3): 758-772.

Ben C, Toueni M, Montanari S, Tardin MC, Fervel M, Negahi A, Saint-Pierre L, Mathieu G, Gras MC, Noël D, Prospéri JM, Pilet-Nayel ML, Baranger A, Huguet T, Julier B, Rickauer M, Gentzbittel L, 2013b. Natural Diversity in the Model Legume *Medicago Truncatula* Allows Identifying Distinct Genetic Mechanisms Conferring Partial Resistance to Verticillium Wilt. J Exper Bot 64 (1): 317-332.

Brockwell J, Holliday RA, Daoud DM, Materon LA, 1988. Symbiotic Characteristics of a Rhizobium-Specific Annual Medic, *Medicago rigidula* (L.) All. Soil Biol Biochem 20 (5): 593-600.

Walpola BC, Yoon MH, 2012. Prospectus of Phosphate Solubilizing Microorganisms and Phosphorus Availability in Agricultural Soils: A review. Afr J Microbiol Res 6 (37): 6600-6605.

Christiansen I, Graham PH, 2002. Variation in Di-Nitrogen Fixation Among Andean Bean (*Phaseolus vulgaris L.*) Genotypes Grown at Low and High Levels of Phosphorus Supply. Field crops res 73 (2-3): 133-142.

Cordell D, Drangert JO, White S, 2009. The Story of Phosphorus: Global Food Security and Food for Thought. Glob Environ Chang 19 (2): 292-305.

Dakora FD, 1985. Nodulation and Nitrogen Fixation by Groundnut in Amended and Unamended Field Soil in Ghana. In Biological fixation in Africa. Proceedings of the first conference of the African association for biological nitrogenfixation (AABNF), Nairobi, Kenya. pp: 324-339.

Zarrin F, Zia M, Chaudhary MF. 2006. Effect of Rhizobium Strains and Phosphorus on Growth of Soybean Glycine Max and Survival of Rhizobium and P Solubilizing Bacteria. Pak J Bot 38 (2): 459.

Dhane Fitouri S, Trabelsi D, Saïdi S, Zribi K, Ben Jeddi F, Mhamdi R, 2012. Diversity of Rhizobia Nodulating Sulla (*Hedysarum Coronarium L.*) and Selection of Inoculant Strains for Semi-Arid Tunisia. Ann Microbiol 62 (1): 77-84.

De Freitas JR, Germida JJ, 1990. Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Winter Wheat. Can J Microbiol 36 (4): 265-272.

Glick BR, 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica: 1-15.

Hariprasad P, Niranjana SR 2009. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Rhizobacteria to Improve Plant Health of Tomato. Plant Soil 316 (1-2): 13-24.

Hmissi I, Abdi N, Bargaz A, Bouraoui M, Mabrouk Y, Mouldi S, Sifi B, 2015. Inoculation with Phosphate Solubilizing Mesorhizobium Strains Improves the Performance of Chickpea (*Cicer Aritenium L.*) Under Phosphorus Deficiency. J Plant Nutr 38 (11): 1656-1671.

Jemo M, Sulieman S, Bekkaoui F, Olomide OAK, Hashem A, Abd_Allah EF, Alqarawi AA, Tran LSP, 2017. Comparative Analysis of the Combined Effects of Different Water and Phosphate Levels on Growth and Biological Nitrogen Fixation of Nine Cowpea Varieties. Front Plant Sci **8**.

Khan MS, Zaidi A, Ahemad M, Oves M, Wani PA, 2010. Plant Growth Promotion by Phosphate Solubilizing Fungi – Current Perspective. Arch Agrono Soil Sci 56 (1): 73-98.

Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M, 2009. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in the Remediation of Metal Contaminated Soils. Environ Chem Lett 7 (1): 1-19.

Kjeldahl JGCT, 1883. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in Organischen Körpern. Z Anal Chem 22 (1): 366-382.

Marra LM, de Oliveira SM, Fonsêca Sousa Soares CR, de Souza Moreira FM, 2011. Solubilisation of Inorganic Phosphates by Inoculant Strains from Tropical Legumes. Sci Agri 68 (5): 603-609.

Marroqui S, Zorreguieta A, Santamaria C, Temprano F, Soberon M, Megias M, Downie JA, 2001. Enhanced Symbiotic Performance by *Rhizobium Tropici* Glycogen Synthase Mutants. J Bacteriol 183 (3): 854-864.

Ma W, Charles TC, Glick BR, 2004. Expression of an Exogenous 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase Gene in *Sinorhizobium Meliloti* Increases its Ability to Nodulate Alfalfa. Appl Environ Microbiol 70 (10): 5891-5897.

Mendes IC, Bottomley PJ, 1998. Distribution of a Population of *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii* among Different Size Classes of Soil Aggregates. Appl environ microbiol 64 (3): 970-975.

Moreau D, Burstin J, Aubert G, Huguet T, Ben C, Prosperi JM, Salon C, Munier-Jolain N, 2012. Using a Physiological Framework for Improving the Detection of Quantitative Trait Loci Related to Nitrogen Nutrition in *Medicago Truncatula*. Theor Appl Genet 124 (4): 755-768.

Negahi A, Sarrafi A, Ebrahimi A, Maury P, Prospéri JM, Ben C, Rickauer M, 2013. Genetic Variability of Tolerance to *Verticillium Albo-Atrum* and *Verticillium Dahliae* in *Medicago Truncatula*. Eur J Plant Pathol 136 (1): 135-143.

