



HAL
open science

Interaction des légumineuses avec des microorganismes du sol sous contraintes abiotiques

Souad Insaf Djouider

► **To cite this version:**

Souad Insaf Djouider. Interaction des légumineuses avec des microorganismes du sol sous contraintes abiotiques. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT; Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, 2023. Français. NNT : 2023INPT0046 . tel-04776925

HAL Id: tel-04776925

<https://theses.hal.science/tel-04776925v1>

Submitted on 12 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

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 SOUAD INSAF DJOUIDER

le mardi 27 juin 2023

Titre :

Interaction des légumineuses avec des microorganismes du sol sous
contraintes abiotiques

Ecole doctorale :

Sciences de l'Univers de l'Environnement et de l'Espace (SDU2E)

Unité de recherche :

Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement (LEFE)

Directeurs de Thèse :

M. LAURENT GENTZBITTEL

M. MOHAMED LAZALI

Rapporteurs :

M. NACEUR DJEBALI, CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE BORJ CEDRIA

Membres du jury :

M. JEAN-JACQUES DREVON, INRAE MONTPELLIER, Président

M. ABDERREZZAK KIROUANI, UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA, Membre

M. BRAHIM BOUSALHIH, UNIV DJILALI BOUNAAMA DE KHEMIS MILIANA, Invité

M. LAURENT GENTZBITTEL, TOULOUSE INP, Membre

MME CECILE BEN, TOULOUSE INP, Membre

MME MARTINA RICKAUER, TOULOUSE INP, Invitée

M. MOHAMED LAZALI, UNIV DJILALI BOUNAAMA DE KHEMIS MILIANA, Membre

REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit d'une collaboration scientifique entre le laboratoire Eau Roche Plante (ERP) à Université Djilali Bounaama, Khemis Miliana et le laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement, UMR5245 CNRS/UPS/INPT (LEFE) (Toulouse) dans le cadre du projet PHC-TASSILI intitulé « Services écologiques des légumineuses dans les agroécosystèmes du bassin méditerranéen ». C'est avec un grand plaisir que je réserve ces lignes en signe de gratitude et de reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

J'exprime tout d'abord ma reconnaissance et mes vifs remerciements à mes directeurs de thèse, Lazali Mohamed, professeur à Université Djilali Bounaama, à Laurent Gentzbittel professeur à Skoltech, Russie d'avoir accepté de m'encadrer et de parrainer sans réserve ce travail.

J'exprime aussi mes remerciements à Madame Cécile Ben Maître de conférences à l'INP-ENSAT, Toulouse, d'avoir accepté de me co-diriger, pour son accueil, sa disponibilité, son intérêt pour ce travail et pour ses nombreux conseils avisés. Quoique je dise, les mots ne sauraient exprimer ma profonde gratitude. J'exprime mon grand respect et mes remerciements à M. DJEBALI Naceur, Professeur au « Laboratoire des Substances Bioactives » Tunis, M. DREVON Jean Jacques directeur de recherche à l'INRA de Montpellier et M. KIROUANI Abderrazzak Maître de conférences à l'Université de Médéa d'avoir accepté évaluer ce travail.

Mes remerciements s'adressent également aux directions des stations techniques des grandes cultures et à la subdivision agricole de la région de Boumadfaa d'avoir facilité les prospections de collecte de semences ainsi que la désignation des sites d'essais.

Un grand merci également aux membres de LEFE pour leur sympathie et leur aide. Je remercie madame RICKAUER Martina, qui était là pour des discussions fructueuses et pour son soutien moral. Je remercie mes collègues et amis thésards : Loubna, Yanis, Fares, Manel, Amir, Souhir, Elana... pour leur sympathie. Je n'oublie pas tous les autres car la liste ne s'aurait être exhaustive.

Cette thèse a nécessité tout au long de sa durée de réalisation l'aide et le soutien de plusieurs personnes, tous mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué du près ou du loin à la réussite de ce travail.

Enfin, je souhaite remercier les familles DJOUIDER et KHEIDRI pour leur soutien constant. Cette thèse, est l'aboutissement de longues années d'études, je la dois beaucoup à mes parents pour leur soutien indéfectible, ils ont toujours su me redonner confiance afin de mener à bon port cette thèse. A mon frère Ziane, mes sœurs Meriem et Chayma, je ne saurais vous remercier car vous avez endossé tous les rôles pour me soutenir.

Liste des Publications

Article paru dans une revue à comité de lecture

Djouider, S.I.; Gentzbittel, L.; Jana, R.; Rickauer, M.; Ben, C.; Lazali, M. Contribution to Improving the Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Efficiency in Low-Phosphorus Farming Systems: Assessment of the Relationships between the P and N Nutrition, Nodulation Capacity and Productivity Performance in P-Deficient Field Conditions. *Agronomy* **2022**, *12*, 3150. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123150>

Résumé

L'intégration des légumineuses dans les agrosystèmes est primordiale du fait de leur rôle central pour l'alimentation humaine et animale et pour la santé des sols grâce à la fixation d'azote (N) atmosphérique *via* la symbiose racinaire avec les rhizobia du sol. Cependant, les légumineuses sont exposées à un large éventail de stress abiotiques et biotiques, affectant leur croissance et leur rendement. Cet impact négatif sur la performance des plantes risque de s'aggraver avec le réchauffement climatique qui va favoriser l'exposition à des stress combinés. Les stress abiotiques peuvent i) altérer la symbiose rhizobia-légumineuses, ii) modifier la réponse des plantes aux maladies et la virulence des pathogènes. Face à ces contraintes environnementales, les plantes ont développé des réponses variées de défense et d'adaptation en modifiant leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques, biochimiques jusqu'au niveau moléculaire. Pourtant, la compréhension des mécanismes de tolérance à des stress combinés ainsi que de l'interaction rhizobia-légumineuses sous contrainte abiotique reste limitée. Dans ce contexte, cette thèse vise à étudier

- (i) les voies d'adaptation à la déficience en phosphore (P) et les relations avec la symbiose nodulaire chez le pois chiche (*Cicer arietinum*), troisième légumineuse économiquement la plus importante ;
- (ii) les mécanismes de tolérance à des stress combinés, abiotique (la salinité) et biotique (la verticilliose, causée par le champignon du sol *Verticillium alfalfae*), chez une légumineuse sauvage, *Medicago truncatula*.

Le premier volet de ce travail a porté sur l'impact de la déficience en P sur la croissance, le rendement, la germination et la symbiose rhizobienne de sept cultivars de pois chiche durant deux campagnes agricoles. Des mécanismes d'adaptation pour maintenir l'efficacité des processus physiologiques tels que la fixation symbiotique de N et la germination ont été révélés. Une grande variation génotypique a été observée pour les composantes du rendement, l'acquisition de P et de N, et l'efficacité d'utilisation du P (PUE), avec un découplage génétique entre efficacité d'acquisition et d'utilisation du P. Enfin, cette étude, qui souligne le rôle des nodules dans l'absorption de P dans les sols déficients en ce macroélément, a permis d'identifier un ensemble de cultivars de pois chiche adaptés aux conditions de déficience en P ; FLIP90_13C, GHAB4 et GHAB5, présentant un métabolisme efficace de N et P et une productivité supérieure.

Le second volet de ce travail a porté sur l'étude du contrôle génétique de la résistance au pathogène racinaire *V. alfalfae* au sein d'une population tunisienne de *M. truncatula* soumise ou non à un stress salin. L'analyse des paramètres de maladie a montré une interaction significative entre le génotype de la plante et le traitement au sel et a révélé des accessions potentiellement intéressantes avec une tolérance accrue aux stress combinés. Si le stress salin augmente majoritairement les symptômes des lignées les plus sensibles, l'activation précoce des défenses contre le stress salin pourrait aider certaines accessions à surmonter la maladie. L'analyse de génétique d'association a révélé différents contrôles génétiques de la réponse à la verticilliose en réponse à l'inoculation avec le pathogène seule ou combinée au stress salin. Plusieurs *loci*

sur les chromosomes 1, 3, 4, 5, 7 et 8 ont été détectés, sans chevauchement en conditions salines et non salines. Quatorze gènes candidats impliqués dans la résistance aux maladies, la tolérance aux stress abiotiques, le transport membranaire et le développement ont été identifiés dans le cas de stress combinés. Enfin, nos résultats soulignent l'importance d'explorer le germoplasme original et sous-utilisé pour découvrir de nouvelles sources génétiques d'adaptation aux stress utiles aux programmes de sélection pour améliorer la tolérance à la déficience en P ou à des stress combinés.

Mots clés: Légumineuses ; fixation symbiotique d'azote ; efficacité de l'utilisation du phosphore ; nutrition des plantes ; systèmes agricoles à faible niveau d'intrants ; amélioration des plantes ; adaptation aux stress biotiques et abiotiques combinés ; génétique d'association ; verticilliose ; salinité ; gène candidat.

Abstract

The integration of legumes into agrosystems is essential due to their central role in human and animal nutrition and soil health through the fixation of atmospheric nitrogen (N) via root symbiosis with soil rhizobia. However, legumes are exposed to a wide range of abiotic and biotic stresses, affecting their growth and yield. This negative impact on plant performance is likely to worsen with climate change, which will favor exposure to combined stresses. Abiotic stresses can i) alter the rhizobia-legume symbiosis, ii) modify the plant's response to diseases and the virulence of pathogens. In response to these environmental constraints, plants have developed various defense and adaptation responses by modifying their morphological, physiological, biochemical characteristics up to the molecular level. However, the understanding of tolerance mechanisms to combined stresses and the rhizobia-legume interaction under abiotic constraint remains limited. In this context, this thesis aims to study

- (i) the adaptation pathways to phosphorus (P) deficiency and the relationships with nodule symbiosis in chickpea (*Cicer arietinum*), the third most economically important legume,
- (ii) the mechanisms of tolerance to combined stresses, abiotic (salinity) and biotic (verticillium wilt, caused by the soil fungus *Verticillium alfalfae*), in a wild legume, *Medicago truncatula*.

The first part of this work focused on the impact of P deficiency on the growth, yield, germination and rhizobial symbiosis of seven chickpea cultivars during two agricultural seasons. Adaptation mechanisms to maintain the efficiency of physiological processes such as symbiotic N fixation and germination have been revealed. A high genotypic variation was observed for yield components, P and N acquisition, and phosphorus use efficiency (PUE), with a genetic decoupling between P acquisition and use efficiency. Finally, this study, which highlights the role of nodules in the uptake of P in P-deficient soils, has allowed identifying a set of chickpea cultivars adapted to P deficiency conditions, with an efficient N and P metabolism and higher productivity.

The second part of this work focused on the genetic control of resistance to the root pathogen *V. alfalfae* in a Tunisian population of *M. truncatula* subjected to or not to salt stress. Analysis of disease parameters showed a significant interaction between plant genotype and salt treatment and revealed potentially interesting accessions with increased tolerance to combined stress. If the salt stress mainly increases the symptoms of the most sensitive lines, the early activation of defenses against salt stress could help some accessions to overcome the disease. Association genetics analysis revealed different genetic controls of the response to Verticillium wilt in response to inoculation with the pathogen alone or combined with salt stress. Several *loci* on chromosomes 1, 3, 4, 5, 7 and 8 were detected, with no overlap between saline and non-saline conditions. Fourteen candidate genes involved in disease resistance, abiotic stress tolerance, membrane transport and development were identified in the case of combined stresses.

Finally, our results emphasize the importance of exploring the original and underutilized germplasm to discover new genetic sources of adaptation to stress useful for selection programs to improve tolerance to P deficiency or combined stresses.

Keywords: Legumes; Symbiotic Nitrogen Fixation; Phosphorus Use Efficiency; Plant Nutrition; Low Input Agricultural Systems; Crop Improvement; Combined Biotic and Abiotic Stress Adaptation, Association Genetics; Verticillium Wilt; Salinity; Candidate Gene.

TABLE DES MATIERES

Introduction générale et problématique	1
Objectifs de la thèse	4
Synthèse bibliographique	5
1. Importance des légumineuses	5
1.1 Intérêts agronomiques et écologiques des légumineuses	5
1.1.1. Les légumineuses comme engrais vert	5
1.1.1.a. La symbiose fixatrice d'azote avec des rhizobia : une spécificité des légumineuses.....	5
1.1.1.b. Processus de nodulation	6
1.1.2 Amélioration de la santé et de la teneur en carbone du sol et contribution indirecte à la diminution des gaz à effets de serre.....	8
1.1.3. Intérêt agronomique des légumineuses dans les rotations de culture	9
1.2. Importance nutritionnelle des légumineuses	10
1.4. Importance du pois chiche <i>Cicer arietinum</i>	10
1.5. Importance de la luzerne tronquée <i>Medicago truncatula</i>	13
2. Développement des légumineuses face aux contraintes environnementales.....	16
2.1. Effet de deux contraintes abiotiques majeures, la déficience en phosphore et la salinité, et stratégies d'adaptation des légumineuses.	17
2.1.1. Déficience des sols en phosphore	17
2.1.1.a. Rôle du phosphore dans les plantes.....	17
2.1.1.b. Causes de la déficience des sols en phosphore.....	18
2.1.1.c. Stratégies d'adaptation et mécanismes de tolérance des légumineuses à la déficience en phosphore..	18
a. Mécanismes permettant d'augmenter l'acquisition du P.....	19
b. Mécanismes permettant d'améliorer l'efficacité d'utilisation du P	21
2.1.2. Salinité des sols	24
2.1.2.a. Effet de la salinité sur les plantes et focus sur les légumineuses.....	24
2.1.2.b. Stratégies d'adaptation et mécanismes de tolérance des plantes à la salinité des sols.....	26
2.1.2.c. Stratégies d'adaptation et mécanismes de tolérance des Medics à la salinité des sols	29
2.2. Comment les légumineuses sont-elles limitées par les stress biotiques ? Cas de la verticilliose chez les Medics.	29
2.2.1. <i>Verticillium alfalfae</i>, agent causal de la verticilliose, l'une des maladies les plus dévastatrices chez la luzerne.....	30
2.2.1.1. Taxonomie de <i>Verticillium alfalfae</i>	30
2.2.2.2. Interaction <i>Medicago truncatula-Verticillium alfalfae</i>	31
• Cycle de vie et dispersion	31
• Mécanismes infectieux et symptômes	31
2.2.3. Mécanismes de tolérance des <i>Medicago spp.</i> à la verticilliose	33
2.2.4. Réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques combinés.....	37

Chapitre 1 : Interaction des microorganismes du sol rhizobium avec le pois chiche sous déficience des sols en phosphore	42
I. Introduction	42
2. Matériel et méthodes.....	44
2.1. Description de la région d'étude et des sites expérimentaux.....	44
2.2. Mise en place des essais : Matériel végétal et plan expérimentale.....	46
2.3. Echantillonnage et collecte de données	48
2.3.1. Diagnostique nodulaire : Évaluation des performances de croissance et de de nodulation	48
2.3.2. Quantification de la teneur en azote et en phosphore dans les nodules, les pousses et la rhizosphère	48
2.3.3. Récole et paramètres de rendements.....	49
2.3.4. Test de germination des graines <i>in vitro</i>	50
2.4. Analyses statistiques	50
3. Résultats.....	52
3.1. Le stress dû à la déficience en P affecte différemment certains traits fonctionnels de croissance et de nodulation chez les cultivars de pois chiche.....	52
3.2. La culture dans des sols à faible disponibilité en P modifie différemment les composantes du rendement en grains au sein de sept cultivars de pois chiches.....	56
3. 3. Les variations génotypiques de l'efficacité de l'utilisation de la symbiose rhizobienne et de l'acquisition de l'azote.....	61
3. 4. L'acquisition du phosphore et l'efficacité de son utilisation pour la formation des nodules.	65
3. 5. L'analyse fonctionnelle intégrative des traits de croissance et de productivité ainsi que de l'efficacité de la nutrition physiologique de l'azote et du phosphore dans des conditions de faible disponibilité en phosphore	69
4. Discussion	73
5. Conclusion	77
Chapitre 2 : Etude de génétique d'association de la réponse à la verticilliose sous stress salin ou non au sein de la population tunisienne Soliman de <i>Medicago truncatula</i>	78
1. Matériel et méthodes.....	78
1.1. Matériel végétal.....	78
1.2. Espèce Pathogène.....	79
1.3. Plans expérimentaux mis en œuvre pour le phénotypage en réponse aux stress combinés et modèles d'analyse statistique associés - Plan en blocs augmentés.....	79
1.4. Analyse phénotypique.....	80
1.4.1. Traitement en sel et inoculation.....	80
1.4.2. Réisolement de <i>V. alfalfae</i> à partir de fragment de tiges de <i>M. truncatula</i>	81
1.4.3. Evaluation de la réponse au stress salin seul au sein des 12 accessions « checks »	82
1.5. Analyse statistique des données phénotypiques	82

1.5.1. Calcul de paramètres de maladie et de réponse au stress salin	82
1.5.2. Analyses de variance sur les paramètres de maladie et de réponse au stress salin	83
1.5.3. Analyse statistique du taux de réisolement du champignon	83
1.5.4. Analyses de génétique d'association par GWAS.....	83
1.5.5. Analyse bio-informatique pour l'identification de gènes candidats et leur annotation fonctionnelle	87
2. Résultats.....	88
2.1. Analyse préliminaire de l'effet du sel sur la réponse à <i>V. alfalfae</i> Va V31.2 au sein d'un panel de diversité de 12 accessions « checks » de <i>M. truncatula</i>	88
2.1.1. Analyse préliminaire de la réponse des accessions au stress 'sel' seul	88
2.1.2. Analyse de l'effet du sel sur l'évolution des symptômes de maladie	90
2.1.3. Le sel affecte-t-il la colonisation des plantes par le champignon ? - Analyse du taux de réisolement de <i>V. alfalfae</i> Va V31.2.....	92
2.1.4. Conclusion.	93
2.2. Analyse de la biodiversité de la réponse à <i>V. alfalfae</i> Va V31.2 au sein de la population Soliman de <i>M. truncatula</i> soumise ou non au stress salin.....	93
2.3. Evolution des symptômes de flétrissement foliaire chez la population Soliman soumise ou non au stress salin	94
2.3.1. Evolution des symptômes de flétrissement foliaire sous stress salin	94
2.3.2. Etude comparative de la réponse des accessions de la population Soliman de <i>M. truncatula</i> à <i>V. alfalfae</i> Va V31.2 dans des conditions salines et non salines.	98
2.3.3. Analyse de GWAS pour la résistance à la verticilliose au sein de la population tunisienne Soliman de <i>M. truncatula</i> soumise ou non à un stress salin et identification de gènes candidats	101
3. DISCUSSION.....	112
3. 1. L'effet du stress salin sur la réponse des plantes au pathogène dépend du génotype des accessions et de leur mécanisme de résistance.....	112
3.2. Un contrôle génétique différent de la réponse à la verticilliose en conditions saline et non-saline révélée par GWAS	114
3.2.1. Une architecture génétique de la réponse à la verticilliose très dissemblable en conditions saline et non-saline.....	114
3.2.2. Gènes candidats en réponse au stress 'Verticilliose' seul.....	115
3.2.3. Gènes candidats en réponse aux deux stress combinés.....	117
3.3. Modulation moléculaire de la réponse des plantes à des stress biotique et abiotique combinés.....	119
4. Conclusion	120
Conclusion générale.....	121
Perspectives	122
Liste des références.....	124
Annexes.....	152
Tableaux supplémentaires.....	152
Figures supplémentaires.....	153

Liste des figures

Figure 1 : Modèle résumé du mécanisme de formation des nodules dans la symbiose rhizobium-légumineuse.....	7
Figure 2 : Graines de pois chiches de type Kaboul (à gauche) et de type Dési (à droite).....	12
Figure 3 : Caractéristiques morphologiques des feuilles, fleurs, gousses et graines de <i>Medicago truncatula</i>	14
Figure 4: Mécanismes de maintien de l'homéostasie du Pi en cas de carence en Pi chez les légumineuses.....	20
Figure 5 : Des bactéries symbiotiques associées au soja pour améliorer l'efficacité du phosphore.....	23
Figure 6 : Un aperçu de la réponse de la croissance des plantes en deux phases en réponse au stress salin.....	25
Figure 7 : Les espèces réactives de l'oxygène, de l'azote et du soufre améliore la tolérance au stress des plantes exposées ultérieurement à un stress abiotique et atténue les effets du stress.....	28
Figure 8 : Caractéristiques morphologiques de <i>Verticillium alfalfae</i> (souche PD682).....	31
Figure9: Cycle de la maladie dans un hôte générique et biologie de <i>Verticillium alfalfae</i>	32
Figure 10 : Symptômes de la maladie de la verticilliose causée par <i>V.spp</i> sur les luzernes.....	32
Figure 11 : Interaction entre les réponses au stress abiotique et biotique : une vue actuelle des points de convergence dans les réseaux de signalisation du stress.....	40
Figure 12 : Description géographique et pédoclimatique des sites expérimentaux en plein champs. Localisation des sites expérimentaux pour les deux campagnes agricoles (2018 et 2019) à Boumadfaa, Algérie.....	45
Figure 13 : Dispositif expérimentale (A) mis en place sur terrain pour les deux campagnes agricoles 2018 et 2019 et vue générale de l'essai.....	47
Figure 14 : Illustration de l'estimation de l'Efficacité d'Utilisation de la Symbiose Rhizobienne.....	49
Figure 15 : Stade maturité de grain campagne 2018.....	49
Figure 16 : Test de germination in vitro (A) les graines germées à la fin de l'expérimentation.....	50
Figure 17 : Évaluation de la croissance végétale et des performances de nodulation de sept cultivars de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité en P pendant deux campagnes agricoles.....	55
Figure 18 : Évaluation des composantes du rendement de sept cultivars de pois chiches cultivés dans des conditions de champ à faible disponibilité en P pendant deux saisons de culture.....	59
Figure 19 : Nodules fonctionnels comme le témoigne la couleur rouge des nodules due à la présence caractéristique de la leghémoglobine.....	61
Figure 20 : Évaluation de l'acquisition de l'azote par sept cultivars de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité en P pendant deux saisons de culture.....	63

Figure 21 : Évaluation de l'acquisition du phosphore de sept cultivars de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité en P pendant deux saisons de croissance.....	66
Figure 22. Analyse de regroupement hiérarchique de 15 paramètres fonctionnels des plantes de sept génotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de terrain sous une faible disponibilité de P dans le sol durant deux saisons de croissance de 2018 à 2019.....	71
Figure 23 : Répartition géographique des accessions de <i>Medicago truncatula</i> de la population Soliman.....	78
Figure 24 : Représentation schématique d'un plan en bloc augmenté pour le phénotypage en réponse aux stress combinés.....	80
Figure 25 : Echelle de suivi des symptômes de maladie.....	81
Figure 26 : Boxplots des paramètres AUSPC (A) et MSS (B) en réponse au sel des 12 accessions évalués en trois répétitions biologiques indépendantes.....	89
Figure 27: Boîtes à moustache représentant les moyennes ajustées de l'effet 'répétition' de l'AUDPC (A) et du MSS (B) des 12 accessions après inoculation par <i>V. alfalfae</i> V31.2 et soumises ou non au stress salin [+Verticillium/+Sel ; +Verticillium/-Sel].....	91
Figure 28: Interaction plots pour les paramètres de maladie AUDPC (A) et MSS (B) des 12 accessions après inoculation par <i>V. alfalfae</i> V31.2 et soumises ou non au stress salin [+Verticillium/+Sel ; +Verticillium/-Sel].....	92
Figure 29 : Développement des symptômes de flétrissement chez la population Soliman de <i>Medicago truncatula</i> inoculées par <i>Verticillium alfalfae</i> V31.2 sous stress salin [+Verticillium/+Sel ; +Verticillium/-Sel]. +Verticillium/-Sel].....	96
Figure 30: Boîtes à moustache représentant l'AUDPC (A) et le MSS (B) moyen ajusté par répétition des 94 accessions de <i>Medicago truncatula</i> quatre semaines après inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31.2 sous stress salin [+Verticillium/+Sel ; +Verticillium/-Sel].....	98
Figure 31 : AUDPC (A) et MSS (B) moyens ajustés de l'effet 'répétition' des 94 accessions de <i>M. truncatula</i> (incluant les 90 accessions Soliman et les 4 lignées de référence) après inoculation par <i>V. alfalfae</i> Va V31.2 et soumises ou non au stress salin.....	101
Figure 32 : Q-Q plots des analyses GWAS réalisées sur l'AUDPC (I) et MSS (II) en stress combinés ([+Verticillium/+Sel]), et en stress de Verticillium seul ([+Verticillium/-Sel]) avec les modèles GLM (A), MLM (B), CMLM (C) et FarmCPU (D).....	103
Figure 33(A) : Manhattan plots obtenus pour les phénotypes AUDPC et MSS en stress [+Verticillium/+Sel] combinés (A) et Va V31.2 seul (B) selon le modèle FarmCPU avec un niveau de MAF (0.1).....	105
Figure 33(B) : Diagramme de Venn présentant le nombre de SNP significatifs à un seuil arbitraire de 4 pour les phénotypes AUDPC et MSS pour les deux conditions de stress [+Verticillium/-Sel] et [+Verticillium/+Sel].....	106

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Noms et généalogies des sept géotypes de pois chiches étudiés.....	47
Tableau 2 : Propriétés granulométriques et chimiques du sol des deux campagnes agricoles.....	52
Tableau 3 : Analyse de variance des paramètres de croissance des plantes, et de la nodulation de sept géotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité de phosphore durant deux campagnes agricoles.....	54
Tableau 4 : Analyse de variance pour les composantes du rendement en grains de sept géotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité en phosphore.....	57
Tableau 5 : Analyse de variance pour (a) le rendement en grains et (b) le poids de 100 graines de sept géotypes de pois chiches cultivés sous une faible disponibilité en P.....	58
Tableau 6: Évaluation de la faculté germinative des graines récoltées au cours des deux campagnes agricoles successives pour les sept cultivars de pois chiche étudiés.....	60
Tableau 7 : Efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EURS) de sept géotypes de pois chiches cultivés sous une faible disponibilité en P pendant deux campagnes agricoles (2018 et 2019).....	62
Tableau 8: Analyse de variance pour l'acquisition de l'azote par sept géotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité de phosphore.....	64
Tableau 9 : Analyse de variance pour l'acquisition du phosphore de sept géotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité de phosphore.....	68
Tableau 10 : (a) Analyse de variance et (b) comparaison multiple des moyennes pour l'efficacité d'utilisation du P de sept géotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité de P.....	68
Tableau 11: Tables d'ANOVA pour les phénotypes MSS et AUSPC pour les 12 accessions « checks » de <i>M. truncatula</i> en réponse au stress salin.....	89
Tableau 12: Tables d'ANOVA pour les phénotypes MSS et AUDPC pour les 12 accessions « checks » de <i>M. truncatula</i> inoculées par <i>V. alfalfae</i> Va V31.2 soumises ou non à un stress salin.....	90
Tableau 13: Tables d'ANOVA pour le taux de ré-isollement de Va V31.2 à partir des fragments de tige des accessions soumises ou non au stress salin.....	93
Tableau 14: Tables d'ANOVA des phénotypes MSS et AUDPC en réponse à Va V31.2 des 90 accessions de la région de Soliman de <i>M. truncatula</i> sous stress salin.....	97
Tableau 15: ANOVA de l'effet du géotype, du traitement salin et de leur interaction sur les paramètres de maladie MSS et AUDPC.....	99
Tableau 16 : Gènes candidats identifiés suite aux analyses de GWAS réalisées au sein de la population Soliman de <i>M. truncatula</i> , inoculée avec Va V31.2 seul (A) ou en combinaison avec un stress salin (B).....	107

Liste des abréviations

ABA : Acide abscissique

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ANOVA : Analyse de la variance

AUDPC : Aire sous la courbe de progression de maladie (Area under disease progression curve)

ET : Ethylène

EUSR : Efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne

GWAS : Etude de génétique d'association (Genome-Wide Association Study)

ICRISAT : Institut international de recherche sur les cultures des zones tropicales semi-arides

ICARDA : Centre international de recherche agricole dans les zones arides

JA: Acide jasmonique

MAF: Minimum Allele Frequency

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MSS : Score maximal des symptômes (Maximum Symptom Score)

N: Azote

NBS-LRR: Nucleotide-Binding site and Leucine Rich Repeats

P : Phosphore

Pi : Phosphate inorganique

PUE : Efficacité d'utilisation du phosphore (Phosphorus use efficiency)

qRT-PCR : quantitative reverse transcription Polymerase Chain Reaction

QTL : Loci de caractères quantitatifs (Quantitative Trait Loci)

ROS: Reactive Oxygen Species (radicaux libres)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SNF : Fixation symbiotique de l'azote (Symbiotic nitrogen fixation)

Introduction générale et problématique

En tant qu'organismes sessiles, les plantes ont évolué pour vivre, sans pouvoir s'échapper, dans un environnement naturel où elles sont souvent exposées à des conditions fluctuantes et difficiles et sujettes à des stress abiotiques et biotiques variés constituant une menace sérieuse pour leur productivité et leur survie (Kissoudis et al. 2016). Les effets de ces facteurs de stress sont classés en trois groupes : (1) effet de stress unique (un seul facteur de stress) ; (2) effets de stress individuels multiples (deux ou plusieurs stress se produisant à des périodes différentes sans aucun chevauchement) ; et (3) effets de stress combinés (deux ou plusieurs stress se produisant avec chevauchement). Avec la pression du réchauffement de la planète et les anomalies climatiques qui y sont liées, le risque d'occurrence de stress biotiques et abiotiques combinés augmente, cela affectant par conséquent la production de biomasse et la fitness végétale (Teshome et al. 2020; Tripathi et al. 2022).

Pour survivre dans des conditions environnementales défavorables, les plantes ont développé des stratégies permettant un équilibre entre croissance, reproduction et survie (Dreher and Callis, 2007 ; Dreher and Callis 2007) et ont élaboré toute une gamme de réponses de défense et d'adaptation à différents niveaux, en modifiant leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques, biochimiques jusqu'au niveau moléculaire (Jacques et al. 2021 ; Wang et al. 2021). Cependant, les réponses des plantes aux stress combinés abiotiques et biotiques sont très complexes et sont différentes de leurs réponses aux stress individuels (Ramegowda et Senthil-Kumar, 2015). En effet, l'effet des facteurs de stress combinés, par exemple biotiques et abiotiques, n'est pas toujours additif et le résultat est généralement dicté par la nature des interactions entre les facteurs de stress pouvant impliquer deux organismes vivants, la plante et le pathogène, sous la dimension supplémentaire de l'exposition au stress abiotique (Rasmussen et al. 2013 ; Ramu et al. 2016 ; Bai et al. 2018). De nos jours, la compréhension des mécanismes appropriés de réponse des plantes aux stress abiotiques et biotiques combinés n'est encore que parcellaire.

La sécurité alimentaire, le maintien de la productivité des cultures malgré des conditions environnementales toujours plus stressantes et selon des pratiques culturales plus respectueuses de l'environnement, la préservation de la santé des sols, l'atténuation ou l'élimination des menaces liées au changement climatique sont parmi les principaux défis des années à venir pour l'agriculture mondiale. Dans cette perspective où la durabilité du système de production agricole devient un élément central pour atteindre ces objectifs stratégiques, les cultures de légumineuses pourraient jouer un rôle important en assurant de nombreux services en accord avec les principes de durabilité (Rahman et al. 2020). En effet, les légumineuses jouent un rôle essentiel tant pour l'alimentation humaine qu'animale (Mousavi-Derazmahalleh et al. 2019), mais aussi dans l'amélioration de la santé des sols par le biais de la fixation d'azote atmosphérique (N₂) à travers la symbiose racinaire avec les rhizobia du sol (Rahman et al. 2020). Cependant, l'augmentation des stress

abiotiques, comme la chaleur, la sécheresse et la salinité, et la pression élevée des maladies et des insectes nuisibles dans le cadre du changement climatique diminuent le rendement et la qualité des variétés de légumineuses existantes (Agnihotri and Rana, 2021). Au-delà de leurs effets quantitatifs et qualitatifs directs sur la production des plantes, ces contraintes, notamment abiotiques, peuvent également altérer la symbiose rhizobia-légumineuses, en limitant la formation des nodules et donc les mécanismes de la fixation azotée biologique. Trois contraintes majeures limitant la croissance et la productivité des légumineuses sont étudiées dans cette thèse : la déficience en phosphore (P), macroélément nutritif essentiel des végétaux, et la réponse à une maladie racinaire, la verticilliose, combinée ou non au stress salin.

Du fait de la forte immobilité du phosphate inorganique (Pi) dans le sol, le phosphore est le macronutriment le moins accessible pour les plantes (Hinsinger, 2001). De ce fait, cette faible biodisponibilité du P est souvent une contrainte majeure pour la production agricole dans le monde entier, en particulier dans de nombreux systèmes agricoles à faibles intrants (Simpson et al. 2015). Chez les légumineuses, le phosphore joue un rôle essentiel dans la fixation symbiotique de l'azote, processus coûteux en énergie qui nécessite 16 molécules d'ATP pour une molécule d'azote. Ainsi, la formation des nodules, ainsi que l'acquisition et le métabolisme de l'azote, sont inhibés dans le cas de carence en P (Valentine et al. 2017 ; Prodhan et al. 2019). Toutefois, fournir suffisamment de P pour répondre aux besoins de l'agriculture tout en préservant l'environnement est un grand défi car, d'une part, les réserves mondiales en P se raréfient et, d'autre part, la production et l'utilisation d'engrais phosphatés sont à la fois très gourmandes en ressources énergétiques fossiles et génératrices de gaz à effet de serre. L'amélioration de l'efficacité de l'acquisition et de l'utilisation du P par les cultures est considérée comme une solution prometteuse à ce problème (Pang et al. 2018). Telles sont les voies d'adaptation à la contrainte de déficience en P que nous avons étudiées dans le cadre de cette thèse au sein d'un ensemble de sept cultivars de pois chiche, troisième légumineuse à graines cultivée économiquement la plus importante dans le monde après le soja et le haricot.

La salinité des sols représente une contrainte majeure qui affecte la fertilité des sols et limite le rendement des cultures dans diverses régions du monde (Daliakopoulos et al. 2016), en particulier dans les zones arides et semi-arides où la forte évaporation et les faibles précipitations rendent l'irrigation par l'eau souterraine nécessaire pour répondre aux besoins en eau des plantes (Wang et al. 2019). Le sel présent dans les eaux souterraines s'accumule en surface et les effets osmotiques et la toxicité des ions spécifiques liés au stress salin entraînent une limitation significative de la productivité des légumineuses en entraînant des déséquilibres nutritionnels, en diminuant l'absorption de l'eau par la plante, mais également en affectant le processus de nodulation symbiotique (Mathew et al. 2020).

Par ailleurs, dans la nature, le stress salin peut être associé à d'autres contraintes, notamment d'ordre biotique. Parmi celles-ci, les maladies racinaires causées par des agents pathogènes du sol sont connues comme un facteur critique pour la santé des plantes et la productivité globale de l'agriculture (De Corato, 2020). Dans les régions tempérées, le champignon tellurique *Verticillium alfalfae*, responsable de la maladie

de flétrissement vasculaire, est considéré comme le pathogène majeur de la luzerne (*Medicago sativa* L.). Celui-ci peut entraîner des pertes de production allant jusqu'à 50% et son impact dépend fortement des conditions environnementales (Vandemark et al. 2006). La lutte contre la maladie de flétrissement causée par *Verticillium spp.* est difficile en raison de la longue persistance des structures de repos dans le sol, de leur large gamme d'hôtes ainsi que l'absence de méthodes de contrôle sûres et rentables. Ceci justifie le développement de nouvelles techniques de gestion de la maladie, parmi lesquelles la création de variétés génétiquement résistantes apparaît comme la plus prometteuse.

A ce jour, la compréhension des mécanismes de tolérance des légumineuses vis-à-vis des pathogènes racinaires ainsi que de l'interaction rhizobia-légumineuses sous contrainte abiotique reste limitée. Les travaux menés dans le cadre de cette thèse abordent cette question essentielle afin de comprendre la manière dont les plantes et leurs interactions avec les microorganismes bénéfiques et pathogènes du sol s'adaptent à des environnements contraints et possiblement fluctuants. Cette thèse s'articule autour de deux volets principaux visant à étudier les réponses possibles aux stress combinés, à savoir :

- (i) les voies d'adaptation à la déficience en phosphore (P) et les relations avec la symbiose nodulaire chez une légumineuse cultivée, le pois chiche (*Cicer arietinum*);
- (ii) les mécanismes de tolérance à des stress combinés, abiotique (la salinité) et biotique (la verticilliose), chez une légumineuse sauvage, *Medicago truncatula*, légumineuse modèle bien établie et proche de la luzerne, pour laquelle plusieurs études approfondies sur la biologie moléculaire, physiologique et biologie fondamentale ont été entreprises pour se traduire par des améliorations de caractères dans les cultures de légumineuses d'intérêt économique.

Nous proposons de mener une approche holistique de la réponse et des mécanismes adaptatifs de la plante, en considérant les différents facteurs de son environnement biotique et abiotique ainsi que leurs interactions. Notre étude ouvre ainsi la voie vers la conception rationnelle de programmes d'amélioration végétale visant à développer des variétés performantes et résistantes au stress dans des contextes agricoles durables tels que des systèmes agricoles à bas intrants, ou permettant la valorisation des sols marginaux dans des pratiques agricoles respectueuses de l'environnement.

Objectifs de la thèse

L'objectif global de cette thèse est l'étude de l'effet des contraintes abiotiques tel que la déficience en phosphore (P) ou la salinité des sols sur l'interaction des légumineuses cultivées (ici, le pois chiche), ou sauvages (plus particulièrement *M. truncatula*) avec les microorganismes du sol, bénéfiques symbiotiques du genre «Rhizobium» ou pathogènes tel que le champignon « *Verticillium alfalfae* ».

Le premier volet de cette thèse a consisté en l'identification de génotypes de pois chiche montrant une bonne efficacité en termes d'acquisition et d'utilisation du P pour la fixation symbiotique de l'azote et contribuant donc à un couplage efficace entre les cycles bio-géochimiques de P et N en agriculture. A travers l'évaluation de sept cultivars de pois chiche dans des conditions de terrain de faible disponibilité en P durant deux campagnes agricoles, cette étude a visé à répondre aux questions scientifiques spécifiques suivantes : Existe-t-il des différences entre les génotypes de pois chiche pour la mobilisation et l'utilisation du phosphore et de l'azote ? Ces différences sont-elles liées à des performances différentes en termes de production de biomasse, de rendement et de fitness ? Ainsi, nos principaux objectifs étaient de contribuer à une meilleure compréhension :

- (i) de la relation quantitative entre l'efficacité d'utilisation du P, les capacités de nodulation, et la productivité et la germination, en tenant compte de l'environnement pédoclimatique ;
- (ii) des voies d'adaptation à la déficience en P et des relations avec la symbiose nodulaire.

Un dernier objectif de ce premier volet était de proposer des pistes pour la conception rationnelle de programmes d'amélioration génétique de variétés de pois chiche performantes en conditions de déficience en P, en ciblant les traits fonctionnels clés identifiés par notre approche intégrative (Chapitre I, publication Djouider et al. 2022).