Okazaki S, Nukui N, Sugawara M, Minamisawa K, 2004. Rhizobial Strategies to Enhance Symbiotic Interactions: Rhizobitoxine and 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase. Microb Environ 19 (2): 99-111.

Ouma EW, Asango AM, Maingi J, Njeru EM, 2016. Elucidating the Potential of Native Rhizobial Isolates to Improve Biological Nitrogen Fixation and Growth of Common Bean and Soybean in Smallholder Farming Systems of Kenya. International J Agron 1-7.

Phillips DA, Torrey JG, 1970. Cytokinin Production by *Rhizobium japonicum*. Physiol plant 23 (6): 1057-63.

Rahoui S, Chaoui A, Ben C, Rickauer M, Gentzbittel L, El Ferjani E, 2015. Effect of Cadmium Pollution on Mobilization of Embryo Reserves in Seedlings of Six Contrasted *Medicago Truncatula* Lines. Phytochemistry 111: 98-106.

Ramírez-Suero M, Khanshour A, Martinez Y, Rickauer M, 2010. A Study on the Susceptibility of the Model Legume Plant *Medicago Truncatula* to the Soil-Borne Pathogen *Fusarium Oxysporum*. Eur J Plant Pathol 126 (4): 517-530.

Rosenberg CH, Boistard P, Dénarié J, Casse-Delbart F, 1981. Genes Controlling Early and Late Functions in Symbiosis are Located on a Megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. Mol Gen Genet 184 (2): 326-333.

R Core Team (2012). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available online at: http://www.R-project.org/

Schulze J, Adgo E, Merbach W, 1999. Carbon Costs Associated with N_2 Fixation in *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. over a 14-Day Period. Plant Biol 1 (1999): 625-631.

Shaharoona B, Arshad M, Zahir ZA, 2006. Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Containing ACC-Deaminase on Maize (*Zea Mays L.*) Growth under Axenic Conditions and on Nodulation in Mung Bean (*Vigna Radiata L.*). Lett Appl Microbiol 42 (2): 155-159.

Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA, 2013. Phosphate Solubilizing Microbes: Sustainable Approach for Managing Phosphorus Deficiency in Agricultural Soils. Springer Plus 2 (1): 587.

Smith SE, Smith FA, 2011. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. Annu Rev Plant Biol 62 (1): 227-250.

Tóth G, Stolbovoy V, Montanarella L, 2007. Soil Quality and Sustainability Evaluation: An Integrated Approach to Support Soil-Related Policies in the European Union. Office for Official Publications of the European Communities. Luxembourg.

Vance CP, 1998. Legume Symbiotic Nitrogen Fixation: Agronomic Aspects. In: The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria; Kondorosi A, Hooykaas PJJ, Spaink, HP (eds.). pp: 509-530. Springer, Dordrecht.

Vasse J, de Billy F, Truchet G, 1993. Abortion of Infection during the *Rhizobium meliloti*-Alfalfa Symbiotic Interaction is Accompanied by a Hypersensitive Reaction. Plant J 4 (3):555-566.

Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Boyce AN, 2016. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. Molecules 21 (12): 573.

Voisin AS, Salon C, Munier-Jolain NG, Ney B, 2002. Effect of Mineral Nitrogen on Nitrogen Nutrition and Biomass Partitioning Between the Shoot and Roots of Pea (*Pisum sativum L.*). Plant Soil 242 (2): 251-262.

Vincent JM, 1970. A Manual for Practical Study of Root Nodule Bacteria. International Biology programme. Blackwell, Oxford.

Young ND, Debellé F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, *et al*, 2011. The Medicago Genome Provides Insight into the Evolution of Rhizobial Symbioses. Nature.

Zahran HH, 1999. Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation Under Severe Conditions and in an Arid Climate. Microbiol Molec Biol Rev 63 (4): 968-989.

Zribi K, Mhamdi R, Huguet T, El Aouani ME, 2004. Distribution and Genetic Diversity of Rhizobia Nodulating Natural Populations of *Medicago Truncatula* in Tunisian Soils. Soil Biol Biochem 36 : 903-908.

Tables and Figures

Table 1. Origin of Rhizobium isolates.

[1] Obtained from CBBC; [2] (Rosenberg et al. 1981)

Rhizobium isolate	**Location**
10.23/R29[1]	Rhayet, Tunisia
B.oun1	Sidi Ali Ben Aoun,Tunisia
B.oun2	Sidi Ali Ben Aoun,Tunisia
B.oun3	Sidi Ali Ben Aoun,Tunisia
B.oun4	Sidi Ali Ben Aoun,Tunisia
B.oun5	Sidi Ali Ben Aoun,Tunisia
B.oun6	Sidi Ali Ben Aoun,Tunisia
B1	Sidi Bouzid, Tunisia
B2	Sidi Bouzid, Tunisia
B3	Sidi Bouzid, Tunisia
B4	Sidi Bouzid, Tunisia
B6	Sidi Bouzid, Tunisia
H1	Bir El Haffey, Tunisia
H2	Bir El Haffey, Tunisia
H3	Bir El Haffey, Tunisia
H4	Bir El Haffey, Tunisia
II3.23/4[1]	Amra, Tunisie
J13[1]	Jelma, Tunisia
J15[1]	Jelma, Tunisia
O.M1	Oued Miou, Tunisia
O.M2	Oued Miou, Tunisia
O.M3	Oued Miou, Tunisia

O.M4	Oued Miou, Tunisia
O.M5	Oued Miou, Tunisia
O.M6	Oued Miou, Tunisia
O.Mn10	Ouled Mnasser, Tunisia
O.Mn11	Ouled Mnasser, Tunisia
O.Mn12	Ouled Mnasser, Tunisia
O.Mn13	Ouled Mnasser, Tunisia
O.Mn5	Ouled Mnasser, Tunisia
O.Mn6	Ouled Mnasser, Tunisia
O.Mn7	Ouled Mnasser, Tunisia
RCR2011[2]	Australia
Th1	Thélepte, Tunisia
Th2	Thélepte, Tunisia
Th4	Thélepte, Tunisia

Table 2. Phosphate Solubilization Index *in vitro* by Tunisian Rhizobium isolates at 7 days incubation. Only the 22 isolates that solubilise $CaHPO_4$ are represented. Values were obtained from 3 independent experiments with 4 repeats for each one. Letters are obtained from the Student-Newman-Keuls (SNK) test. Isolates with the same letter are in the same group.

Rhizobium isolate	**PSI7 mean value**
B.oun2	4.98 a
J13	4.62 a
H1	3.33 b
II3.23/4	3.22 b
B.oun1	3.05 b
B.oun5	2.43 c
O.Mn12	2.31 cd
B1	2.31 cd
B4	2.13 cd
RCR2011	2.03 cd
O.M4	2.01 cd
B2	1.94 cd
B.oun4	1.93 cd
O.M3	1.85 cd
10.23/R29	1.73 d
B.oun3	0 e
B.oun6	0 e
H3	0 e
H4	0 e
O.M2	0 e
O.M5	0 e

Th4	0 e

Table 3. Phosphate Solubilization Index of $CaHPO_4$ *in vitro* by tunisian Rhizobium isolates at 15 days incubation. Only the 22 isolates that solubilise $CaHPO_4$ are represented. Values were obtained from 3 independent experiments with 4 repeats for each one. Letters are obtained from the Student-Newman-Keuls (SNK) test. Isolates with the same letter are in the same group.

Rhizobium isolate	**PSI15 mean value**
J13	5.34 a
B.oun2	4.82 b
II3.23/4	4.63 b
H1	3.56 c
B.oun5	2.89 d
O.Mn12	2.82 d
B1	2.65 de
10,23/R29	2.48 def
B.oun1	2.47 def
B2	2.41 defg
O.M3	2.21 efg
B.oun4	2.21 efg
B4	2.08 fgh
RCR2011	2.04 fgh
O.M4	1.89 ghi
O.M5	1.86 ghi
B.oun6	1.59 hij
O.M2	1.57 hij
H3	1.44 ij
B.oun3	1.37 ij
Th4	1.34 ij

H4	1.13 j

Table 4. Number of nodules on *M. truncatula* roots inoculated with Rhizobium isolates from Tunisia. Values were obtained from 2 independent experiments with 3 pots for each combination isolate/line (3 plants per pot) in each experiment. Groups of means were obtained with the Student-Newman-Keuls (SNK) test. Isolate/Line combinations with the same letter are in the same group.

Isolate / line	**Mean nodule number**
O.Mn13 / A17	66.39 a
B.oun2 / A17	54.45 ab
J13 / A17	43.28 bc
J13 / F83005.5	41.73 bc
O.Mn1 / TN8.3	41.14 bc
B.oun2 / TN8.3	39.67 bc
II3.23/4 / TN8.3	38.62 bc
II3.23/4 / A17	37.45 bc
II3.23/4 / DZA315.16	36.01 bc
O.Mn13 / DZA315.16	32.56 c
B.oun2 / DZA315.16	32.34 c
O.Mn13 / F83005.5	30.06 c
II3.23/4 / F83005.5	28.39 cd
J13 / DZA315.16	25.56 cd
J13 / TN8.3	25.39 cd
B.oun2 / F83005.5	12.45 d

Table 5. Shoot Dry Weight of *M. truncatula* inoculated with Rhizobium isolates from Tunisia. Values were obtained from 2 independent experiments with 3 pots for each combination isolate/line (3 plants per pot) in each experiment. Groups of means were obtained the Student-Newman-Keuls (SNK) test. Isolate/Line combinations with the same letter are in the same group.

Isolate / Line	**Shoot Dry Weight (g/plant)**
B.oun2 / A17	1.41a
B.oun2 / DZA315.16	1.31ab
J13 / A17	1.30ab
II3.23/4 / A17	1.30ab
O.Mn13 / TN8.3	1.28ab
O.Mn13 / A17	1.26ab
J13 / DZA315.16	1.25ab
II3.23/4 / DZA315.16	1.24ab
J13 / F83005.5	1.22ab
II3.23/4 / F83005.5	1.21ab
O.Mn13 / DZA315.16	1.18ab
B.oun2 / F83005.5	1.17ab
O.Mn13 / F83005.5	1.16ab
II3.23/4 / TN8.3	0.99bc
J13 / TN8.3	0.96bc
B.oun2 / TN8.3	0.92bc
Control / DZA315.16	0.79c
Control / F83005.5	0.76c
Control / A17	0.73c
Control / TN8.3	0.42d

Table 6. Root Dry Weight of *M. truncatula* inoculated with Rhizobium isolates from Tunisia. Values were obtained from 2 independent experiments with 3 pots for each isolate (3 plants per pot) in each experiment. Groups of means were obtained with the Student-Newman-Keuls (SNK) test. Isolates with the same letter are in the same group.