La deuxième partie de cette thèse a porté sur l'étude de l'effet de deux stress combinés au sein d'une population naturelle de la légumineuse sauvage *M. truncatula* et plus particulièrement, sur l'effet du stress salin sur la réponse à la verticilliose. Les questions auxquelles nous avons voulu répondre sont les suivantes :

- ✓ La salinité affecte-t-elle la colonisation et le développement des symptômes de la maladie du flétrissement au sein d'un panel d'accessions de *M. truncatula* infectées par *V. alfalfae* ?
- ✓ Les régions génomiques qui contrôlent le développement des symptômes de flétrissement diffèrent-elles en conditions salines et non salines ?

L'approche expérimentale et scientifique que nous avons implémentée s'appuie sur 1) le phénotypage des accessions de *M. truncatula* suite à l'inoculation par *V. alfalfae* dans des conditions salines et non salines; 2) l'étude de l'architecture génétique de la réponse au stress biotique seul ou aux deux stress combinés par génétique d'association (GWAS, Genome-Wide Association Studies) (Chapitre II).

Synthèse bibliographique

1. Importance des légumineuses

Produire durablement devient un enjeu central dans l'agriculture (Stagnari et al. 2017). Par conséquent, les pratiques agricoles doivent être développées pour assurer la sécurité alimentaire tout en minimisant l'impact environnemental (Ozyazici and Acikbas, 2021). Les cultures de légumineuses pourraient jouer un rôle important dans ce contexte en fournissant de multiples services conformes aux principes de durabilité (Stagnari et al. 2017). En effet, les légumineuses (famille des Fabaceae ou Leguminosae) établissent des associations symbiotiques racinaires avec les rhizobia et les champignons mycorhiziens arbusculaires, réduisant ainsi l'utilisation des engrais chimiques (Swarnalakshmi et al. 2020). Contrairement aux cultures céréalières qui nécessitent un apport extérieur d'engrais azotés entraînant une énorme quantité d'émissions de gaz à effet de serre, le processus de fixation symbiotique de l'azote (SNF, symbiotic nitrogen fixation) rend les cultures de légumineuses autosuffisantes en azote (N) (Goyal et al. 2021). Les systèmes de production de légumineuses sont donc considérés comme efficaces et importants pour l'agriculture durable et la préservation du climat (Goyal et al. 2021). En effet, une utilisation large des légumineuses dans les systèmes de rotation des cultures permettrait de minimiser les intrants agricoles, d'améliorer la biodiversité, de diversifier le système de culture et de mettre en œuvre un système simple mais efficace qui améliore la fertilité des sols tout en réduisant les coûts de production (Adams et al. 2018 ; Ozyazici and Acikbas, 2021). Ainsi, les légumineuses à graines et fourragères sont une composante importante des systèmes agroalimentaires durables.

1.1 Intérêts agronomiques et écologiques des légumineuses

1.1.1. Les légumineuses comme engrais vert

1.1.1.a. La symbiose fixatrice d'azote avec des rhizobia : une spécificité des légumineuses.

L'azote est le facteur nutritionnel le plus limitant pour la croissance des plantes (Gupta et al. 2012). Il est un composant essentiel de l'urée et des acides aminés (protéines), des acides nucléiques (ADN et ARN), de l'adénosine triphosphate (ATP) et du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) dans toutes les cellules vivantes (Burén and Rubio 2018).

L'atmosphère contient environ 80 % de l'azote à l'état libre, mais la plupart des plantes ne peuvent pas utiliser l'azote atmosphérique. L'utilisation excessive d'engrais azotés (N) pour améliorer la production agricole menace l'environnement. L'utilisation incontrôlée et la mauvaise gestion des engrais synthétiques émettent des nitrates (NO_3^-) qui provoquent la pollution de l'eau, du protoxyde d'azote (N_2O) qui accélère le processus de changement climatique et des oxydes d'azote (NO_x) qui provoquent la pollution de l'air (Meena et al. 2018). Les concentrations de ces formes réactives de l'azote (telles que NO_x , N_2O , NO_3^- , NH_3)

ont augmenté d'environ 120 % dans l'atmosphère, notamment en raison de l'utilisation d'engrais chimiques en agriculture. Ce scénario oblige à repenser le rôle de la fixation biologique de l'azote en explorant des voies alternatives d'apport de nutriments possibles grâce aux processus biologiques de la rhizosphère (Meena et al. 2018 ; Schwember, 2020). Les microbes du sol sont alors utilisés comme une approche pour maintenir le cycle des éléments nutritifs et ainsi la santé du sol (Schwember, 2020). L'engrais vert basé sur l'inclusion de légumineuses semble être l'option la plus réalisable.

Les légumineuses établissent une relation symbiotique avec des bactéries gram-négatives du sol fixatrices d'azote atmosphérique, collectivement connues sous le nom de rhizobia (qui comprend les genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Allorhizobium*) (Meena et al. 2017). L'engrais vert à base de légumineuses présente un intérêt tout particulier car elles sont facilement décomposables. Plusieurs légumineuses utilisées pour l'engrais vert ont montré un taux élevé d'accumulation d'azote, c'est-à-dire 80-100 kg ha⁻¹ pendant les 45-60 jours de croissance de la culture (Meena et al. 2018). La fixation de l'azote peut fournir 300 à 400 kg de N/ha/an et augmenter le rendement des cultures de 10 à 50 %. Chez les plantes, jusqu'à 25 % de l'azote total provient de la fixation symbiotique de l'azote. Par ailleurs, l'engrais vert à base de légumineuses améliore le carbone organique du sol, la disponibilité des nutriments, les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol et la productivité des cultures. Dans les zones marginales l'utilisation d'engrais vert de légumineuses peut avoir un potentiel réaliste pour la production végétale (Meena et al. 2018).

1.1.1.b. Processus de nodulation

L'interaction symbiotique fixatrice d'azote entre rhizobia et légumineuses est une symbiose mutuelle qui profite à la fois aux plantes et aux bactéries. Dans cette relation symbiotique, les rhizobia sont hébergés et alimentés par les légumineuses en sources de carbone réduit (hydrates de carbone) utilisées comme nourriture et énergie et pour stimuler le processus de fixation de N₂ et, en retour, les légumineuses reçoivent du N réduit sous forme d'ammoniac fourni par les rhizobia (White et al. 2007 ; Lindström and Mousavi 2020) (**Figure 1**).

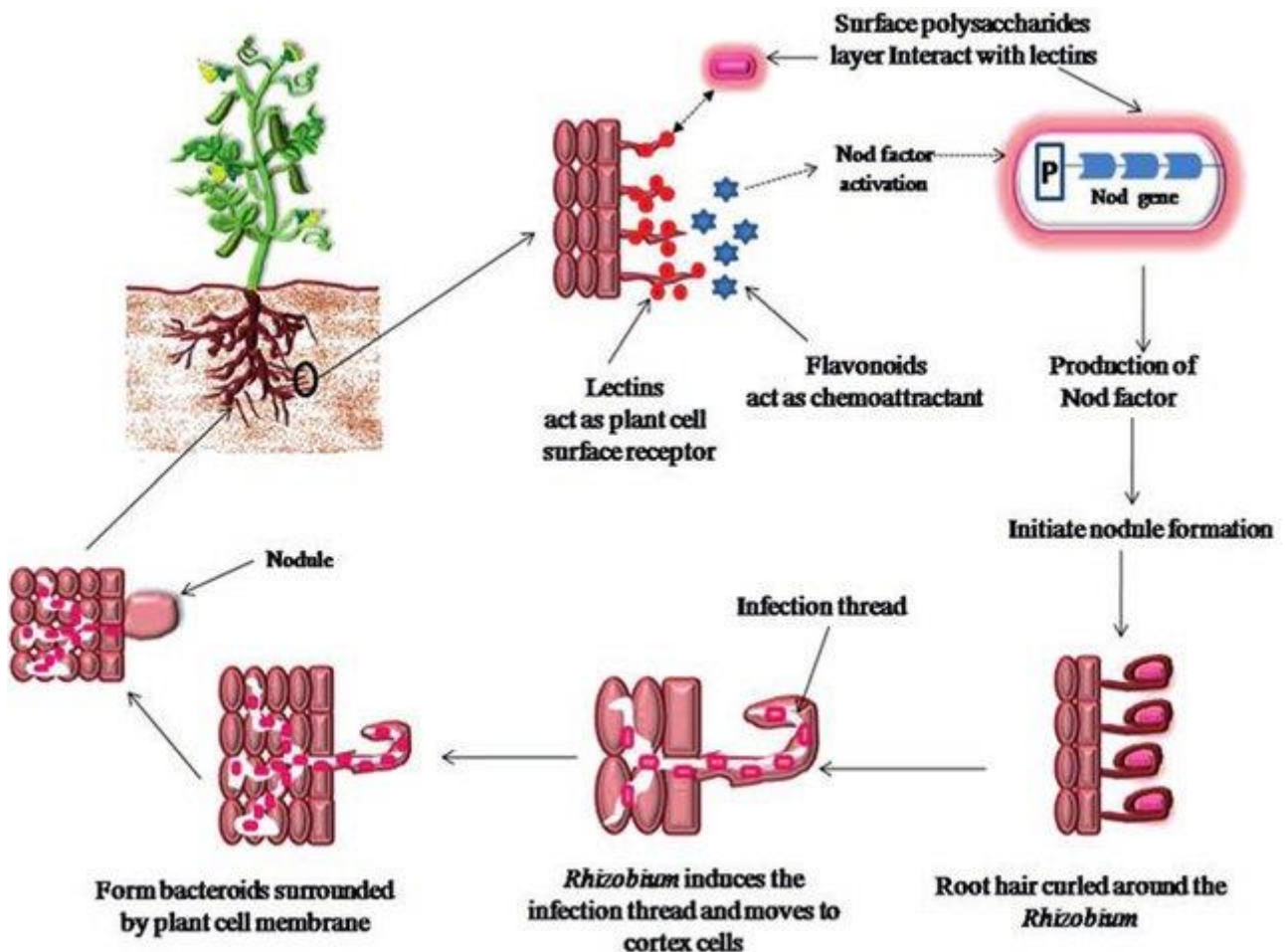


Figure 1 : Modèle résumé du mécanisme de formation des nodules dans la symbiose rhizobium-légumineuse. (Source : Singh et al.2019)

La formation de nodules racinaires efficaces (fixateurs d'azote) nécessite une expression temporelle et spatio-temporelle coordonnée des gènes végétaux et bactériens (Zahran, 1999). Les principales étapes du déroulement de la nodulation sont résumées dans la **Figure 1** :

- **Phase de reconnaissance spécifique** : La nodulation est un processus fortement spécifique ; uniquement certaines souches de rhizobia peuvent induire la formation de nodules chez une espèce donnée de légumineuse (Beattie, 2006). Cette reconnaissance spécifique est établie entre les deux partenaires par émission de signaux moléculaires. La plante excrète par les racines des composés flavonoïdes ; ces derniers sont détectés par la bactérie ce qui se traduit par l'activation des gènes bactériens codant pour les facteurs 'Nod' responsables de la déformation spécifique des poils racinaires, de la formation de nodosités et qui interviennent dans le métabolisme des bactéroïdes (Terefework, 2002).
- **Phase de pré-infection**: Les exsudats racinaires stimulent la multiplication des rhizobia dans la rhizosphère qui adhèrent au poil absorbant de la racine grâce aux glycoprotéines, lectines et des enzymes secrétées par la plante qui dégradent les polysaccharides des bactéries et provoquent par la suite la courbure du poil absorbant en présence d'acide indole acétique (Dazzo, 2004).
- **Phase d'infection**: Cette phase est marquée par la pénétration des rhizobia à l'intérieur du poil

absorbant et la formation d'un cordon d'infection dans lequel les rhizobia se multiplient activement, ce cordon traverse la paroi pectocellulosique des cellules hôtes et se ramifie à l'intérieur du cortex racinaire (Dazzo, 2008). On distingue deux modes d'infection : (i) l'infection intracellulaire caractéristique des légumineuses tempérées où l'entrée des bactéries dans la plante a lieu à travers les poils absorbants après digestion partielle de la paroi de ces derniers et (ii) l'infection intercellulaire présente chez les légumineuses tropicales appelée aussi entrée par fissure dont la pénétration se fait à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme (Svistoonoff, 2003).

- **Phase de formation et de maturation du nodule:** Les cellules du cortex se différencient en méristème durant cette phase l'ADN plasmidique passe de la bactérie à la cellule hôte. L'acidité du méristème induit la croissance et le développement des nodosités. Le cordon d'infection poursuit sa ramification tandis que les rhizobia continuent de se multiplier (Alkama, 2010). Les bactéries sont ensuite libérées, hors du cordon infectieux, dans le cytoplasme de l'hôte où elles se divisent activement, augmentent de taille et se différencient en bactéroïdes séparés du cytoplasme des cellules de l'hôte par une membrane de séquestration (Dupuy et Nougier, 2005). En parallèle, les cellules de l'hôte augmentent de taille et forment le tissu central du nodule renfermant de la lég'hémoglobine (couleur rougeâtre) dans leur cytoplasme ; ainsi, le nodule devient actif et fixe l'azote (Oke and Long, 1999).
- **Phase de sénescence des nodosités:** A la floraison, la croissance végétative atteint son apogée, la lég'hémoglobine se dégrade et devient verdâtre, la nodosité dégénère et la fixation d'azote s'arrête (Svistoonoff, 2003). En se détachant de la plante, les nodules se lysent et déversent leur contenu protéique dans le sol ainsi que les bactéroïdes (Dupuy et Nougier, 2005).

1.1.2 Amélioration de la santé et de la teneur en carbone du sol et contribution indirecte à la diminution des gaz à effets de serre

Le réservoir de carbone organique du sol est l'indicateur clé de la santé et de la qualité du sol qui, à son tour, joue un rôle vital dans la durabilité du sol. L'utilisation continue d'approches agricoles non durables a épuisé la majeure partie du stock de carbone organique du sol des terres agricoles mondiales (Kumar et al. 2018).

Les légumineuses ont le potentiel de réduire le CO₂ grâce à leur capacité de fixation biologique de l'azote (SNF), environ la moitié du CO₂ généré lors de la production de NH₃ sera réutilisé lorsque l'ammoniac est transformé en urée (Jensen et al. 2012). L'incorporation de légumineuses dans la rotation des cultures permettrait donc la restauration des sols, entraînant ainsi une amélioration de la biodiversité des sols (Espinoza et al. 2012). Le potentiel de séquestration du carbone et la quantité de carbone organique restituée au sol par les légumineuses dépendent largement des espèces - notamment de leur croissance, de leur

morphologie et de la physiologie des racines, de la morphologie des feuilles – mais aussi des conditions climatiques, et des pratiques agricoles pendant la période de croissance des cultures (Kumar et al.2018). Par ailleurs, les légumineuses sont à croissance rapide et ont généralement une canopée dense aidant à réduire l'impact des gouttes de pluie sur le sol, minimisant ainsi l'érosion (Praharaj and Maitra 2020). C'est la raison pour laquelle les légumineuses servent de culture de couverture. Elles aident à réduire l'érosion des sols en augmentant l'infiltration et en réduisant le ruissellement.

En plus de leur capacité de séquestration du carbone dans les sols, les légumineuses contribuent à réduire les émissions de gaz à effet de serre (GES), car elles émettent 5 à 7 fois moins de GES par unité de surface par rapport à d'autres cultures et induisent une économie d'apports d'énergie fossile dans le système grâce à la réduction de l'engrais azoté, correspondant à 277 kg ha⁻¹ de CO₂ par an (Stagnari et al. 2017).

1.1.3. Intérêt agronomique des légumineuses dans les rotations de culture

Dans le monde, les légumineuses sont cultivées sur 95,7 millions d'hectares, en tant que cultures pluviales, principalement sur des terres marginales, avec un minimum d'intrants agricoles, dans lesquelles une gamme variée de micro-organismes du sol joue un rôle vital (Ozyazici and Acikbas, 2021). Toutefois, les légumineuses pourraient également être des cultures compétitives par rapport aux céréales. En raison de leur impact environnemental et de leurs avantages socio-économiques, elles pourraient être introduites dans les systèmes de culture modernes pour accroître la diversité des cultures et réduire l'utilisation d'intrants externes (Stagnari et al. 2017).

Caractérisées par des cycles de vie de courte durée, elles s'intègrent bien dans les systèmes de culture, offrant une flexibilité dans la planification d'autres cultures. Étant donné que les systèmes de culture céréales-céréales se sont avérés non durables, les légumineuses peuvent donc être considérées comme une alternative appropriée dans ces systèmes de culture (Praharaj et Maitra 2020).

Améliorant la fertilité et la santé du sol, les légumineuses contribuent à améliorer la productivité des cultures suivantes (Praharaj et Maitra 2020). Cultivées en culture intercalaire, elles peuvent améliorer la productivité ainsi que la fertilité du sol. En plus de cet avantage, ils peuvent agir comme désherbant. Les légumineuses, en raison de leur croissance rapide et de leur canopée dense, peuvent supprimer efficacement les mauvaises herbes (Praharaj et Maitra 2020).

De par leurs multiples fonctions (fixation de l'azote atmosphérique, libération dans le sol des matières organiques de haute qualité et facilitation de la circulation des nutriments du sol et de la rétention d'eau), les cultures de légumineuses ont un fort potentiel pour l'agriculture de conservation où elles sont fonctionnelles soit comme culture sur pied, soit comme résidu de culture (Stagnari et al. 2017). Ainsi, en plus de leurs avantages pour les systèmes de cultures intercalaires, elles trouvent un intérêt dans les systèmes de conservation, qui sont très importants dans les pays en développement, ainsi que dans les systèmes agricoles à faibles intrants.

1.2. Importance nutritionnelle des légumineuses

Les légumineuses à graines et fourragères ont une teneur élevée en protéines (20-25%). Elles constituent une bonne source de glucides, de fibres alimentaires, de micronutriments tels que des vitamines et des minéraux, ou encore de prébiotiques (oligosaccharides et de polysaccharides à courte chaîne) et d'autres nutriments importants (Ozyazici and Acikbas, 2021). Les légumineuses contiennent une quantité appréciable de tous les acides aminés essentiels, à l'exception des acides aminés soufrés (Kamboj and Nanda 2018). Ainsi, la consommation de légumineuses est un élément habituel et bénéfique de l'alimentation humaine qui contribue à la santé. L'Inde représente près d'un quart de la production annuelle mondiale de légumineuses à graines et en est le plus grand consommateur (FAOSTAT, 2022).

Par conséquent, l'inclusion des légumineuses dans les systèmes de production peut apporter des avantages écologiques et économiques tout en assurant le bien-être social en participant à garantir la sécurité alimentaire et nutritionnelle grâce à leur richesse en nutriments (Praharaj et Maitra 2020).

1.3. Importance économique des légumineuses

L'intérêt économique des légumineuses est étroitement associé à l'SNF, ce qui permet de réduire l'apport d'intrants azotés pour la culture suivante, voire d'augmenter le rendement de celle-ci. Les rotations intégrant des légumineuses ont généralement des coûts d'opportunité nuls, voir positifs, avec des marges brutes similaires, voire meilleures, que les rotations qui n'en intègrent pas. D'autre part les légumineuses ne détériorent donc pas la compétitivité des exploitations agricoles à moyen terme et ont, en plus, des effets bénéfiques sur l'environnement qui sont plus difficilement quantifiables d'un point de vue économique (biodiversité, qualité de l'eau) (Jouan, 2020).