Rhizobium isolate	**Root Dry Weight (g/plant)**
Control	0.92 a
O.Mn13	0.72 b
J13	0.68 b
B.oun2	0.67 b
II3.23/4	0.67 b

Table 7. Nitrogen content of aerial parts of *M. truncatula* inoculated with Rhizobium isolates from Tunisia. Values were obtained from 2 independent experiments with 3 pots for each combination isolate/line (3 plants per pot) in each experiment. Groups of means were obtained with the Student-Newman-Keuls (SNK) test. Isolate/Line combinations with the same letter are in the same group.

isolate / line	**Nitrogen content (‰)**
J13 / A17	39.03 a
J13 / DZA315.16	38.08 a
O.Mn13 / F83005.5	37.90 a
B.oun2 / A17	37.53 a
B.oun2 / TN8.3	36.95 a
B.oun2 / DZA315.16	36.68 a
O.Mn13 / A17	36.40 a
J13 / F83005.5	35.44 a
II3.23/4 / F83005.5	34.07 a
II3.23/4 / A17	33.80 a
O.Mn13 / TN8.3	33.44 a
II3.23/4 / DZA315.16	33.27 a
J13 / TN8.3	33.14 a
O.Mn13 / DZA315.16	32.55 a
II3.23/4 / TN8.3	31.97 a
Control / DZA315.16	22.22 b
Control / F83005.5	21.05 b
B.oun2 / F83005.5	17.94 b
Control / TN8.3	17.45 b
Control / A17	16.94 b

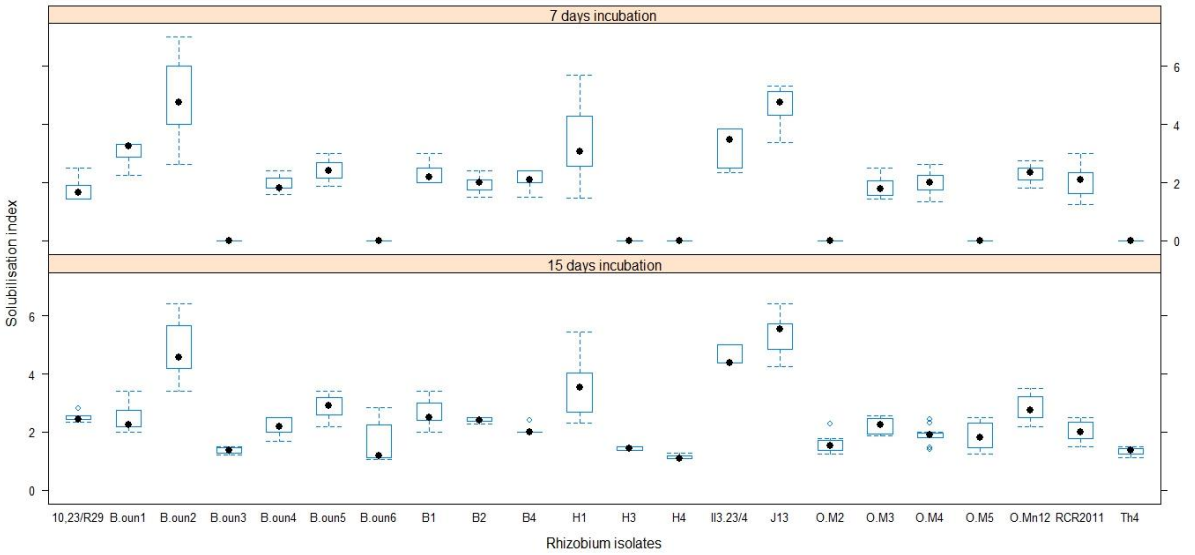
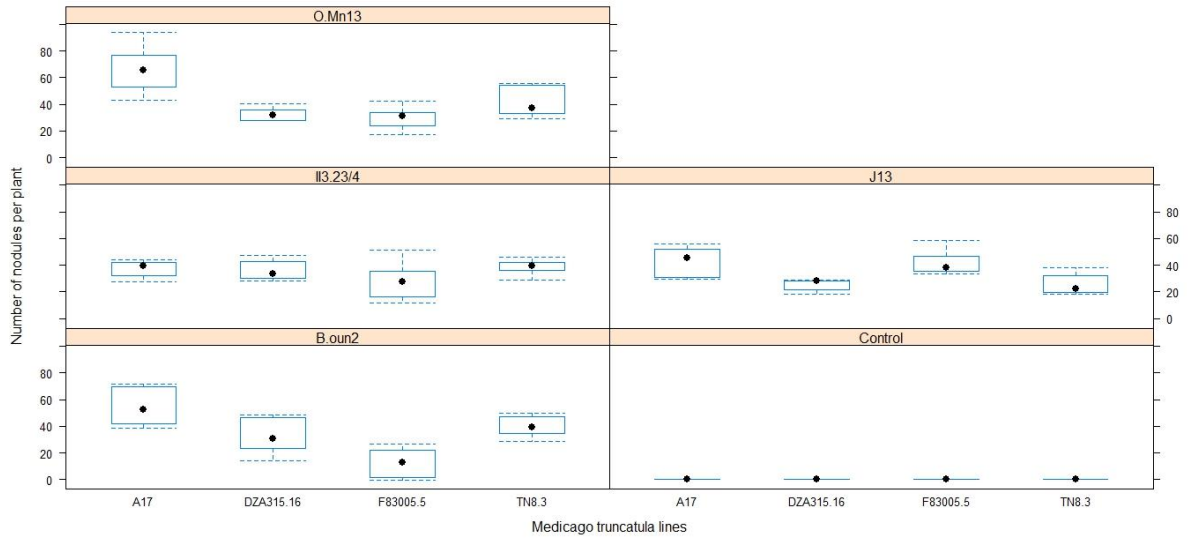


Fig. 1. Phosphate Solubilization *in vitro* by tunisian Rhizobium isolates. The Solubilization Index was determined after 7 and 15 days incubation on medium with $CaHPO_4$ as insoluble phosphate source. Only the 22 isolates that solubilize $CaHPO_4$ are shown. Values are obtained from 3 independent experiments with 4 repeats for each one.

A



B

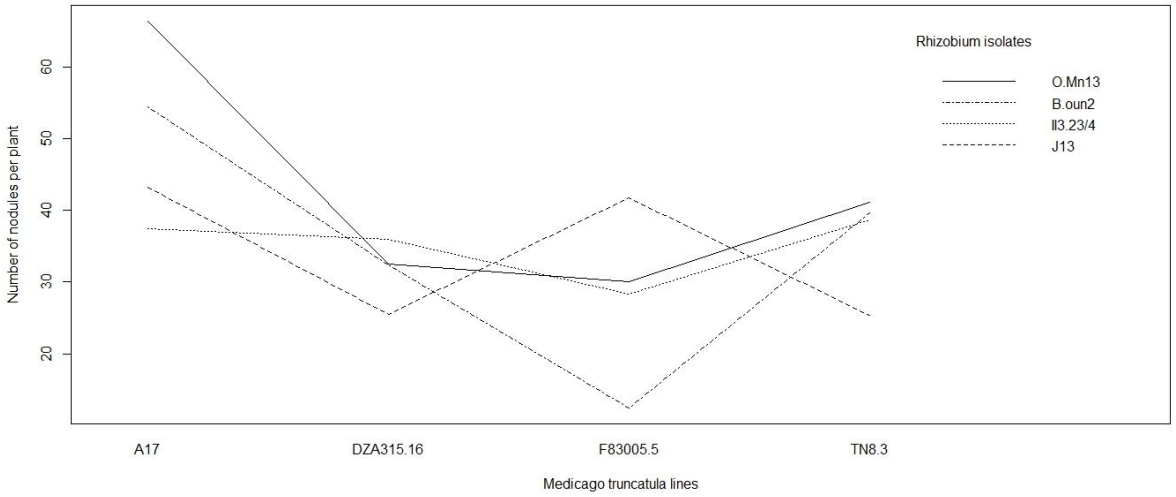


Fig. 2. Nodulation of *Medicago truncatula* accessions (A17; F83005.5; DZA315.16; TN8.3) inoculated with tunisian Rhizobium isolates (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13). Nodules were counted after 8 weeks of culture. Values were obtained from 2 independent experiments with 3 pots for each combination line*isolate (3 plants per pot) in each experiment. **A**: Boxplot showing the variation in nodules number according to lines and inoculated Rhizobium isolate. **B**: Interaction plot showing the interaction between lines and Rhizobium isolates.

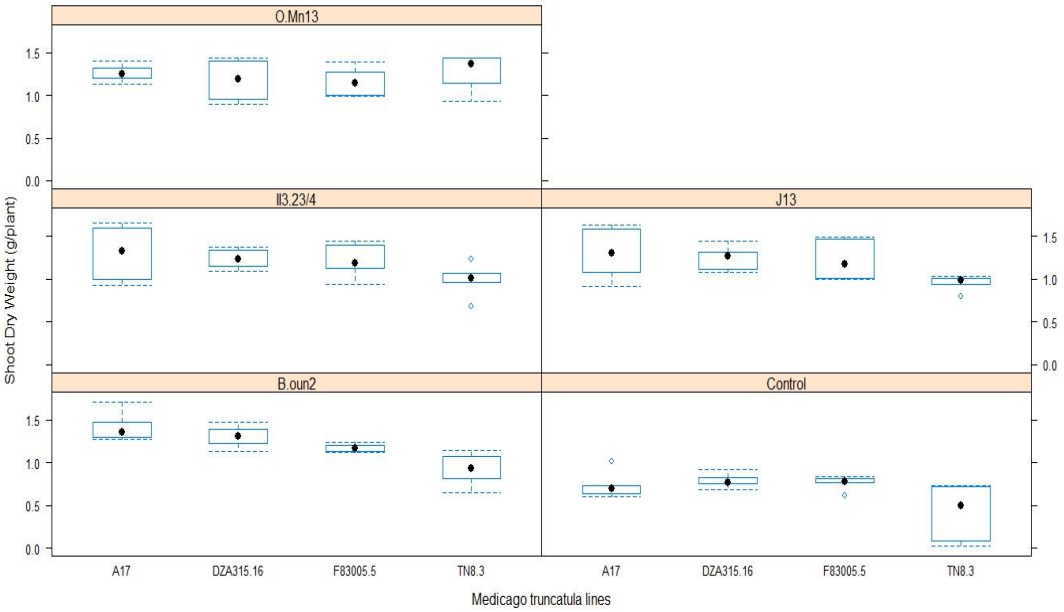


Fig. 3. Shoot dry biomass of *Medicago truncatula* accessions (A17; F83005.5; DZA315.16; TN8.3) inoculated with tunisian Rhizobium isolates (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13). The control consists of uninoculated plants. Values were obtained from 2 independent experiments with 3 pots for each combination line*isolate (3 plants per pot) in each experiment.