De plus, les légumineuses peuvent également être appréhendé à une échelle supérieure à la rotation. En effet, dans les systèmes de polyculture-élevage, les légumineuses peuvent ne pas être vendues et servir à nourrir les animaux de l'exploitation. Elles remplacent alors d'autres types d'aliments du bétail et le coût du renoncement à ces aliments peut être pris en compte (Jezierny et al. 2010)

1.4. Importance du pois chiche *Cicer arietinum*

Le pois chiche cultivé (*Cicer arietinum* L.) est une espèce de légumineuse annuelle diploïde ($2n=16$) autoféconde (Singh et al. 2018). D'après des études archéobotaniques, il s'agit de l'une des premières légumineuses alimentaires à avoir été domestiquée par l'homme à travers les civilisations et l'une des plus anciennes plantes cultivées (Zine-Zikara, 2015 ; Chandora et al. 2020). Elle occupe actuellement la deuxième place mondiale parmi les légumineuses alimentaires après l'haricot (Chandora et al. 2020) et

représente une proportion substantielle de l'apport en azote alimentaire humain jouant ainsi un rôle crucial dans la sécurité alimentaire dans les pays en développement (Varshney et al.2012).

1.4.1. Valeur nutritionnelle du pois chiche et effets bénéfiques sur la santé

Le pois chiche est une culture appréciée qui fournit des aliments nutritifs à une population mondiale en expansion et qui deviendra de plus en plus importante avec le changement climatique (Yegrem 2021). Dans l'ensemble, de par la quantité abondante de protéines, de glucides, de lipides, de fibres et de minéraux (Yegrem 2021), le pois chiche présente un large éventail d'avantages potentiels en matière de nutrition et de santé (Jukanti et al. 2012), comme cela a récemment été fréquemment soulignée par les nutritionnistes dans de nombreux pays du monde (Merga and Haji 2019). L'amidon est le principal glucide de stockage, suivi des fibres alimentaires, des oligosaccharides et des sucres simples comme le glucose et le saccharose. Bien que les lipides soient présents en faibles quantités, le pois chiche est riche en acides gras insaturés importants sur le plan nutritionnel, comme les acides linoléique et oléique. Le β -sitostérol, le campestérol et le stigmastérol sont des stérols importants présents dans l'huile de pois chiche. Calcium (Ca), magnésium (Mg), phosphore (P) et surtout potassium (K) sont également présents dans les graines de pois chiche. Le pois chiche est une bonne source de vitamines importantes comme la riboflavine, la niacine, la thiamine, le folate et le β -carotène, précurseur de la vitamine A (Jukanti et al. 2012). Comme les autres légumineuses, les graines de pois chiches contiennent également des facteurs antinutritionnels qui peuvent être réduits ou éliminés par différentes techniques de cuisson. Le dal est une des principales utilisations du pois chiche en Asie du Sud, tandis que le houmous est très populaire dans de nombreuses régions du monde.

Ainsi, le pois chiche présente plusieurs avantages potentiels pour la santé et, en combinaison avec d'autres légumineuses et céréales, il pourrait avoir des effets bénéfiques sur certaines des principales maladies humaines telles que les maladies cardio-vasculaires, le diabète de type 2, les maladies digestives et certains cancers.

1.4.2. Importance économique

La production mondiale de pois chiche s'élève à plus de 11,5 millions de tonnes par an, dont la majeure est concentrée en Inde (Namvar et Sharifi, 2011 ; Zikara et al. 2015). Les surfaces consacrées au pois chiche ont augmenté ces dernières années et sont estimées à 14,56 millions d'hectares. La production par unité de surface a également augmenté lentement mais régulièrement depuis 1961 d'environ 6 kg/ha par an. Plus de 2,3 millions de tonnes de pois chiches entrent chaque année sur les marchés mondiaux pour compléter les besoins des pays incapables de répondre à la demande par leur production nationale (Merga and Haji 2019). L'Australie, le Canada et l'Argentine sont les principaux exportateurs. Le pois chiche comprend les types Desi et Kabuli. Le type Desi se caractérise par des graines angulaires relativement petites, de couleurs variées et parfois tachetées. Le type Kabuli se caractérise par des graines de plus grande taille, plus lisses et

généralement de couleur claire (Taj et al. 2020) (**Figure 2**).



Figure 2 : Graines de pois chiches de type Kabul (à gauche) et de type Dési (à droite). (Source : Margheim et al.2003)

Le type Desi couvre environ 80 à 85 % de la production mondiale de pois chiches, est cultivé en grande partie dans les pays d'Asie et d'Afrique dont l'Inde et le Pakistan sont les principaux producteurs (Sharma et al. 2020). D'autre part le type Kabuli est principalement cultivés dans le bassin méditerranéen, au Proche-Orient et en Asie de l'Est (Toker et al.2021).

1.4.3. Caractéristiques agronomiques

Le pois chiche est traditionnellement une culture à faible niveau d'intrants et il est cultivé de manière extensive dans les environnements de stress hydrique. En raison de la carence en nutriments minéraux, la productivité du pois chiche est faible. Les besoins en azote du pois chiche sont satisfaits par la fixation biologique de l'azote atmosphérique : il peut fixer 60 à 80% de ses besoins en azote (Giller, 2001), soit 60 à 176 kg N ha⁻¹ (Beck et al.1991 ; Shiferaw et al.2004). Il est sélectif dans ses besoins symbiotiques, ne nodulant qu'avec un groupe spécifique d'espèces de Rhizobium « Mesorhizobium » (Tena et al.2016). L'absence de souches compatibles et la faible population rhizobienne dans le sol sont des limitations importantes pour la formation de nodules chez le pois chiche (Kantar et al.2010).

Cette culture a réussi à conquérir plusieurs régions du monde dont la partie septentrionale de l'Afrique. Ainsi l'Afrique du nord constitue un centre de diversité important pour cette espèce (Zine-Zikara, 2015). En Algérie où les légumineuses alimentaires occupent une place importante dans les systèmes de cultures et dans l'alimentation de la population, le pois chiche est un ingrédient quasi incontournable de la gastronomie locale. La production reste assez faible et les importations sont en pleine croissance. Les efforts d'intensification n'ont souvent pas permis d'atteindre les résultats escomptés :

Les conditions écologiques, la non-maîtrise et le non-respect des techniques culturelles spécifiques aux variétés introduites, ne permettent pas à ces variétés de répondre aux attentes des agriculteurs (Abdelguerfi-Laouar, 2001).

Par ailleurs, ces introductions ont entraîné le délaissement et la perte de ressources génétiques adaptées (Abdelguerfi-Laouar, 2001). Durant la période coloniale, plusieurs travaux d'inventaire et de caractérisation ont été entrepris sur les cultivars locaux et introduits. Actuellement, aucune collection n'a pu être préservée et les cultivars, populations ou variétés de pois chiche ne sont, malheureusement, plus connus (Abdelguerfi-Laouar, 2001). Parallèlement, les diverses pressions anthropiques et environnementales enregistrées dans notre pays ces dernières années diminuent la diversité génétique de cette espèce (Zine-Zikara, 2015). Les travaux de recherche ont été essentiellement orientés sur la fève et la féverole bien que les importations soient très élevées au niveau des autres légumineuses alimentaires telles que le pois chiche (Abdelguerfi-Laouar, 2001).

Plus généralement, au niveau mondial, les efforts de recherche de l'ICRISAT, de l'ICARDA et des programmes nationaux ont lentement mais sûrement augmenté le potentiel de rendement du germoplasme du pois chiche (Merga and Haji 2019). Le pool génétique du pois chiche cultivé présente une riche diversité génétique, conservée par plus de 97 400 accesions *ex situ* dans des banques de gènes du monde entier. Cette diversité génétique sert de matériel de base aux programmes d'amélioration du pois chiche dans le monde. Le succès de tout programme d'amélioration des cultures dépend du niveau de diversité génétique et de la disponibilité de caractères utiles dans le pool génétique de la culture (Chandora et al.2020).

1.5. Importance de la luzerne tronquée *Medicago truncatula*

La luzerne (*Medicago sativa* L.), connue comme étant "la reine des fourrages", est une légumineuse fourragère très populaire à travers le monde. Elle est très appréciée pour sa haute teneur en protéines, ses fibres digestibles et sa richesse en vitamines et en minéraux. Cette culture pérenne fourragère est donc un excellent aliment pour le bétail et donc la consommation humaine (Shi et al.2017).

Medicago truncatula communément appelée la luzerne tronquée en raison de la forme de ses gousses (**Figure 3**), appartenant au genre *Medicago*, est l'espèce la plus commune et abondante dans le bassin méditerranéen et en Australie. Il s'agit d'une plante sauvage, mais aussi cultivée comme une légumineuse fourragère annuelle dans les pays méditerranéens, en Afrique du Nord et en Europe du Sud, ainsi qu'en Australie, en Afrique du Sud et en Amérique du Nord (Ates et al.2014; Küster, 2013). Elle est étroitement apparentée à la luzerne (*M. sativa*) (Küster, 2013).

Caractérisée par une période de végétation courte avec un temps de génération court de 3 à 6 mois, centrée sur la fin de l'hiver et le début du printemps, *M. truncatula* est une espèce annuelle autogame particulièrement adaptée aux conditions climatiques méditerranéennes chaudes. La germination a lieu à la fin de l'automne, la croissance se déroule principalement en hiver et au début du printemps, avec la floraison,

la maturation, la production de gousses et la sénescence à la fin du printemps. Les plantes sont complètement mortes en été. La dureté de la semence est très importante (jusqu'à 80-90%) pour éviter une germination rapide en cas de période pluvieuse en été ou au début de l'automne. Les gousses permettent un auto-ensemencement annuel, avec une très grande quantité de graines produites (300-3000 kg de gousses/ha) (Küster, 2013).

C'est une plante semi-prostratique à tiges ascendantes ou couchée de 15 à 50 cm de haut. Ses parties végétatives sont variablement couvertes de poils. Les feuilles trifoliolées sont alternées, avec des dentelures aiguës sur la moitié supérieure. Comme pour les autres plantes du genre *Medicago*, la foliole centrale a un pétiole plus long que celui des deux autres folioles. Les fleurs sont de couleur crème à jaune et forment des grappes de 6 à 12. Les gousses matures sont en forme de tonneau, épineuses avec 2 à 8 spires, jaune clair à gris foncé. Les graines sont réniformes, jaune clair à brunâtre, portées par une spirale cylindrique (Young et al.2011; Küster, 2013).



Figure 3 : Caractéristiques morphologiques des feuilles, fleurs, gousses et graines de *Medicago truncatula*. <https://www.feedipedia.org/node/274>

En raison de son petit génome (~ 450 Mbp) diploïde ($2n= 16$) séquencé et annoté, de sa grande auto-fertilité, de son haut niveau de diversité naturelle, de son court temps de génération et de sa bonne efficacité de transformation, *M. truncatula* a été établie comme l'une des deux espèces modèles pour les légumineuses (avec *Lotus japonicus*) (Küster, 2013), ce qui a permis d'élargir considérablement la boîte à outils génomique de la luzerne (Young et al.2011).

M. truncatula est une plante modèle non seulement pour les études de caractérisation de la qualité du fourrage tels que la digestibilité, la valeur nutritionnelle, l'appétence et l'ensilage (Küster, 2013) mais aussi un modèle pour l'étude des mécanismes moléculaires et génétiques associés aux interactions entre plantes et microbes, telles que les rhizobias, les mycorhizes et les pathogènes (Shi et al.2017). Des études visant à caractériser les processus d'infection et les mécanismes de résistance de *M. truncatula* à des agents pathogènes redoutables ou des stress abiotiques ont été entreprises, avec pour objectif principal d'identifier des moyens de lutte contre ces contraintes et d'adapter ces solutions à d'autres espèces de légumineuses phylogénétiquement proches susceptibles d'être infectées. Grâce à un certain nombre d'outils et de ressources mis en place chez *M. truncatula* pour les approches omiques, génétiques et de génétique inverse (basée sur l'observation des mutants), des quantités massives de données et de séquences génomiques ont été générées (Carrère et al.2020).

Un atlas de gènes largement utilisé (MtGEA ; <https://mtgea.noble.org/v3/>) rassemble des analyses transcriptomiques réalisées avec des puces Affymetrix dans un large éventail de conditions biologiques (Benedito et al.2008). Une autre base de données, Symbimics (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>), présente les données RNAseq obtenues à ce jour sur des racines et des nodules symbiotiques, notamment des échantillons microdisséqués au laser (Jardinaud et al.2016). Plus anciennement, d'autres outils de transcriptomique ont également été utilisés tels que des macro et microarrays basés sur des cDNA (ex. Mt6k-RIT, *M. truncatula* 6k root interaction transcriptome) (Küster et al.2004). Par ailleurs, un serveur de prédiction du réseau de régulation des gènes pour les études fonctionnelles et comparatives, LegumeGRN, est également disponible (Wang et al.2013).

Plusieurs versions de la séquence génomique de *M. truncatula* et les annotations de gènes correspondantes ont été publiées, à savoir Mt3.5 (Young et al.2011), JCVI Mt4.0 (Tang et al.2014), et Mt5.0 (Pecrix et al.2018). Plusieurs bases de données répertorient les ressources génomiques disponibles pour *M. truncatula* sont accessibles publiquement, tels que : la base de données du génome de *M. truncatula* (Mt3.5 et Mt4.0 ; <https://www.medicagogenome.org/>; Krishnakumar et al.2015), le système d'information des légumineuses (<https://legumeinfo.org/>; Dash et al.2016), le portail du génome de *M. truncatula* A17 r5.0 (<https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/> ; Pecrix et al.2018), un portail permettant d'explorer la diversité naturelle de *M. truncatula* (projet hapmap ; <http://www.medicagohapmap2.org/> ; Kang et al.2015), un genome browser rassemblant des données de polymorphisme de séquence, de QTL de réponse aux pathogènes racinaires et d'analyses transcriptomiques (navigateur du génome, (<http://genolab.inp-toulouse.fr:3838/MtrBioDiv/>), ou encore les bases de données décrivant les collections de mutants (<https://medicago-mutant.dasnr.okstate.edu/mutant/index.php>; <https://www.ibbr.cnr.it/ibbr/resources/medicago-truncatula-mutant-collections>).

M. truncatula a fait l'objet de plusieurs études visant à rechercher des sources de résistance aux stress

abiotiques et biotiques, par génétique d'association grâce à l'analyse de populations biparentales ou de panels de biodiversité (GWAS). Nous pouvons citer par exemple :

- la détection des QTL impliqués dans la résistance quantitative aux maladies causées par de multiples isolats d'*Aphanomyces euteiches* (Djébali et al.2009; Bonhomme et al.2019), par *Colletotrichum trifolii* et *Erysiphe pisi* (Ameline-Torregrosa et al.2008), par *Didymella pinodes* (Madrid et al.2013), par *Phoma medicaginis* (Kamphuis et al.2009), par *Ralstonia solanacearum* (Vailleau et al.2007; Ben et al.2013a), par *Verticillium* spp. (Ben et al.2013b ; Negahi et al.2014 ; Mazurier, 2018 ; Fartash et al.2023) ;

- l'identification des QTL associés à la résistance vis-à-vis de différents pucerons, incluant le puceron du niébé *Aphis craccivora* Koch (Kamphuis et al.2012), le puceron tacheté de la luzerne (*Therioaphis trifolii*) (Kamphuis et al.2013), *Acyrtosiphon pisum* (Stewart et al.2009) et *A. kondoi* (Greco et al.2012 ; Guo et al.2012).

- la détection des QTL contrôlant des traits physiologiques associés à la tolérance au sel (Arraouadi et al.2012 ; Kang et al.2019), à la tolérance au froid (Avia et al.2013; Youssef et al.2016), à la tolérance à la sécheresse (Badri et al.2011; Kang et al.2015; Kadri et al.2017), à la tolérance des graines à la chaleur (Chen et al.2021a) ou à des températures sub- ou supra-optimales (Dias et al.2011) et à la plasticité des protéines des graines en réponse à l'environnement (Cartelier et al.2021), ainsi que des *loci* quantitatifs liés à la nutrition azotée (Morère-Le Paven et al.2011; Moreau et al.2012; Ben Hdech et al.2020) ou encore à la tolérance aux métaux lourds (cadmium et mercure ; Paape et al.2022).

Enfin, d'autres QTL et gènes candidats impliqués dans divers processus biologiques et physiologiques ont également été identifiés (ex. hauteur de la plante, densité de trichomes, période de floraison et nodulation, Stanton-Geddes et al.2013). Nous pouvons également citer la détection de QTL associés à la nodulation (Gorton et al.2012 ; Michno et al.2020 ; Epstein et al.2022), affectant la taille et la composition des graines, y compris les concentrations et le contenu en minéraux (Sankaran et al.2009 ; Vandecasteele et al.2011 ; Le Signor et al.2017 ; Chen et al.2021b), ou encore des QTL associés à la date de floraison (Pierre et al.2008) et à la morphogénèse aérienne (Julier et al.2007; Lagunes Espinoza et al.2012).

A notre connaissance, à l'heure actuelle, aucune étude génétique de la réponse de *M. truncatula* à des stress biotique et abiotique combinés n'est disponible.

2. Développement des légumineuses face aux contraintes environnementales

Les plantes, en tant qu'organismes immobiles, ressentent les facteurs de stress dans leur environnement ce qui affecte leur développement (Ali, 2020). Bien que les légumineuses soient une culture bénéfique au niveau agronomique et environnemental et importante économiquement, elles peuvent être extrêmement sensibles aux stress environnementaux (Scheelbeek et al.2018). Ces stress peuvent être abiotiques - comme la sécheresse, le stress thermique, et la salinité du sol - ou biotiques - c'est-à-dire causés par des ravageurs

ou des pathogènes tels que les champignons, les bactéries ou encore les virus - (Kalpesh, sardhara and Kavita Mehta, 2018).

2.1. Effet de deux contraintes abiotiques majeures, la déficience en phosphore et la salinité, et stratégies d'adaptation des légumineuses.

Toute condition environnementale telle que la sécheresse, la salinité élevée du sol, les inondations, les températures extrêmes, un niveau de lumière réduit ou un excès de rayons UV, les sols acides ou alcalins, les sols pauvres en nutriments, etc. est appelée stress abiotique (Kalpesh, sardhara and Kavita Mehta, 2018). Dans la suite de ce chapitre, je détaillerai les effets sur les végétaux de deux de ces contraintes, la déficience en phosphore (P) et la salinité des sols qui ont fait l'objet d'étude au cours de cette thèse. Je présenterai également les stratégies d'adaptation des plantes vis-à-vis de ces stress, en faisant un état de l'art plus complet des connaissances chez le pois chiche et *M. truncatula*, modèles végétaux de mon étude.

2.1.1. Déficience des sols en phosphore

2.1.1.a. Rôle du phosphore dans les plantes

Les légumineuses, comme la plupart des plantes, tirent principalement leurs nutriments du sol pour survivre. Elles ont alors besoin à la fois de macronutriments tel que l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K), qui constituent leurs "blocs de construction", ainsi que de micronutriments tel que le fer (Fe), le zinc (Zn), le molybdène (Mo), le manganèse (Mn), le bore (B), le cuivre (Cu), et le chlore (Cl), qui sont nécessaires pour leurs activités enzymatiques et métaboliques (Afzal et al.2015).

Les plantes sont de moins en moins en mesure d'accéder aux nutriments présents dans le sol, car ceux-ci sont de plus en plus rarement disponibles ou sous une forme peu utilisable en raison de la pollution et de la surexploitation des sols agricoles et de l'eutrophisation des eaux. Par conséquent, les plantes adoptent plusieurs stratégies afin de les absorber et les utiliser très efficacement (Sulieman and Tran, 2017).

Le phosphore est le deuxième élément clé après l'azote en tant que nutriment minéral en termes de besoins quantitatifs des plantes (Sharma et al. 2013). Il représente environ 0,2 à 0,8 % du poids sec de la plante (Sharma et al. 2013). Il est indispensable à leur croissance, à la photosynthèse, à la production d'énergie, aux réactions redox, au métabolisme des glucides, à la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN) et à la composition des phospholipides (George et al. 2012).

Il est essentiel pour la santé et le développement des plantes, car il renforce le système racinaire, leur procure vitalité et résistance aux maladies. De plus, il contribue à la formation des graines et à la maturation rapide des cultures comme les céréales et les légumineuses (Sharma et al. 2013). Enfin, les légumineuses sont souvent confrontées à des difficultés pour procéder à la fixation symbiotique de l'azote (BNF, Biological Nitrogen Fixation) en raison d'une faible disponibilité en phosphore (P). De ce fait, le statut en P des légumineuses, et plus particulièrement dans les nodules, ainsi que la quantité de P présente dans la

rhizosphère, sont des facteurs essentiels afin de réguler efficacement la BNF (Drevon et al.2015 ; Janati et al.2021).

2.1.1.b. Causes de la déficience des sols en phosphore

Bien que le phosphore soit abondant dans les sols, sous forme organique et inorganique, sa disponibilité est limitée car il se présente principalement sous des formes insolubles (Sharma et al. 2013). Ainsi, la teneur en P d'un sol moyen est d'environ 0,05% (W/W) (Rapport pondéral Pourcentage Concentration) mais seulement 0,1% du P total est disponible pour la plante en raison de sa faible solubilité et de sa fixation dans le sol (Illmer and Schinner, 1995). Seul l'ion orthophosphate (Pi) peut être directement absorbé par les plantes. Sa concentration dans la majorité des sols est estimée entre 0.1 et 10 µM (Hinsinger et al.2003). Sa disponibilité dans la solution du sol est largement déterminée par les caractéristiques et les composants du sol, notamment le pH, la texture, les équilibres d'adsorption/désorption et de précipitation/dissolution des métaux et des anions (Hinsinger, 2001). Cette faible proportion en (Pi) est insuffisante pour les besoins nutritifs en P des plantes et la biodisponibilité en Pi devient alors rapidement un facteur limitant pour la production de biomasse dans les agro-écosystèmes (Drevon et al.2015).

Traditionnellement, l'application d'engrais organiques et inorganiques aux champs est utilisée pour corriger les carences en macro-et micro-éléments et maintenir l'équilibre en nutriments nécessaire à la croissance des plantes (Li et al.2020 ; Tewari et al.2020 ; Li et al. 2020). Afin de satisfaire les besoins nutritionnels des cultures, le P est généralement ajouté au sol sous forme d'engrais de phosphate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) ou de phosphate de potassium (K_2HPO_4). Cependant, la synthèse de ces engrais est un processus à forte intensité énergétique et leur utilisation a des impacts à long terme sur l'environnement en termes d'eutrophisation et d'empreinte carbone. Elle mène également à l'accumulation de sels minéraux qui réduisent le taux d'humidité disponible, empêchant ainsi l'absorption des nutriments par les plantes et entraînant par conséquent une perte de fertilité et de productivité des sols. En outre, 75 à 90 % du P ajouté est rapidement précipité, en formant des complexes « métal-cation » (par exemple, avec le fer, le calcium et l'aluminium) ou en étant associé à des oxydes et hydroxydes métalliques, aux argiles et /ou au carbone, et se fixe donc rapidement dans les sols où seule une petite quantité est utilisée par les plantes (Sharma et al. 2013).

Outre l'augmentation de la disponibilité du P par le biais de la fertilisation, d'autres caractéristiques des plantes et de la rhizosphère (par ex. le système d'enracinement et sa distribution spatiale, l'hyper-nodulation, les exsudats racinaires, l'acidification de la rhizosphère et l'hétérogénéité) contribuent à une plus grande absorption du P et donc à une BNF plus efficace (Janati et al. 2021).

2.1.1.c. Stratégies d'adaptation et mécanismes de tolérance des légumineuses à la déficience en phosphore

La faible disponibilité du P du sol peut être l'un des facteurs environnementaux les plus limitants pour la

physiologie des légumineuses, notamment par son impact négatif dans la fixation biologique symbiotique du N₂ avec les rhizobia. Afin de pallier cette contrainte majeure, les plantes ont adopté plusieurs stratégies : morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires en réponse à la déficience en P afin d'assimiler efficacement le Pi (Bargaz et al. 2015).

a. Mécanismes permettant d'augmenter l'acquisition du P

- *Modification de la structure et de la morphologie racinaire :*

Plusieurs traits architecturaux permettent d'augmenter la surface sol-racine autorisant une grande exploitation du volume du sol et ainsi une meilleure adaptation aux sols pauvres en P. Ceux-ci comprennent à la fois des ramifications vigoureuses et une longueur élevée des racines ainsi qu'une augmentation de la densité et de la longueur des poils racinaires (Vance et al. 2003 ; Haling et al. 2018 ; Postma et al. 2014 ; Wen et al. 2019).

Chez le pois chiche, quelques gènes candidats pour la longueur du chevelu racinaire ont été détectés par génétique d'association dans des conditions de carence en P (SIZ1-like et HAD superfamily protein) (Kohli et al.2020).

- *Exsudation d'anions organiques et sécrétion de phosphatases et phytases*

En réponse à la déficience en phosphore, les plantes induisent une acidification de la rhizosphère par l'exsudation d'acides organiques de faible poids moléculaire. Cette acidification favorise la dissolution du phosphore non-disponible contenu dans les sols, ce qui augmente la disponibilité du phosphore à la racine et permet une absorption plus importante par la plante. Enfin, l'acidification de la rhizosphère modifie le milieu biotique et favorise la présence de bactéries solubilisatrices qui produisent des acides organiques. Ces bactéries favorisent la disponibilité des nutriments, notamment du phosphore, et contribuent ainsi à l'amélioration de la nutrition des plantes (Vengavasi and Pandey, 2016).

Les plantes éxudent également des carboxylates (citrate et malate) qui sont des ligands faibles pouvant se lier à de faibles concentrations de P dans le sol. Ces associations diminuent la force du lien entre le P et le complexe, le rendant ainsi plus mobile et plus facilement absorbable par les racines et donc disponible pour les plantes. De plus, ces ligands peuvent interagir avec les cations qui sont liés à P, ce qui leur permet d'être plus facilement libérés et absorbés par les plantes (Wang et al.2006). Ces anions organiques sont aussi capables d'augmenter la biodisponibilité du P en libérant du P à partir des phosphates d'oxyde de fer, d'aluminium et de calcium par échanges anioniques (Lynch and Beebe, 1995).

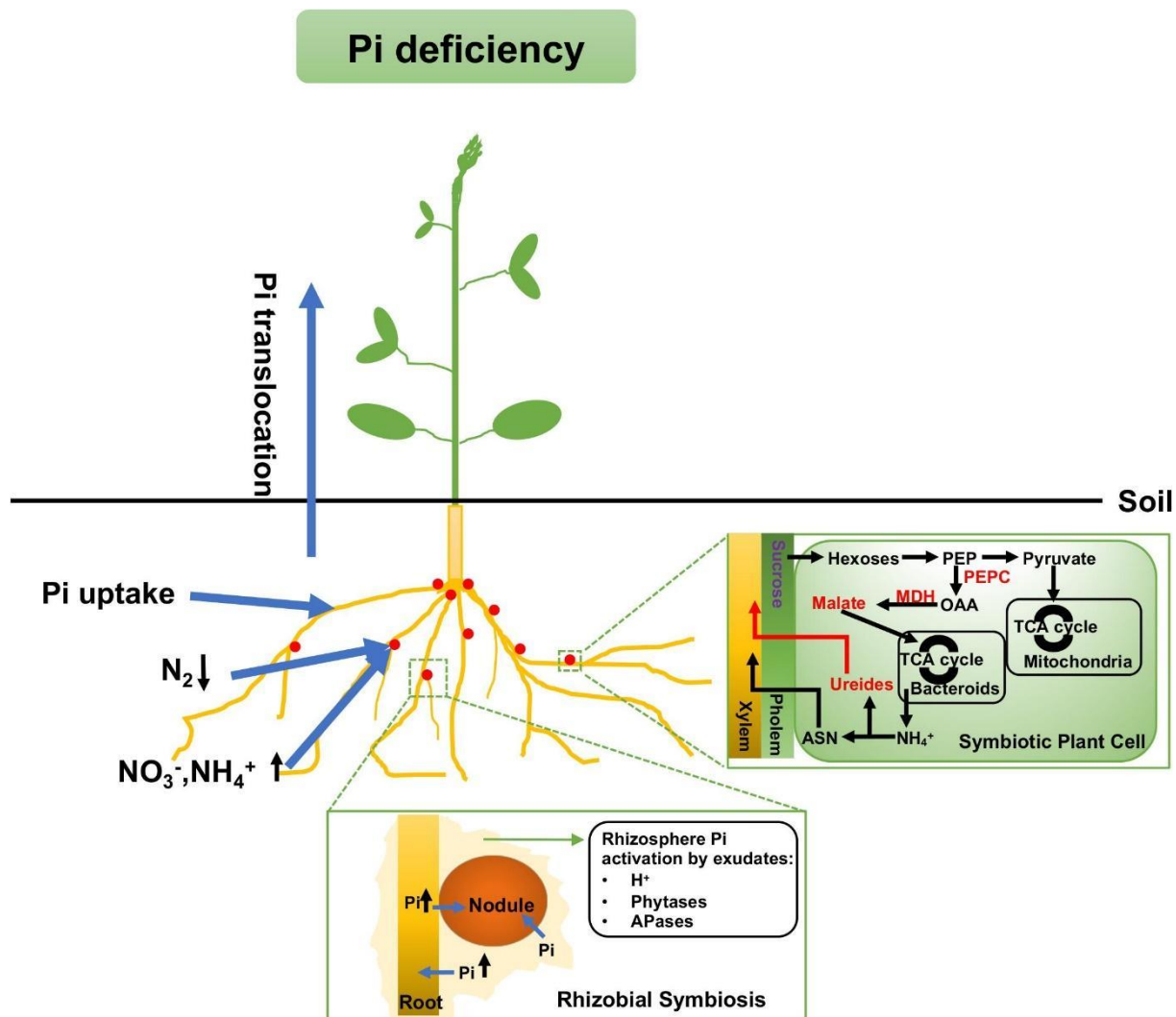


Figure 4 : Mécanismes de maintien de l'homéostasie du Pi en cas de carence en Pi chez les légumineuses. Source : Valentine et al.2017

Lorsqu'elles sont exposées à une carence en Pi, les légumineuses utilisent principalement le NO_3^- et le NH_4^+ du sol comme source principale d'azote plutôt que l' N_2 atmosphérique fixé par le biais de la SNF (**Figure 4**).

L'induction des phosphatases acides (APases) est un phénomène universel de la réponse des plantes à la déficience en Pi. Leur fonctionnement consiste à récupérer le Pi intracellulaire (vacuolaire) ou extracellulaire (sécrété) qui catalysent l'hydrolyse de Pi à partir de monoesters de phosphate (Helmke, 1995 ; Hinsinger, 2001). Plus précisément, il a été démontré que les phosphatases acides intracellulaires augmentent après deux jours de privation de Pi, ce qui provoque une baisse des niveaux de Pi libre. Ces enzymes sont probablement impliquées dans le recyclage de Pi à partir des métabolites P intracellulaires (Pratt et al.2009). En revanche, lors d'une période prolongée de carence en Pi, les phosphatases acides sécrétées s'accumulent dans le milieu de croissance pour dégrader les composés organiques extracellulaires de P (Bozzo et al.2006).

Les stratégies d'adaptation à une faible disponibilité de P varient tant sur le plan morphologique que

physiologique entre les espèces cultivées et sauvages : les graminées tolèrent la carence en P en modifiant la morphologie de leurs racines, tandis que les légumineuses, en particulier les lupins, utilisent plus efficacement le P limité en augmentant l'activité des phosphatases acides de la rhizosphère (Wu et al.2021). Le lupin est mieux adapté à la carence en P que le maïs ce qui se traduit par une plus forte augmentation des activités phosphatases et une facilitation de l'acidification de la rhizosphère (Ma et al.2021).

De plus ces stratégies peuvent se différencier selon le stade phénologique de la plante. Chez le pois chiche, il a été signalé qu'en réponse à la déficience en Pi une diminution du diamètre des racines, ainsi qu'une augmentation des activités des carboxylates et des phosphatases acides dans le sol de la rhizosphère ont été observées, durant le stade de la floraison et du bourgeonnement par rapport au stade du semis (Pang et al.2022).

b. Mécanismes permettant d'améliorer l'efficacité d'utilisation du P

- *Expression accrue des transporteurs de Pi à haute affinité*

De nombreuses études ont montré que la déficience en P provoque une augmentation de la capacité de prélèvement de cet élément chez les plantes (Adnane et al.2015). Ainsi, les plantes acquièrent du Pi malgré un gradient de concentration important à travers la membrane plasmique caractérisé par des concentrations de Pi à l'intérieur des cellules végétales généralement 1 000 fois supérieures à celles de l'extérieur.

Les plantes sont capables d'accumuler sélectivement et activement le Pi et d'autres nutriments minéraux dans leurs cellules. Le transport sélectif de composés à travers les membranes cellulaires et intracellulaires est assuré par des protéines de transport membranaires dotées de sites de liaison spécifiques. La répartition des nutriments au niveau des cellules, des tissus et des organes joue un rôle essentiel dans le cycle de vie d'une plante ; elle se fait par un transport à courte et longue distance, comprenant plusieurs étapes de transport membranaire.

Deux mécanismes d'absorption de Pi chez les plantes ont été identifiés à haute et basse affinité. Le processus d'absorption à haute affinité est induit lorsque le Pi est déficient dans le sol, alors que le système de transport à faible affinité semble être exprimé de manière constitutive dans les plantes (Rausch and Bucher 2002). Les gènes codant pour les transporteurs de phosphate (PT), qui appartiennent à la famille du transporteur de Pi 1 (PHT1), ont été identifiés comme ayant un rôle essentiel dans l'augmentation de l'acquisition et de la translocation du phosphate dans les plantes. Les transporteurs de Pi de haute affinité sont des protéines associées à la membrane qui transportent le Pi d'un milieu extérieur contenant de faibles concentrations (c-à-d. 1-10 μ M) dans le cytoplasme où les concentrations de Pi sont beaucoup plus élevées (c-à-d. 1 mM) (Liu et al. 1998). Plusieurs études ont révélé que la majorité des gènes appartenant à la famille Pht1 des transporteurs de phosphate sont principalement exprimés dans les racines en réponse à la déficience en P chez *Arabidopsis*, le soja et le riz (Mudge et al.2002 ; Gu et al.2016 ; Xu et al.2019).

La translocation de P_i à l'intérieur de la plante est un mécanisme essentiel pour permettre aux plantes de s'adapter à des niveaux variables d'approvisionnement en P. Les transporteurs de P_i à faible affinité jouent un rôle clé dans ce processus. Une augmentation de l'expression des gènes des transporteurs de P_i à faible affinité peut être nécessaire pour améliorer l'efficacité d'utilisation du P (PUE), mais cela peut entraîner une baisse de l'efficacité d'acquisition du P (PAE) et du rendement. Par conséquent, l'optimisation du PUE est essentielle pour obtenir un bon rendement et un PAE élevé dans les systèmes agricoles à faibles intrants en P (Huang et al.2011).

Chez le lupin blanc (*Lupinus albus*), la carence en P induit l'expression de plusieurs gènes au niveau des racines codant pour les transporteurs de phosphate à haute affinité et les facilitateurs du trafic des transporteurs de phosphate (Helmke 1995).

- *L'association symbiotique avec des microorganismes du sol*

L'association symbiotique avec des champignons mycorhiziens et des bactéries favorisant la croissance des plantes est parmi les stratégies de mobilisation de P dans le sol. Le rôle des microorganismes du sol dans le cycle du phosphore est bien connu, en particulier le rôle solubilisateur. Toutefois, aujourd'hui, on comprend de mieux en mieux l'importance d'autres bactéries ou champignons, soit dans le sol soit dans la plante (endophytes), pour moduler les performances des légumineuses à grains (**Figure 5**).

- ✓ Rôle de la symbiose mycorhizienne dans la nutrition en P des plantes. En effet, les champignons mycorhiziens améliorent la nutrition en P_i des plantes en piégeant le P disponible grâce à la grande surface de leurs hyphes et à leurs mécanismes d'absorption du P_i à haute affinité (Nussaume et al. 2011).
- ✓ Rôle d'autres microorganismes solubilisateurs de P.

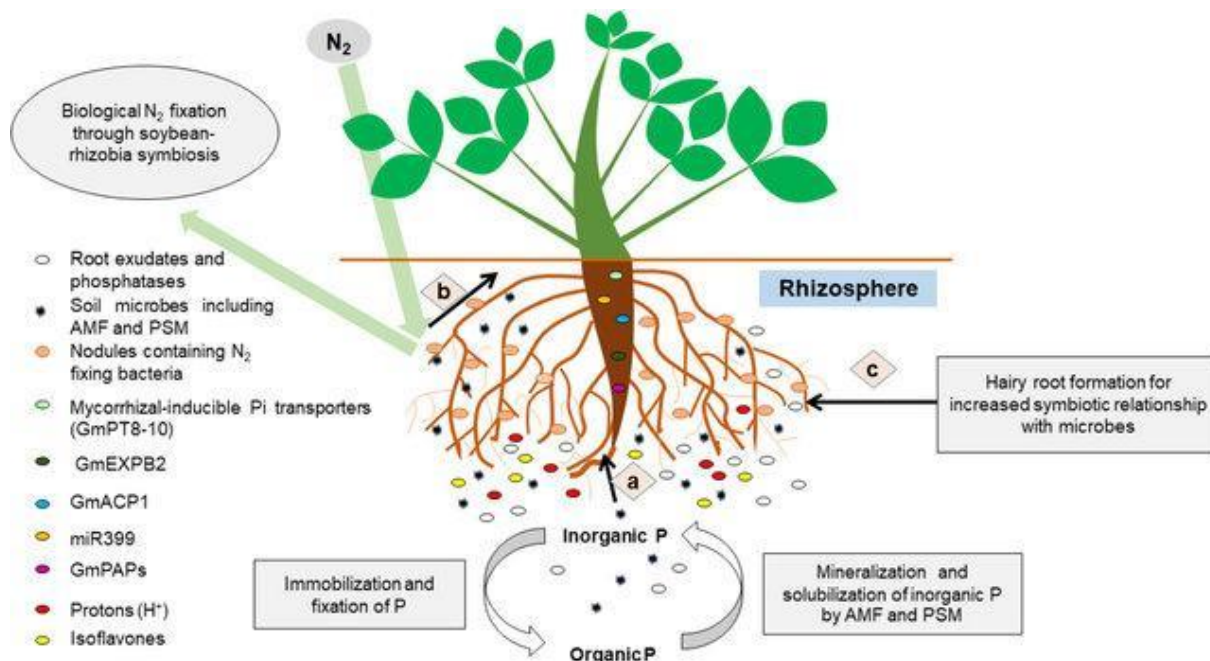


Figure 5 : Des bactéries symbiotiques associées au soja pour améliorer l'efficacité du phosphore (PE). Source : Bello, 2021
a. Augmentation de l'absorption de P par le biais d'associations de champignons mycorrhiziens à arbuscules (AMF) et de microorganismes solubilisant le phosphore (PSM) avec la racine du soja. **b.** Fixation biologique de l'azote par le biais de la symbiose soja-rhizobia qui augmente la concentration de N dans les tissus et l'activité phosphatase extracellulaire. Les nodules formés au cours du processus de fixation biologique de l'azote pourraient aussi potentiellement absorber le P de la solution du sol. **c.** La transformation des chevelues racines par des approches génétiques pourrait accroître l'association symbiotique des racines de soja avec des bactéries fixatrices d'azote, des AMF et des PSM afin d'augmenter l'acquisition de P. Les GmPT (transporteurs de phosphate), GmEXPB2 (gène de la β -expansine), GmACP1 (gène de la phosphatase acide), miR399 (microARN399) et GmPAP (gènes de la phosphatase acide pourpre) sont des gènes liés au PE fortement exprimés et modulés par les associations microbiennes symbiotiques. Les phosphatases et les exsudats racinaires tels que les protons, les isoflavones et les anions d'acides organiques sont également libérés dans la rhizosphère pour favoriser un PE plus élevé.