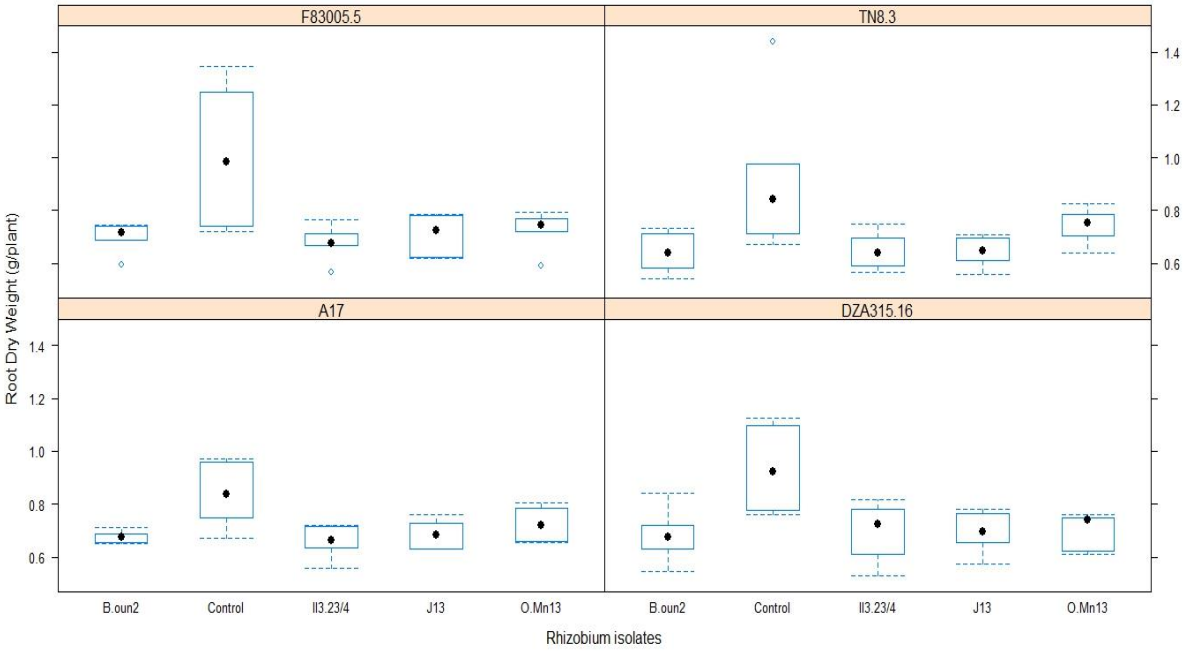


Fig. 4. Root dry biomass of *Medicago truncatula* accessions (A17; F83005.5; DZA315.16; TN8.3) inoculated with tunisian Rhizobium isolates (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13). The control plants were not inoculated. The control consists of uninoculated plants. Values were obtained from 2 independent experiments with 3 pots for each combination line*isolate (3 plants per pot) in each experiment.

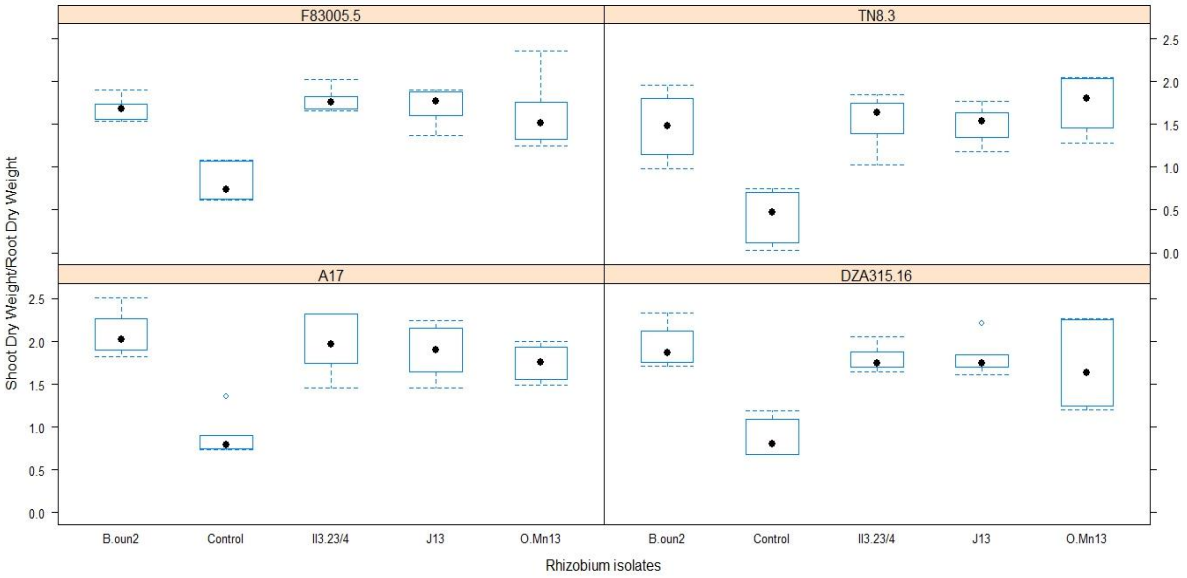


Fig. 5. Ratios of Shoot dry biomass/Root dry biomass of *Medicago truncatula* accessions (A17; F83005.5; DZA315.16; TN8.3) inoculated with tunisian Rhizobium isolates (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13). The control consists of uninoculated plants. Values were obtained from 2 independent experiments with 3 pots for each combination line*isolate (3 plants per pot) in each experiment.