Les microorganismes solubilisateurs de P peuvent augmenter le P disponible pour les plantes

- (i) en modifiant les processus du sol de la rhizosphère, ce qui entraîne une augmentation de l'assimilation du P par les plantes. La minéralisation et la solubilisation du phosphore par les microorganismes du sol peuvent libérer le phosphore de la phase solide du sol vers la solution du sol assurant ainsi une meilleure nutrition phosphatée pour les cultures (Lazali et al.2020 ; Raymond et al.2021).
- (ii) en favorisant les caractéristiques des plantes, par une augmentation de l'absorption du P par la production de substances favorisant la croissance des plantes (Janati et al.2021).

Ces deux facteurs pourraient indirectement influencer l'efficacité de la BNF chez les légumineuses, processus très dépendant de la nutrition phosphorée. Améliorer la BNF dans les légumineuses à grains par l'intermédiaire de micro-organismes du sol qui ne sont pas directement impliqués dans la BNF pourrait être une option propice à l'augmentation de l'offre de protéines abordables et écologiques pour l'homme, tout en améliorant la durabilité globale des systèmes de culture (Meena et al. 2018). Ainsi, l'utilisation de microorganismes solubilisateurs de phosphore du sol est primordiale, en tant que stratégie écologique viable, permettant la réduction de la dépendance des agriculteurs envers les engrais inorganiques et l'amélioration

de la qualité des sols (Khan et al.2010). Dans ce contexte, une attention croissante est accordée à la capacité des micro-organismes du sol sélectionnés à dessein d'améliorer la fertilité des sols par des méthodes biologiques.

En conclusion, l'incorporation dans les systèmes de culture de légumineuses dotées d'un potentiel PUE inhérent, d'un système racinaire profond, d'une solubilisation du P médiée par l'exsudat racinaire et l'association avec des microorganismes du sol bénéfiques et sources de résidus riches en nutriments, pourrait être un outil prometteur pour mener à une meilleure gestion du P dans des conditions de carence en cet élément et ainsi améliorer la productivité des légumineuses (Mitran et al. 2018).

2.1.2. Salinité des sols

2.1.2.a. Effet de la salinité sur les plantes et focus sur les légumineuses.

La salinité des sols est une menace majeure pour la durabilité de l'agriculture et la sécurité alimentaire mondiale (Yang and Guo 2018 ; Isayenkov and Maathuis 2019). Elle peut réduire le rendement des cultures jusqu'à 58 %. La salinité du sol, même à de faibles niveaux, peut entraîner une profonde altération de la biodiversité du sol et certains sols atteignent un état de désertification critique. À l'échelle mondiale, les sols salins représentent environ 10 % de la surface terrestre et 50 % de l'ensemble des terres arables (Park et al. 2016).

La salinité a un impact négatif sur les fonctions morphologiques et biochimiques des plantes. Elle inhibe la germination des graines, la croissance, le développement et le rendement des cultures, la photosynthèse, la transpiration et la conductance stomatique (Pan et al. 2021). La salinité diminue le potentiel hydrique et la pression de turgescence des feuilles et génère un stress osmotique (Navada et al. 2020). En général, l'altération des plantes par le sel est très variable. Elle dépend de la concentration en sel, de la durée et de la fréquence d'exposition, des caractéristiques des sols et des espèces de plantes concernées. Les plantes peuvent être affectées par la salinité de différentes façons, notamment en ce qui concerne leur croissance, leur développement et leur productivité. Les symptômes les plus courants d'altération du sel sont la chlorose, la pâleur des feuilles et la dessiccation des tissus. Dans les cas les plus graves, le sel peut causer la mort des plantes (Munns, 2002 ; Pirasteh-Anosheh et al.2015).

Communément, le stress salin affecte la croissance des plantes en deux phases : la phase précoce (phase osmotique) et la phase tardive (phase ionique) (Munns and Tester, 2008). La réponse précoce a lieu lorsque les racines d'une plante sont exposées à des niveaux élevés de sel, tandis que le stress en phase tardive est la conséquence de l'effet toxique de l'accumulation de sel dans la plante (Munns, 2005) (**Figure 6**). La hausse de la salinité perturbe l'absorption des minéraux et l'homéostasie ionique des plantes en provoquant un déséquilibre ionique. Il en résulte un stress osmotique associé à une augmentation de la concentration en

espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale, entraînant ainsi des perturbations au niveau des membranes, de la peroxydation des lipides, de l'ADN et des protéines (El Ghazali, 2020). Les transporteurs responsables de l'absorption des ions Na^+ et Cl^- provoquent une toxicité ionique et inhibent l'absorption de K^+ et de Ca^{2+} (Arif et al. 2020).

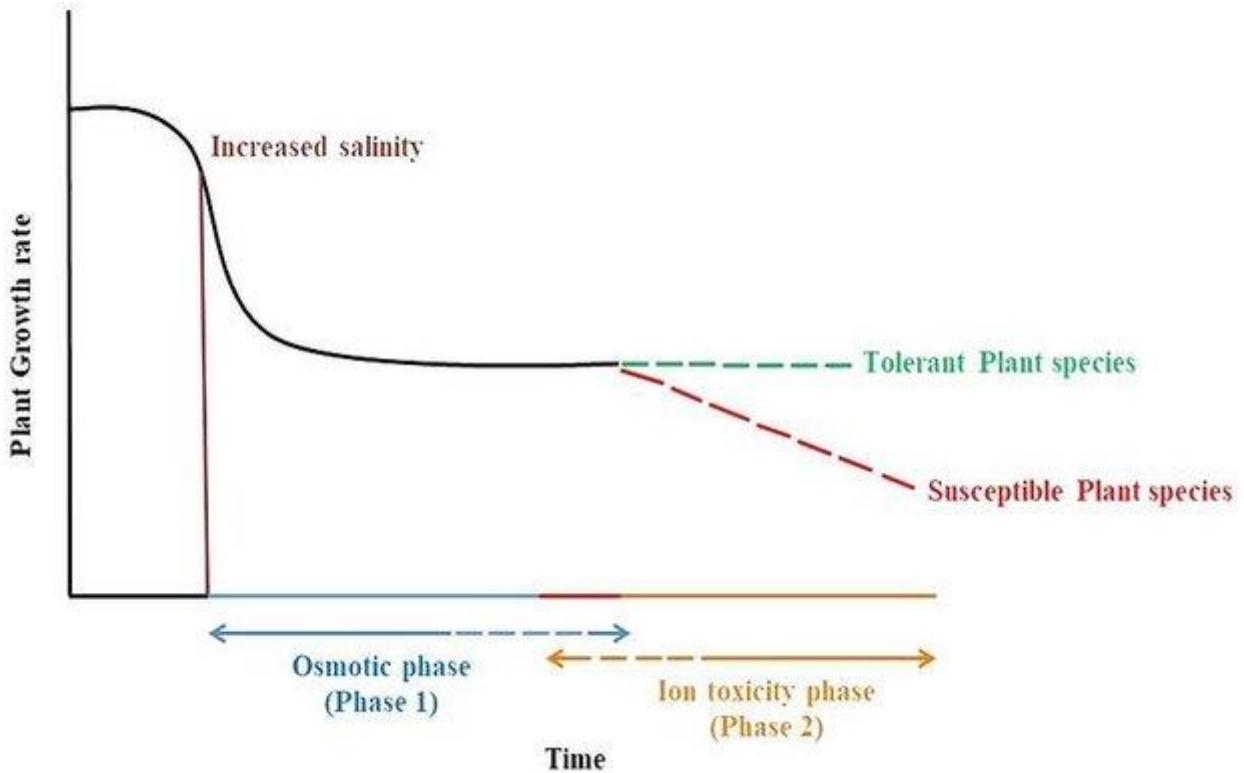


Figure 6 : Un aperçu de la réponse de la croissance des plantes en deux phases en réponse au stress salin. Source : Polash et al. 2019.

Chez les légumineuses le stress salin affecte négativement les relations symbiotiques de nodulation des racines et la capacité de fixation de l'azote ainsi que la croissance et le rendement (Etesami et Adl 2020). La salinité peut principalement entraîner de fortes réductions de la nodulation, de la taille des nodules et du potentiel de fixation de N_2 (Manchanda et Garg, 2011). En général, le degré d'altération induit par le sel varie selon l'espèce végétale, les variétés/génotypes, le niveau de salinisation, la durée du stress et le stade de développement des plantes et de leurs organes (Zhao et al. 2020). Chez le pois d'Angole (*Cajanus cajan* L.), le stress salin provoque un déséquilibre ionique, entraînant ainsi une augmentation du Na^+ et une réduction des teneurs en K^+ et Ca^{2+} dans les nodules, associées à une production accrue de proline et de glycine bêtaïne, ainsi qu'une activation des enzymes antioxydantes dans les nodules. La croissance des nodules, la teneur en légémoglobine et l'activité de réduction de l'acétylène diminuent significativement dans des conditions salines (Manchanda et Garg, 2011). L'amélioration de la croissance et de la fixation biologique de l'azote des légumineuses cultivées sur des sols salins est considérée comme un défi majeur. Une symbiose pleinement efficace dépend principalement de la survie et de la capacité fonctionnelle des bactéries, même dans des conditions environnementales défavorables. Or, la salinité du sol modifie

l'abondance des communautés bactériennes, fongiques et mycorhiziennes à arbuscules du sol et, par la suite, affecte leur fonction dans les écosystèmes salins (Zhang et al. 2019), en altérant leurs activités enzymatiques par des changements de la pression osmotique et par des effets ioniques (Haj-Amor et al. 2022).

2.1.2.b. Stratégies d'adaptation et mécanismes de tolérance des plantes à la salinité des sols

En tant qu'organismes sessiles, les plantes doivent développer diverses stratégies pour s'adapter aux environnements salins. Ces stratégies comprennent une série de voies de signalisation qui sont impliquées dans des fonctions allant de la détection du stress salin à l'expression de nombreux gènes sensibles au stress salin, qui régulent des processus tels que le transport des ions, l'homéostasie osmotique et la détoxification (Yang et Guo, 2018a ; Gong, 2021).

Les adaptations à la salinité pourraient être rassemblées en trois groupes : la tolérance au stress osmotique, l'exclusion des ions Na^+ ou Cl^- , et la tolérance des tissus à l'accumulation d'ions (Munns et Tester, 2008). La tolérance des plantes au stress salin comprend des modifications morphologiques, physiologiques et moléculaires complexes telles l'activation du système de défense antioxydant (de Freitas et al.2019; Polash Mohammed Arif Sadik et al.2019; Alkharabsheh et al.2021).

Les plantes peuvent être classées en deux grands types sur la base de l'évolution adaptative : les halophytes (qui peuvent résister à la salinité) et les glycophytes (sensibles à la salinité et qui finissent par mourir). La majorité des principales espèces cultivées appartiennent à cette deuxième catégorie (Kataria et Verma 2018).

a. Maintien de la balance ionique

En cas de stress salin, de fortes concentrations de l'ion sodium (Na^+) s'accumulent dans les cellules végétales, jusqu'à atteindre des niveaux toxiques, ce qui entraîne une perturbation de l'homéostasie ionique (Park et al.2016).

Les plantes ont développé des systèmes pour maintenir de faibles niveaux de Na^+ en éliminant le Na^+ du cytoplasme. Cela se fait principalement à l'aide d'antiporteurs Na^+/H^+ , qui transportent le Na^+ en échange de H^+ à l'extérieur de la cellule. Les antiporteurs Na^+/H^+ situés à la surface de la membrane plasmique permettent de transférer le Na^+ de l'intérieur vers l'apoplaste. Les antiporteurs Na^+/H^+ présents au niveau de la membrane vacuolaire assurent la séparation du Na^+ entre la vacuole et le reste de la cellule (Zhu, 2002).

b. Maintien de l'homeostatsie osmotique

L'excès de sel dans le sol perturbe l'équilibre ionique et entraîne une déficience hydrique dans la cellule végétale, entraînant ainsi un stress osmotique. Cela se manifeste par une diminution de la turgidité cellulaire, une réduction de l'élasticité de la membrane plasmique et des modifications structurelles de la paroi cellulaire (Park et al.2016).

Les plantes régulent le stress osmotique en activant des processus tels que l'expression génétique, l'activation des enzymes de biosynthèse des osmolytes et les systèmes de transport de l'eau à l'aide de voies de signalisation osmotique (Yang et Guo, 2017).

En cas de stress salin, les protéines kinases agissent comme un point de convergence de l'osmorégulation rapide et de la signalisation du stress salin (Chen et al.2021).

Des osmolytes tels que la proline, les polyols et les sucres sont accumulés pour contribuer à la régulation de la pression osmotique en réduisant le potentiel osmotique dans le compartiment cytosolique. De plus, ces molécules agissent également comme des signaux pour induire l'accumulation d'acide abscissique (ABA), moduler l'expression des gènes correspondants et réguler la croissance des plantes (Marusig et Tombesi, 2020).

L'implication des polyamines dans l'homéostasie oxydative dans la réponse de défense des génotypes de *M. truncatula* montrant une sensibilité au stress salin a été confirmé par l'expression de la diamino oxydase, impliquée dans le catabolisme de la putrescine (Antoniou et al.2021).

c. Modulation de l'architecture du cytosquelette et de la paroi cellulaire

La régulation de la dynamique du cytosquelette et la structure de la paroi cellulaire compte parmi les processus adaptatifs pour atténuer le stress salin. Le stress salin déclenche des changements dans l'architecture du cytosquelette en modulant des événements dynamiques, tels que la nucléation et la polymérisation, la séparation et la dépolymérisation, la réticulation/le regroupement, et la croissance/le rétrécissement (Lian et al.2021). Pendant le stress salin, la dépolymérisation et la réorganisation des microtubules corticaux augmentent la tolérance des plantes à ce stress (Wang et al.2011). De même, la dépolymérisation et la stabilisation de l'actine sont importantes pour la tolérance au sel des plantes. La voie de régulation SOS (salt overly sensitive) régule d'une part l'homéostasie ionique en modulant l'activité des antiporteurs Na^+/H^+ et d'autre part la dynamique de l'actine et l'organisation du cytosquelette en réponse au stress salin (Zhou et al.2010 ; Ye et al.2013). Chez *Arabidopsis* les microtubules jouent un rôle crucial dans l'adaptation et la tolérance au stress salin et la modulation de l'expression des gènes liés aux microtubules peut être une stratégie efficace pour développer des cultures tolérantes au sel (Chun et al.2021).

d. Médiation de la signalisation des phytohormones - Signalisation de l'ABA

Les phytohormones jouent un rôle crucial dans la réponse des plantes au stress salin en régulant leur croissance et leur adaptation au développement (Yu et al.2020).

L'acide abscissique (ABA) est l'hormone végétale la plus importante qui régule les réponses au stress. L'ABA fonctionne comme une importante molécule de signalisation secondaire pour activer une cascade de kinases et médier l'expression des gènes pendant la réponse au stress salin. Dans des conditions de stress, la synthèse de l'ABA est induite rapidement, ce qui entraîne une augmentation rapide des niveaux d'ABA (Jia et al.2002).

e. Génération d'espèces chimiques réactives

Les plantes répondent aux stress abiotiques d'une manière exceptionnellement complexe et coordonnée, impliquant des interactions croisées avec de nombreuses voies métaboliques et moléculaires. L'une des réponses les plus courantes est la génération d'espèces chimiques réactives (**Figure 7**), notamment les espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species), les espèces réactives de l'azote (RNS, Reactive Nitrogen Species), les espèces réactives du carbonyle (RCS, Reactive Carbon Species) et les espèces réactives du soufre (RSS, Reactive Sulfur Species) (X. Zhou et al.2022).

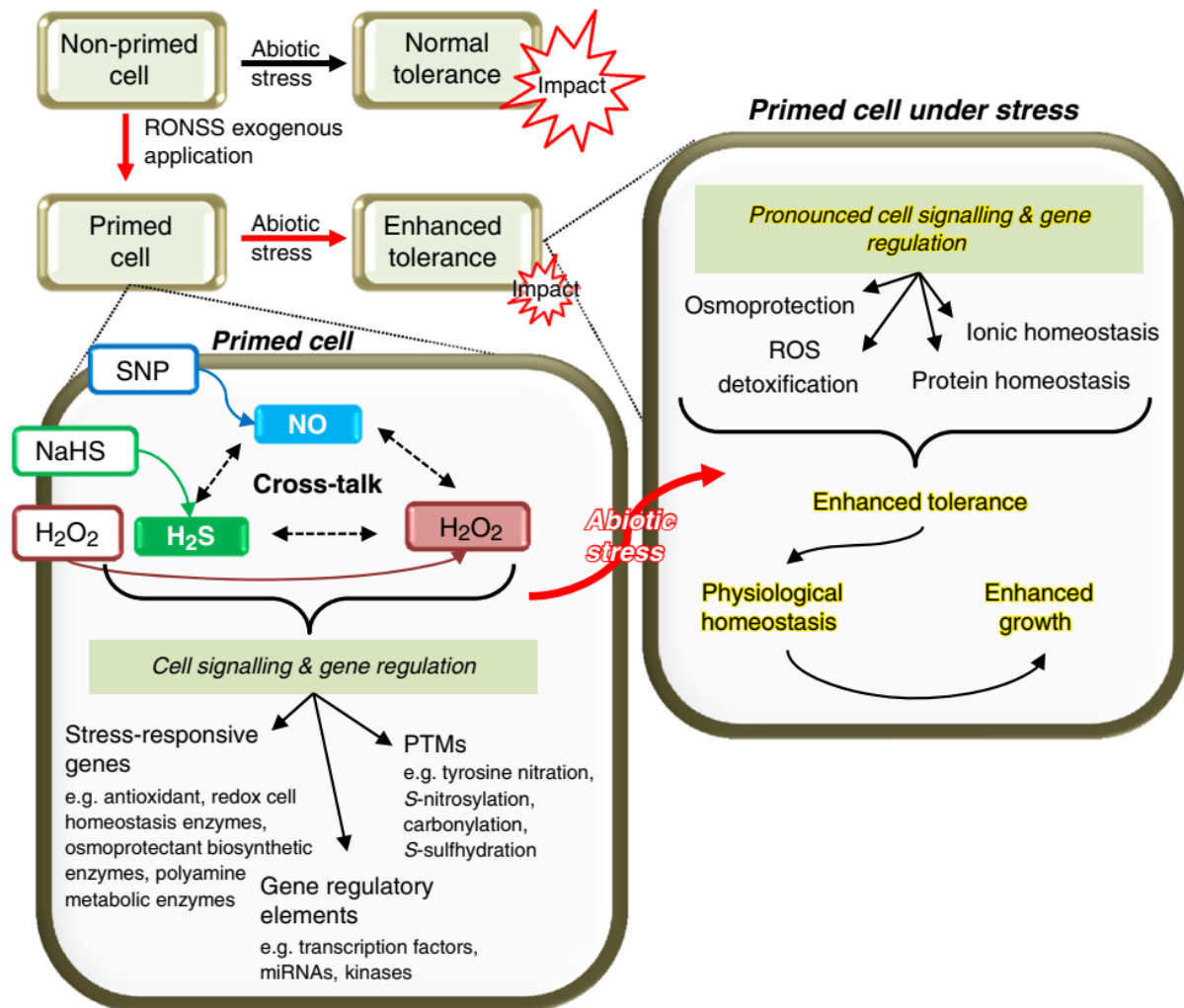


Figure 7 : Les espèces réactives de l'oxygène, de l'azote et du soufre améliore la tolérance au stress des plantes exposées ultérieurement à un stress abiotique et atténue les effets du stress. *Source : Antoniou et al.2016*

La production de ROS est parmi les mécanismes impliqués dans la tolérance des plantes à la salinité dans de nombreux organites végétaux, tels que le chloroplaste, les peroxysomes, les mitochondries et l'apoplaste (Marusig et Tombesi, 2020). Le stress ionique et le stress osmotique déclenchés par le stress salin provoquent un déséquilibre du métabolisme et l'accumulation toxique de ROS, induisant des dommages oxydatifs pour les plantes (Yang et Guo, 2018b). Il est établi que les stimuli du stress salin sont à l'origine de l'activation des enzymes de piégeage des ROS et des antioxydants (Choudhury et al.2017). Par exemple, les ascorbates peroxydases et catalases sont activées par le stress salin, ce qui améliore la tolérance à la

salinité et aux stress oxydatifs (Sofo et al.2015).