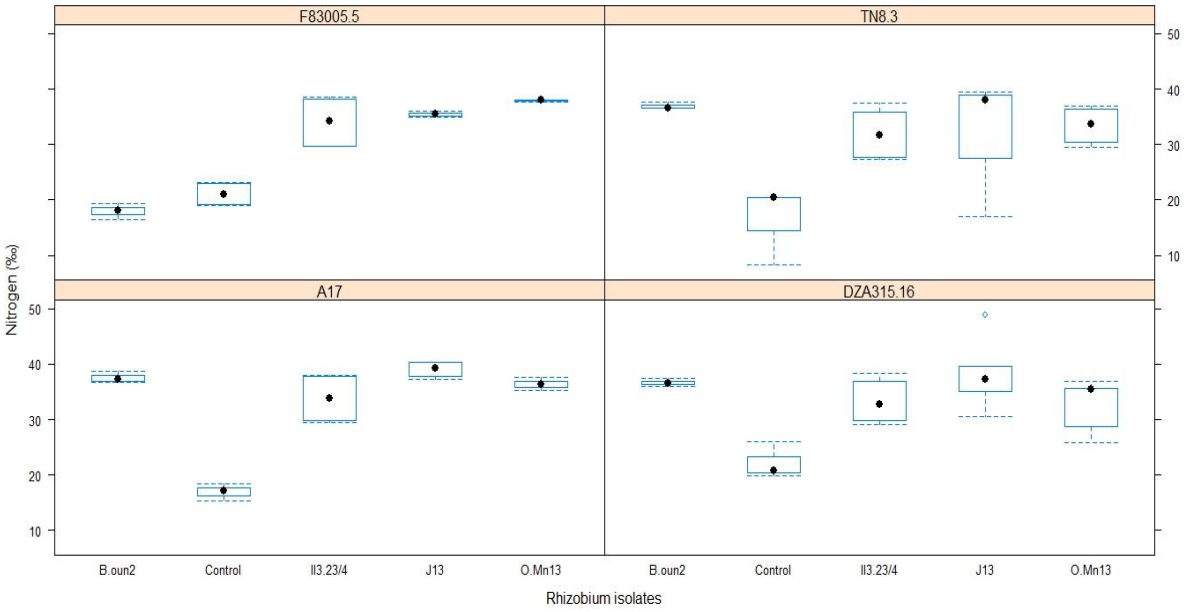


Fig. 6. Nitrogen content (‰) of *Medicago truncatula* accessions (A17; F83005.5; DZA315.16; TN8.3) inoculated with tunisian Rhizobium isolates (B.oun2; II3.23/4; J13; O.Mn13). The control plants were not inoculated. Values are based on dry biomass and were obtained from 3 pooled plants (one pot), with 3 pots for each couple line*isolate and 2 independent experiments.

Supplementary material

Table S1 Analysis of variance of Phosphate solubilization measured by solubilization index *in vitro*.

```
> anovaSI <-aov(Solubilisation.index ~Rhizobium.isolate*dates, data=SIphosphate)
> summary(anovaSI)
                        Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Rhizobium.isolate       21  788.0   37.52  161.84 <2e-16 ***
dates                    1   54.8   54.82  236.44 <2e-16 ***
Rhizobium.isolate:dates 21   53.9    2.56   11.06 <2e-16 ***
Residuals               448 103.9    0.23
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Table S2 Analysis of variance of number of nodules.

```
> anovanod <-aov(Nodules.number ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulationss)
> summary(anovanod)
                            Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                    3   6877  2292.3  20.680 5.15e-10 ***
Rhizobium.isolates           3   1147   382.4   3.450   0.0204 *
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 9   5702   633.6   5.716 4.28e-06 ***
Residuals                   80   8868   110.8
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Table S3 Analysis of variance of shoot dry weight.

```
> anovaSDW <-aov(SDW ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulation)
> summary(anovaSDW)
                             Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                     3  1.391  0.4637  12.627 4.57e-07 ***
Rhizobium.isolates            4  5.245  1.3112  35.704  < 2e-16 ***
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 12  0.747  0.0622   1.694   0.0791 .
Residuals                   100  3.672  0.0367
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Table S4 Analysis of variance of shoot dry weight of inoculated plants.