2.1.2.c. Stratégies d'adaptation et mécanismes de tolérance des Medics à la salinité des sols

L'accumulation d'osmolytes ou de solutés compatibles tels que la proline, les polyamines, le tréhalose et les sucres solubles, le maintien de faibles rapports $\text{Na}^+ : \text{K}^+$, l'activation d'enzymes antioxydantes pour réduire la perte d'eau et augmenter la turgescence ainsi que l'expansion des cellules et la régulation hormonale confèrent à la luzerne une tolérance au sel (Al-Farsi 2020).

Une étude menée en plein champ chez une population tunisienne de la légumineuse sauvage *M. truncatula* a montré que l'adaptation au stress salin est liée à l'origine des génotypes : les génotypes d'origine saline sont moins affectés par le sel que les génotypes d'origine non saline (Friesen et al.2014). La combinaison des tests empiriques d'adaptation locale aux sols salins avec des analyses du polymorphisme du génome complet révèle des régions génomiques candidates à l'adaptation qui contiennent des gènes régulant l'acclimatation physiologique au stress salin, à savoir la signalisation de l'acide abscissique et de l'acide jasmonique (Friesen et al.2014).

Des études de génétique d'association GWAS ont été conduites chez 132 génotypes de *M. truncatula* cultivés dans une chambre de culture en pots et soumis à des augmentations progressives de NaCl, de 0 à 0,5 % et de 1,0 % à 1,5 %. Leurs performances en termes de vigueur, de biomasse des pousses, de teneur en eau des pousses, de teneur en chlorophylle des feuilles, de taille des feuilles, et des concentrations foliaires et racinaires de proline et d'ions majeurs (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca_2^+ , etc.) ont été mesurées. Cette analyse menée sur 2,5 millions SNP a identifié 12 régions génomiques associées à au moins quatre traits et a révélé une association entre la tolérance à la salinité et les modifications du niveau de transcription au niveau de sept gènes, dont deux gènes codant respectivement pour une H^+ -ATPase vacuolaire et une peroxydase (Kang et al.2019).

2.2. Comment les légumineuses sont-elles limitées par les stress biotiques ? Cas de la verticilliose chez les Medics.

Les stress biotiques chez les plantes sont les actions d'un autre organisme qui réduisent la croissance, la survie et la fécondité des plantes. Ces dommages sont produits par des attaques d'organismes vivants tels que les ravageurs parasites, bactéries, champignons, nématodes, insectes, virus, etc., responsables des maladies des plantes (Kalpesh et al.2018).

Les maladies des plantes causées par des agents pathogènes du sol ont été reconnues dans le monde entier comme un facteur critique pour la santé des plantes et la productivité globale de l'agriculture (De Corato, 2020).

2.2.1. *Verticillium alfalfae*, agent causal de la verticilliose, l'une des maladies les plus dévastatrices chez la luzerne

2.2.1.1. Taxonomie de *Verticillium alfalfae*

Verticillium est un genre d'ascomycètes phytopathogènes qui provoquent la verticilliose, un type de flétrissement vasculaire affectant plus de 200 espèces végétales et entraînant ainsi des destructions massives (Inderbitzin et Subbarao, 2014). Le flétrissement verticillien est la maladie vasculaire la plus destructrice connue chez la luzerne, avec des symptômes typiques produisant des lésions en forme de V sur l'extrémité des feuilles des plantes symptomatiques avec des tiges qui restent vertes accompagnées de tissus vasculaires décolorés (Harvey, 1982).

L'histoire taxonomique de *Verticillium* est longue et compliquée, avec des controverses sur les limites des espèces et l'existence d'espèces cryptiques (i.e. espèces référencées comme une seule et même espèce par le passé, car elles sont très semblables), ce qui a rendu difficile de compiler de manière claire le spectre d'hôtes pour chaque espèce de *Verticillium* (Inderbitzin et Subbarao 2014). L'espèce initialement isolée de la luzerne est identifiée comme étant *V. alfalfae*, anciennement *V. albo-atrum* avant 2011 (Inderbitzin et al. 2011) et l'hôte unique de *V. alfalfae* est la luzerne (Inderbitzin et Subbarao 2014).

Morphologiquement, sur de la gélose dextrose de pomme de terre (PDA, Potato Dextrose Agar), *V. alfalfae* présente des colonies blanchâtres au début, qui deviennent foncées en raison de la formation du mycélium de repos, constitué d'hyphes mélanisés (**Figure 8**). Les conidiophores sont hyalins, parfois pigmentés de brun à la base, et forment des verticilles avec deux à cinq phialides à chaque nœud. Les conidies sont hyalines, cylindriques avec des sommets arrondis à ovales, et mesurent entre 3,5 et 8,5 µm de longueur et entre 2,5 et 4,0 µm de largeur (Inderbitzin et al. 2011). Morphologiquement, il est indiscernable de *Verticillium nonalfalfae* (Inderbitzin et al. 2011).

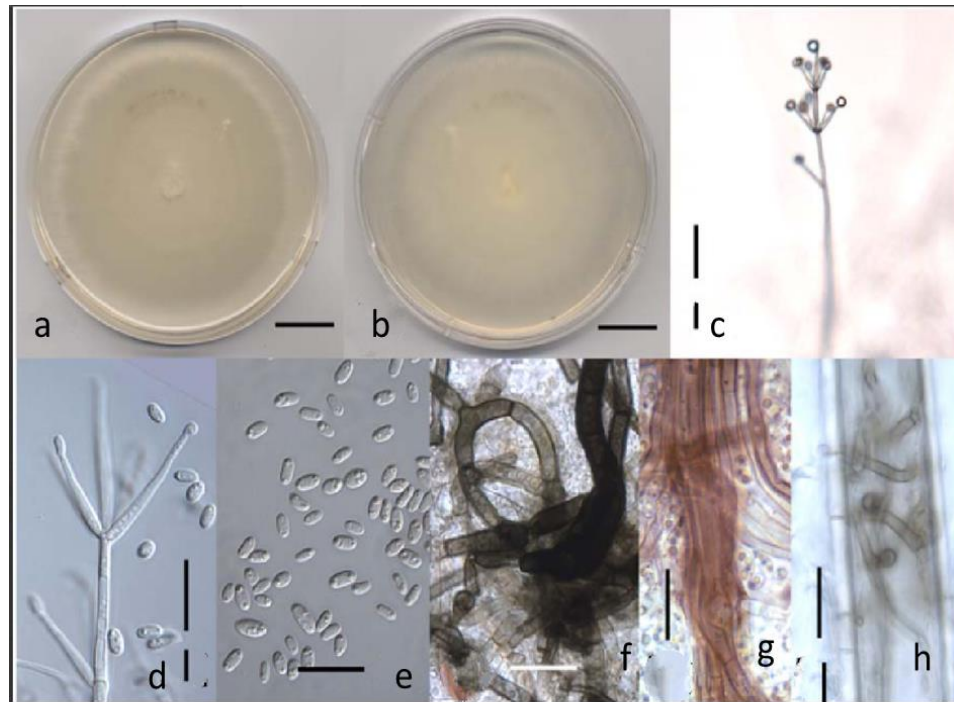


Figure 8 : Caractéristiques morphologiques de *Verticillium alfalfae* (souche PD682), source :Inderbitzin et al.2011

Colonie de *Verticillium* après 24 jours sur PDA, vue de face (a) et vue de dos (b). (c) Conidiophore après 31 jours sur WA-p (water agar with unidentified herbaceous stems). (d) Phialides après 30 jours sur WA-p. (e) Conidies après 30 jours sur WA-p. f. Mycélium au repos après 30 jours sur WA-p. (g) Hyphes agrégées du mycélium de repos mycélium au repos après 73 jours sur PDA. (h) Mycélium de repos dans une cellule végétale à paroi épaisse après 32 jours sur WA-p.

2.2.2.2. Interaction *Medicago truncatula*-*Verticillium alfalfae*

- **Cycle de vie et dispersion**

Verticillium spp est un agent pathogène du sol qui produit des spores (conidies) au cours de la croissance mycélienne et de la croissance dans le xylème, et, pour certaines espèces, des microsclérotés (forme de dormance), correspondant à des structures à parois épaisses et mélanisées de couleur brun foncé à noir pour une survie à long terme dans le sol (Short et al. 2015). La caractéristique spécifique de *V. alfalfae* est sa forme de repos constituée de mycélium mélanisé et non de microsclérotés.

- **Mécanismes infectieux et symptômes**

La maladie est polycyclique car le mycélium de repos de l'agent pathogène peut produire des conidies sur des tissus végétaux infectés (Fradin et Thomma, 2006). Ces conidies germent en présence d'exsudats racinaires dans la rhizosphère des plantes hôtes (MOL et al.1995) et servent d'inoculum pour infecter les plantes. Les conidies germées produisent des hyphes qui pénètrent le cortex racinaire, la zone d'élongation de la racine ou encore les régions d'émergence des racines latérales, et poussent directement vers la stèle pour atteindre le xylème (Yadeta et al. 2013). C'est le début du stade parasitaire (Bishop et Cooper 1983). Dans les vaisseaux du xylème, la croissance des hyphes et les conidiospores, qui se propagent de façon acropétale (i.e. de la base vers le sommet) avec le flux de sève, contribuent à la colonisation vasculaire (Yadeta et al. 2013) (**Figure 9**).

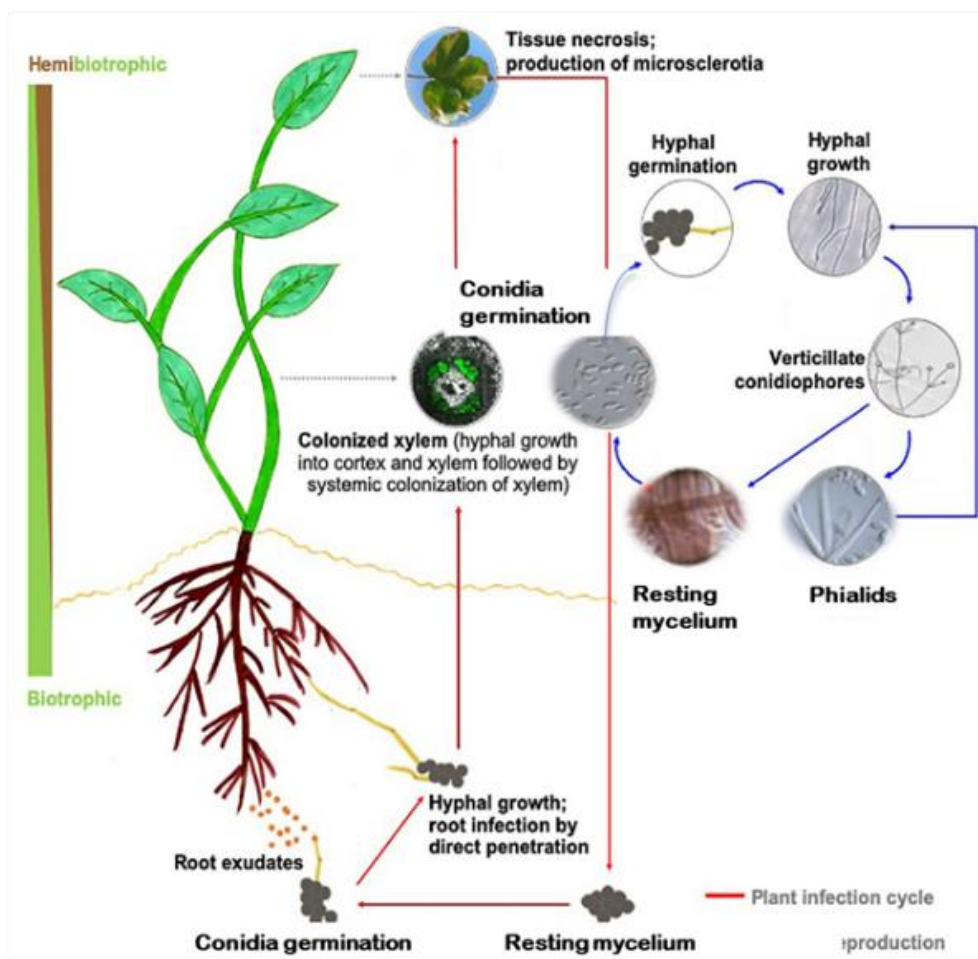


Figure 9: Cycle de la maladie dans un hôte générique et biologie de *Verticillium alfalfae*. Adapté à partir du cycle de *Verticillium dahliae* généré par Chen et al. 2020.

L'obstruction des vaisseaux conducteurs d'eau est causée par le champignon et par les gommés et les tyloses libérées par la plante en réponse à l'infection, ainsi que la sécrétion de toxines fongiques. Enfin, l'infection par le pathogène entraîne une diminution de la respiration et de la photosynthèse, induisant ainsi les symptômes de la maladie (**Figure 10**) -notamment le jaunissement, le flétrissement, le rabougrissement, la torsion et la dessiccation des feuilles, la chlorose et la nécrose des tissus et la décoloration des tissus vasculaires des racines et du collet- pouvant mener à la mort de la plante (Santhanam et al. 2013 ; Yadeta et al. 2013).

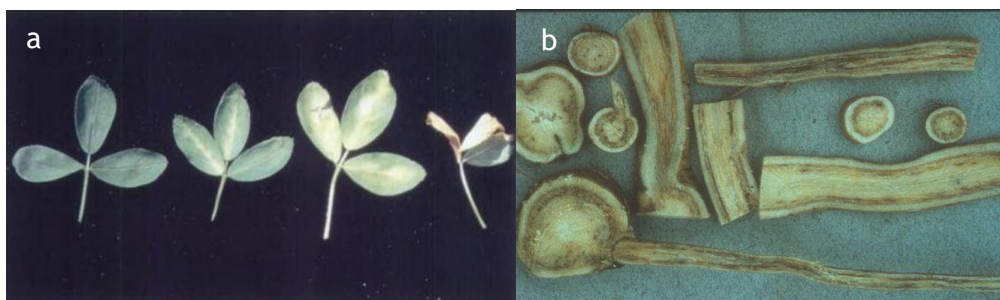


Figure 10: Symptômes de la maladie de la verticilliose causée par *Verticillium sp.p* sur les luzernes symptômes sur les feuilles (a), (b) et sur les racines.

https://www.agrifind.fr/alertes/wp-content/uploads/2020/03/Maladies-Verticilliose_feuilles_INRAE.jpeg
https://www.agrifind.fr/alertes/wp-content/uploads/2020/03/Maladies_Verticilliose_racine_ecophytopic.jpeg

Quand toutes les parties de la plante hôte sont fortement colonisées, le système vasculaire se bouche, empêchant l'eau d'atteindre les parties supérieures de la plante. Au fur et à mesure de la mort de la plante malade, le champignon produit du mycelium qui est libéré dans le sol avec la décomposition de la matière végétale, entraînant ainsi la dispersion du pathogène dans le sol et un nouveau cycle de maladie commence. C'est le stade saprophyte du champignon.

La lutte contre ce pathogène du flétrissement vasculaire est difficile à gérer du fait de sa localisation protégée et son inaccessibilité dans les plantes infectées, sa persistance à long terme sur le terrain par le biais des structures de survie qui restent viables pendant de nombreuses années dans le sol, sa large gamme d'hôtes et la rareté de la résistance chez l'hôte. Ces facteurs rendent généralement les mesures culturales comme les rotations ou la lutte chimique et biologique inefficaces (Yadeta et al.2013). Après l'introduction de l'agent causal du flétrissement verticillien provenant de graines ou de foin infectés dans une région indemne, cette maladie peut s'établir et se propager entre les champs par le biais des débris infectés, de l'eau d'irrigation, du vent et des machines agricoles (comme les presses à balles, les faucheuses et les roues de tracteurs), l'agent pathogène pouvant infecter les plantes par les tiges et les racines coupées (Howard, 1985). En outre, de nombreuses espèces d'insectes, y compris des ravageurs, des prédateurs et même des pollinisateurs, se sont révélées être des vecteurs efficaces pour acquérir et transporter l'agent pathogène depuis des sites de luzerne infectés vers des champs voisins ou éloignés exempts de flétrissement dans des conditions appropriées (Huang, 2003).

L'absence de méthodes de contrôle sûres et rentables justifie le développement de nouvelles techniques de gestion de la maladie. La mise en œuvre de stratégies de résistance génétique est la méthode la plus efficace pour lutter contre ce groupe d'agents pathogènes des plantes (Yadeta et al.2013).

2.2.3. Mécanismes de tolérance des *Medicago spp.* à la verticilliose

2.2.3.1. Défenses préformées et induites

Les plantes sont dotées de mécanismes de protection prédéfinis passifs, à la fois physiques et chimiques, qui les protègent contre les attaques et la propagation d'agents pathogènes. Les cuticules, la cire l'épiderme, les parois cellulaires et les mouvements stomatiques présentent la première ligne de défense sur laquelle le pathogène doit adhérer pour initier le processus d'infection (Taiz and Zeiger, 2006 ; Çelik et al. 2014). Les plantes produisent également des composés chimiques sécrétés à la surface ou certains autres composés présents dans les cellules peuvent inhiber la croissance et le développement des agents pathogènes (Mahawer et al. 2022).

De plus, les métabolites secondaires tel que les hytoanticipines (plusieurs terpénoïdes) et les saponines ont

montré des rôles défensifs contre les stress biotiques chez les plantes avec des activités antioxydantes (Guest and Brown, 1997 ; Dahham et al. 2015).

Chez le coton une augmentation de la lignification induite par la défense renforce la résistance du coton contre *Verticillium dahliae* (Hu et al. 2021 ; Tang et al. 2019). Modifications des composés phénoliques du houblon (*Humulus lupulus L.*) induites par l'infection par *Verticillium nonalfalfae* (Kunej et al. 2020).

2.2.3.2. La perception des pathogènes

Une fois que le pathogène pénètre à l'intérieur de la cellule, une série de réactions se déclenche suite à la libération d'éliciteurs oligosaccharides à partir de la paroi cellulaire d'une plante hôte DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) ou d'un pathogène MAMP / PAMP (Microbe/ Pathogène-Associated Molecular Patterns) dans le cadre du processus de dégradation (Tang et al. 2012 ; Bianchi 2007 ; Boller et Felix ,2009), Ces éliciteurs activent le système immunitaire inné et leur présence est détectée par PRR (Pattern Recognition Receptors) (Macho et Zipfel, 2014).