```
> anovaSDW <-aov(SDW ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulationss)
> summary(anovaSDW)
                            Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                    3 1.0012  0.3337   9.051 3.15e-05 ***
Rhizobium.isolates           3 0.0188  0.0063   0.170   0.9164
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 9 0.6171  0.0686   1.860   0.0702 .
Residuals                   80 2.9499  0.0369
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Table S5 Analysis of variance of root dry weight.

```
> anovaRDW <-aov(RDW ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulation)
> summary(anovaRDW)
                             Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                     3 0.0452 0.01506   1.002    0.395
Rhizobium.isolates            4 1.0999 0.27497  18.288 2.65e-11 ***
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 12 0.0773 0.00644   0.429    0.949
Residuals                   100 1.5035 0.01504
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Table S6 Analysis of variance of root dry weight of inoculated plants only.

```
> anovaRDW <-aov(RDW ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulationss)
> summary(anovaRDW)
                            Df Sum Sq  Mean Sq F value Pr(>F)
Mtr.lines                    3 0.0155 0.005162   1.011 0.3925
Rhizobium.isolates           3 0.0449 0.014977   2.932 0.0385 *
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 9 0.0226 0.002512   0.492 0.8761
Residuals                   80 0.4086 0.005108
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> 
```

Table S7 Analysis of variance of Nitrogen content.

```
> anovanod <-aov(N ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulation)
> summary(anovanod)
                            Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                    3  251.0    83.7   4.343  0.00736 **
Rhizobium.isolates           4 2691.5   672.9  34.927 7.76e-16 ***
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 12  968.4    80.7   4.189 6.59e-05 ***
Residuals                   68 1310.0    19.3
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
32 observations deleted due to missingness
>
```

Table S8 Analysis of variance of Nitrogen content of inoculated plants only.

```
> anovanod <-aov(N ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulationss)
> summary(anovanod)
                             Df Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
Mtr.lines                     3  209.5   69.82   3.499   0.0210 *
Rhizobium.isolates            3  154.9   51.64   2.588   0.0616 .
Mtr.lines:Rhizobium.isolates  9  852.5   94.72   4.747 9.58e-05 ***
Residuals                    58 1157.3   19.95
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
22 observations deleted due to missingness
```

Table S9 Nitrogen content of aerial parts of *M. truncatula* inoculated with Rhizobium isolates from Tunisia. Values were obtained from 2 independent experiments with 3 pots for each combination isolate/line (3 plants per pot) in each experiment. Groups of means were obtained with the Student-Newman-Keuls (SNK) test. Isolate/Line combinations with the same letter are in the same group.

Isolate / Line	**Nitrogen content (‰)**
J13 / A17	39.03 a
J13 / DZA315.16	38.08 a
O.Mn13 / F83005.5	37.90 a
B.oun2 / A17	37.53 a
B.oun2 / TN8.3	36.95 a
B.oun2 / DZA315.16	36.68 a
O.Mn13 / A17	36.40 a
J13 / F83005.5	35.44 a
II3.23/4 / F83005.5	34.07 a
II3.23/4 / A17	33.80 a
O.Mn13 / TN8.3	33.44 a
II3.23/4 / DZA315.16	33.27 a
J13 / TN8.3	33.14 a
O.Mn13 / DZA315.16	32.55 a
II3.23/4 / TN8.3	31.97 a
B.oun2 / F83005.5	17.94 b

Table S10 Analysis of variance of Nitrogen content of inoculated plants except plants from line F83005.5 inoculated with B.oun2.

```
> anovanodsss <-aov(N ~Mtr.lines*Rhizobium.isolates, data=nodulationsss)
> summary(anovanodsss)
                            Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Mtr.lines                    3   99.0   33.00   1.602 0.1991
Rhizobium.isolates           3  171.8   57.27   2.780 0.0494 *
Mtr.lines:Rhizobium.isolates 8  106.4   13.30   0.646 0.7361
Residuals                   56 1153.5   20.60
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
19 observations deleted due to missingness
>
```

Table S11 Analysis of variance of Nitrogen content of control plants.

```
> anovanods <-aov(N ~Mtr.lines, data=nodulations)
> summary(anovanods)
            Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Mtr.lines    3  68.12   22.71   1.487  0.277
Residuals   10 152.72   15.27
10 observations deleted due to missingness
>
```

Table S12 Ratios of inoculated plants/control plants for shoot dry weight (SDW), root dry weight (RDW), and Nitrogen content (N) of *M. truncatula* inoculated with Rhizobium isolates from Tunisia. Values were obtained from 2 independent experiments with 3 pots for each combination isolate/line (3 plants per pot) in each experiment.

***Rhizobium* isolate**	**ratio SDW**	**ratio RDW**	**ratio N**
***M. truncatula* line A17**			
B.oun2	1.93	0.81	2.22
II3.23/4	1.78	0.79	2
J13	1.79	0.82	2.3
O.Mn13	1.72	0.86	2.15
***M. truncatula* line DZA315.16**			
B.oun2	1.66	0.73	1.65
II3.23/4	1.57	0.75	1.5
J13	1.59	0.74	1.71
O.Mn13	1.49	0.75	1.47
***M. truncatula* line F83005.5**			
B.oun2	1.53	0.7	0.85
II3.23/4	1.59	0.67	1.62
J13	1.6	0.71	1.68
O.Mn13	1.51	0.72	1.8
***M. truncatula* line TN8.3**			
B.oun2	2.18	0.7	2.12
II3.23/4	2.34	0.71	1.83
J13	2.26	0.71	1.9
O.Mn13	3.03	0.81	1.92

Fig. S1 Difference in growth and leaf colour between inoculated and inoculated plants. The pictures show trays containing 4 different genotypes each and were taken 2 months after *Rhizobium* inoculation.