Le système immunitaire des plantes peut être conceptuellement divisé en deux branches caractérisées par différents types de récepteurs (Jones et Dangl, 2006). La première branche est médiée par des récepteurs de reconnaissance des formes (PRR) situés sur la membrane plasmique, qui reconnaissent des molécules pathogènes conservées (PAMP) et aboutit à une immunité déclenchée par les PTI (PRR Triggered Immunity). La seconde branche est activée par des capteurs immunitaires intracellulaires de type NB-LRR (nucleotide-binding leucine-rich repeat), qui perçoivent directement ou indirectement des facteurs de virulence, connus sous le nom d'effecteurs, et aboutissent à l'activation de l'immunité déclenchée par les effecteurs ETI (PRR triggered immunity) (Bent et Mackey, 2007).

2.2.3.3. Les mécanismes de défense physico-chimiques

Lorsqu'une cellule végétale détecte la présence d'un pathogène potentiel, des enzymes catalyseurs déclenchent une réaction oxydative produisant des ROS capables de détériorer les cellules des organismes envahissants. Cependant les ROS contribuent également à renforcer la paroi cellulaire en catalysant des liaisons entre les polymères de la paroi cellulaire, elles sont aussi impliqués dans l'induction de l'expression de gènes de défenses, la réponse d'hypersensibilité (HR), la résistance systémique acquise (SAR pour systemic acquired resistance), la production de phytoalexines et le dépôt de callose (Brian et Gwyn, 2008). La production de ROS avec le symptôme de rupture oxydative est l'un des mécanismes de tolérance précoce contre les flétrissements vasculaire (*Fusarium*) (Swarupa et al. 2013, 2014). L'infection fongique intensifie la production de ROS et la synthèse des peroxydases et des protéines liées à la pathogenèse (PR), conduisant au déclenchement des voies de défense (Swarupa et al. 2014).

Les parois cellulaires de certains tissus de la plante peuvent s'épaissir sous l'effet des conditions environnementales, ceci empêche la progression des agents pathogènes (Dixon et al. 1994).

Les occlusions vasculaires sont des modifications structurelles communes à de nombreuses espèces végétales en réponse à l'infection par des agents pathogènes, et font partie des mécanismes les plus observés en réponse aux pathogènes vasculaires (Sun et al. 2013).

2.2.3.4. Transduction du signal

Face aux stress biotiques, les plantes ont développé plusieurs mécanismes de défense pour percevoir les signaux externes qui leur permettent de se préparer à une réponse optimale. Dans ce contexte, les phytohormones sont considérées comme un mécanisme de contrôle global de la santé des plantes, elles jouent un rôle central dans la régulation des réponses de défense contre les stress abiotiques et biotiques à travers la connexion des systèmes de signalisation responsables des processus vitaux (Berens et al.2017). Outre la signalisation de défense, ces phytohormones sont également des régulateurs de la croissance, du développement et des processus physiologiques. Elles agissent tout en maintenant un équilibre dans un réseau hautement complexe en réponse au développement et aux signaux environnementaux (Davies, 2015). Les phytohormones, comme l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA), l'éthylène (ET), l'acide abscissique (ABA), les brassinostéroïdes (BR), les auxines, les cytokinines (CK) et les gibbérellines (GA), répondent au stress par des actions synergiques et antagonistes, souvent appelées signaux croisés (Mauch-Mani et Mauch, 2005).

Chez la luzerne, L'inoculation de deux variétés de luzerne, résistante WL343HQ et sensible Dryland avec *V. alfalfae* affecte significativement le taux net de photosynthèse, la conductance stomatique, la teneur en chlorophylle, la teneur en MDA, les concentrations de JA et de SA, les teneurs en NO et H₂O₂. L'analyse WGCNA (weighted gene co-correlation network analysis) mesurés les jours 7, 14, 21 et 28 après l'inoculation a montré que le nombre de facteurs de transcription liés à la croissance des plantes et à la résistance aux maladies était plus élevé chez la variété résistante aux jours 7 et 28 après infection que chez la variété sensible aux jours 7 et 21 (Li et al.2022).

L'ABA et le SA augmente la résistance de *M. truncatula* contre *V. alfalfae* . En effet, l'induction de chitinases (enzymes qui dégradent la paroi des champignons permettant la libération de fragments de chitines renforçant ainsi la défense;) est assurée par la voie du SA (Adams, 2004). Par ailleurs, la voie de l'ABA peut inhiber la voie de l'ET minimisant ainsi les effets des toxines NEP (Necrosis-and-Ethylene-Inducing Factor), protéines qui provoquent l'induction de la voie de l'ET ainsi que des nécroses et du flétrissement chez les dicotylédones (Bae et al.2006 ; Toueni, 2014).

L'invasion de *V. dahliae* chez le coton provoque une série de réponses physiologiques et biochimiques, notamment l'augmentation des produits de peroxydation des lipides membranaires et la diminution de la teneur en sucres solubles et de l'absorption des nutriments (Bibi et al. 2017). La production des enzymes phénylpropanoïdes métaboliques contribue à la synthèse de la lignine et de SA, ce qui renforce la paroi cellulaire et favorise la résistance aux maladies (Smit et Dubery 1997). Enfin, la production de molécules de transduction du signal telles que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'acide jasmonique (JA) induisent

des réponses de résistance de manière synergique ou individuelle (Chen et al. 2020).

2.2.3.5. Contrôle génétique de la résistance à la verticilliose

La résistance des plantes aux maladies peut être contrôlée par des gènes majeurs, spécifiques de la race et responsables de la reconnaissance de l'hôte et du pathogène selon une relation 'gène pour gène' (Flor, 1947), ou par de multiples gènes mineurs. Les sources de résistance basées sur l'action de gènes multiples interagissant avec des facteurs environnementaux et menant le plus souvent à une résistance partielle, encore appelées résistance quantitative, peuvent offrir une résistance plus durable (McDonald et Linde, 2002).

Des résistances qualitatives à la verticilliose contrôlées par des gènes de résistance dominants uniques ont été identifiés chez la tomate, le coton, la pomme de terre et la laitue (Kawchuk et al.2001; Fradin et al.2009; Mert et al.2005; Christopoulou et al.2015; Hayes et al.2011). Cependant, tout comme pour plusieurs autres espèces végétales - notamment la pomme de terre, le houblon, le coton et la fraise (Antanaviciute et al.2015; Jakse et al.2013 ; Yang et al.2008; Simko et al.2004) , la résistance à la verticilliose chez les Medics est contrôlée quantitativement par de multiples gènes (Ben et al.2013; Yu et al.2016).

Des QTL de résistance à la souche française *Va V31.2* de *V. alfalfae* ont été détectés chez *M. truncatula*, dont un QTL majeur sur le chromosome 7 et deux QTL mineurs sur les chromosomes 2 et 6 (Ben et al.2013).

De multiples QTL associés à la résistance au *V. albo-atrum* ont été signalés chez des lignée recombinantes (RIL) de *M. truncatula* situés sur les chromosomes 1, 2, 6 et 8 (Negahi et al.2014). Des analyses GWAS étudiant la réponse de *M. truncatula* à la souche *Va V31.2* menées sur la collection MtHapmap et sur des accessions de la population tunisienne Soliman ont révélé des QTL et des gènes candidats différents (Mazurier, 2018). L'analyse de la collection MtHAPMAP a permis la détection d'un gène candidat pour la résistance partielle à *Va V31-2* situé sur le chromosome 7 codant pour une protéine SEC14 dont le rôle a été validé expérimentalement (Mazurier 2018). Par ailleurs, le changement de température (25°C au lieu de 20°C) combiné à une nouvelle souche pathogène iranienne de *V. alfalfae Va AF1* modifie entièrement l'architecture du contrôle génétique de la résistance au pathogène au sein de la même collection MtHapMap, à l'exception d'un QTL commun sur le chromosome 1, et ce malgré une forte corrélation de la réponse phénotypique et une répartition géographique similaire des accessions résistantes et sensibles. L'analyse de neuf gènes impliqués dans des voies de défense sous-jacents aux QTL détectés a montré que leur expression était induite dans les racines après inoculation, chez les plantes sensibles et résistantes avec une induction accrue et plus longue dans les plantes résistantes (Fartash, 2023, *in press*).

L'analyse transcriptomique de génotypes résistants et sensibles de *M. truncatula* à la verticilliose a indiqué que le génotype résistant présentait des niveaux d'expression basale plus élevés de divers gènes liés à la défense, ainsi qu'une régulation accrue des gènes impliqués dans l'immunité déclenchée par le PAMP (Pathogen-associated molecular patterns) après l'infection (Toueni et al. 2016).

Chez la luzerne cultivée, des études de génétique d'association à partir de 90 accessions issues d'un

croisement aléatoire entre 179 lignées élites ont impliqué divers *loci* dans la résistance au flétrissement verticillien. Deux gènes candidats putatifs de résistance aux maladies NBS-LRR (nucleotide-binding site, leucine-rich repeat) ont été identifiés sur le chromosome 8 dans les intervalles de confiance des QTL de qVW-6D-2 et qVW-8C, respectivement (Yu et al. 2016). Ces deux gènes candidats ont été aussi identifiés chez une population de luzerne contenant 188 descendants F1 développée à partir d'un croisement entre deux plantes parentales de 55V50-118 (sensible, P1) × 55V50-58 (résistante, P2) chez S and WSeeds Company (Nampa, ID, U.S.A.) (Yu et al. 2020). D'autres gènes candidats associés à la résistance au VW ont été identifiés sur le chromosome 7 et un sur le chromosome 2 (Zhang et al. 2014), deux sur le chromosome 6 et un sur le chromosome 7 (Zhang et al. 2014) chez la luzerne qui sont précédemment été signalés chez *M. truncatula* par Ben et al. 2013. Cela suggère des localisations similaires des loci pour la résistance au *V. alfalfae* chez *M. sativa* et *M. truncatula*, permettant ainsi la possibilité de transférer les connaissances acquises chez la légumineuse modèle à la légumineuse cultivée.

2.2.4. Réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques combinés

Dans la nature, des situations de stress multiples sont plus susceptibles de se produire, y compris la chaleur, la sécheresse, la salinité et les attaques de pathogènes (Prasch et Sonnewald 2015), ce qui limite le rendement des cultures. Le résultat dépend de l'intensité et de l'exposition de chaque facteur de stress (Challa et Neelapu 2018). Les recherches ont ouvert la voie à la compréhension de la base moléculaire des effets conjoints des stress biotiques et abiotiques (Ramegowda et Senthil-Kumar 2015).

2.2.4.1. Les plantes répondent différemment à des stress multiples de ce qu'elles font face à des stress individuels

Les réponses des plantes à différents stress sont très complexes et impliquent des changements au niveau transcriptomique, cellulaire et physiologique. Plusieurs études montrent que les plantes répondent à des stress multiples différemment de ce qu'elles font face à des stress individuels, en activant un programme spécifique d'expression génétique lié aux conditions environnementales exactes rencontrées, avec des réponses partagées qui sont communes à des stress individuels (Greco et al. 2012 ; Ramegowda and Senthil-Kumar 2015).

La comparaison des modifications du transcriptome de 10 écotypes d'*Arabidopsis thaliana* en utilisant des traitements au froid, à la chaleur, à la lumière intense, au sel et à la flagelline comme facteurs de stress uniques ainsi que leurs doubles combinaisons a révélé que 61 % des modifications du transcriptome en réponse à des stress doubles n'étaient pas prévisibles sur la base des réponses à des traitements de stress simples, et que les plantes établissaient un ordre de priorité entre les réponses potentiellement antagonistes et les réponses transcriptomiques (Rasmussen et al. 2013).

L'exposition des plantes aux stress combinés induit des voies de transduction de signaux en interaction (Mittler 2006). L'interaction entre ces voies peut être neutre, additive, synergique ou conduire à de nouvelles réponses imprévisibles (Prasch et Sonnewald 2015 ; Rasmussen et al. 2013). Dans la plupart des cas, les réponses des plantes aux stress combinés s'écartent des réponses aux stress uniques.

Chez le maïs, la réponse des plantes aux stress combinés est distincte de celle des plantes soumises à un stress de sécheresse ou de sel seul, tant au niveau métabolique que physiologique. Cette réponse s'est caractérisée par une augmentation de la teneur en N, une diminution de la teneur en C, de la photosynthèse et de la production de biomasse, ainsi que par un nouveau schéma de réponse métabolique complexe reliant ces réponses physiologiques (Sun et al. 2015).

La combinaison de deux facteurs de stress peut avoir un effet négatif et additif sur les plantes, le second stress étant celui qui entraîne des dommages plus importants (Suleman et al.2001). Cependant, dans la plupart des cas, plutôt que de s'additionner à l'effet d'un stress biotique, la présence d'un stress abiotique peut avoir pour effet de réduire ou de renforcer la sensibilité à un parasite ou à un pathogène, et vice-versa. Atkinson et Urwin (2012) ont noté que dans de nombreux cas l'exposition des plantes au stress abiotique affaiblit la résistance aux maladies, tandis que les infections par des agents pathogènes renforcent souvent les réponses au stress abiotique. Dans certains cas, cette interaction peut conduire à une tolérance croisée et à un renforcement de la résistance d'une plante contre les agents pathogènes (Yasuda et al.2008). Ce phénomène permet aux plantes de s'adapter rapidement à un environnement changeant (Bowler et Fluhr, 2000).

L'analyse des effets de la salinité du sol et du stress hydrique sur la susceptibilité des pistachiers (*Pistacia vera*) à la maladie du flétrissement verticillien causée par *V. dahliae* a révélé que le stress salin augmentait de manière significative la colonisation des jeunes pousses et des racines par le pathogène (Saadatmand et al.2008). En revanche, d'autres études ont montré que le stress abiotique renforce la résistance aux maladies. Ainsi, le traitement thermique sur des feuilles de riz a entraîné une accumulation de radicaux superoxydes et une résistance à la pyriculariose du riz (Aver'yanov et al. 1993). Par ailleurs, le résultat de l'interaction peut dépendre de l'intensité du stress abiotique. Ainsi, l'étude de l'effet d'un pré-traitement au NaCl sur l'interaction entre la tomate et l'oïdium révèle qu'un stress salin léger (50 mM) entraîne une sensibilité accrue alors qu'un stress salin sévère (150 mM) réduit de manière significative les symptômes de la maladie (Kissoudis et al. 2016).

2.2.4.2. Contrôle génétique de la réponse à des stress combinés.

Les études de génétique d'association (GWAS) sont un outil puissant pour étudier des traits multiples ou complexes liés à un stress unique ou multiple. Si des études d'association pangénomique sur diverses plantes/cultures ont permis d'identifier de nouveaux gènes candidats ou des *loci* de caractères quantitatifs,

responsables de la résistance à des stress abiotiques et biotiques simples (Bonhomme et al. 2019 ; Alkemade et al. 2022), à ce jour, encore très peu d'études génétiques portant sur la réponse à des stress combinés et leur comparaison avec la réponse à des stress individuels sont disponibles. Des travaux menés chez le blé soumis à un stress unique et combiné de température élevée et de sécheresse avec 9 646 marqueurs SNP a révélé un contrôle génétique partagé entre la réponse au stress de la température élevée et de la sécheresse combinée et simple. (Qaseem et al.2018). Chez *A. thaliana*, l'étude de GWAS révèle des architectures génétiques distinctes pour les réponses au stress unique causé par la piéride de la rave (*Pieris rapae*) ou en association avec une contrainte abiotique (la sécheresse) ou une autre pression biotique, la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* (Davila Olivas et al.2017).

Les résultats de ces recherches sur le contrôle génétique de la réponse des plantes à des stress combinés, montrant que l'architecture génétique de la réponse à des stress multiples diffère de celle de la réponse à des stress simple, sont des informations précieuses pour ceux qui sélectionnent et conçoivent les futures cultures (Challa et Neelapu 2018). En effet, elles pointent la nécessité de développer des programmes de sélection spécifiques tenant compte simultanément de l'ensemble des contraintes environnementales les plus impactantes en fonction de la région de culture.

2.2.4.3. Régulation moléculaire et hormonale de la réponse des plantes aux stress abiotiques et biotiques combinés

Il est crucial que les plantes perçoivent le stress à temps afin d'y répondre de manière rapide et efficace. Une fois identifié, le stress suscite des réactions spécifiques de la part des plantes (Andreasson et Ellis, 2010), qui entraînent des processus complexes de signalisation de défense pour chaque situation de stress (Abuqamar et al.2009).

L'interaction entre deux types de stress abiotiques et biotiques présente une diaphonie entre leurs voies de signalisation. Cette interaction peut être synergique et/ou antagoniste (Asselbergh et al.2008), et entraîne l'implication de phytohormones ; ABA, SA, JA et ET, de facteurs de transcription (Spoel et Dong, 2008), de cascades de kinases (Nakagami et al.2005) et de ROS (Laloi et al.2004), qui sont des éléments clés de ce dialogue, tout comme les facteurs de choc thermique et les petits ARN (Greco et al. 2012) (**Figure 11**). Ainsi, la réponse adaptée à une combinaison précise de contraintes environnementales est orchestrée par une série de mécanismes moléculaires qui agissent ensemble dans un réseau de régulation complexe incluant les voies de signalisation hormonale qui peuvent s'induire ou s'opposer les unes aux autres.

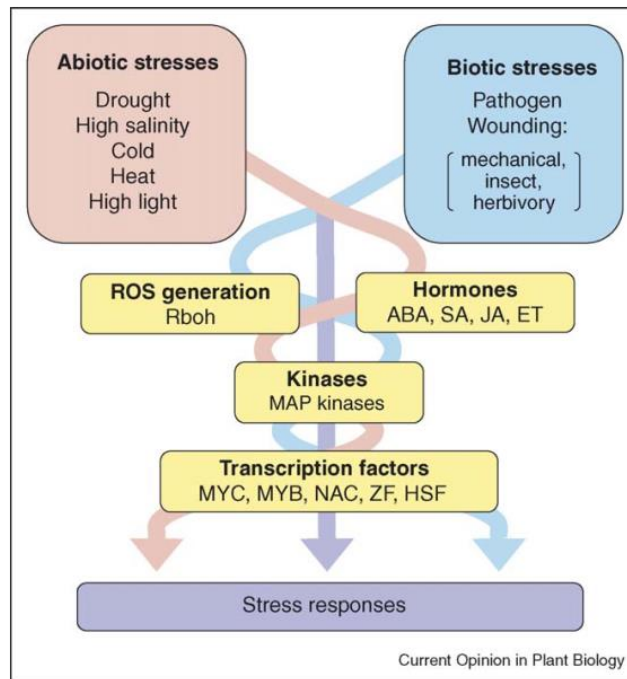


Figure 11: Interaction entre les réponses au stress abiotique et biotique : points de convergence dans les réseaux de signalisation du stress. Source : Fujita et al.2006

Les ROS pourraient être le processus central de médiation de la tolérance croisée entre les deux voies de réponse aux stress abiotiques et biotiques (Greco et al.2012). Les ROS peuvent induire la tolérance en activant des facteurs liés à la réponse au stress tels que les MAPK, les facteurs de transcription, les enzymes antioxydantes, les déshydrines et les protéines induites par les basses températures, les chocs thermiques et la pathogenèse (Gechev et al.2006).

Ainsi, parmi les MAPK, qui sont hautement conservées chez tous les eucaryotes et sont responsables de la transduction du signal de divers processus cellulaires incluant les réponses au stress abiotique et biotique, certaines sont impliquées dans les deux types de stress (Brader et al.2007; Šamajová et al.2013). La signalisation MAPK interagit avec les voies de signalisation ROS et ABA, ce qui renforce la défense des plantes et induit une acclimatation croisée aux stress abiotiques et biotiques (Miura et Tada, 2014).

En ce qui concerne les phytohormones, les dialogues croisés entre les différentes voies de signalisation en réponse à des stress multiples peuvent être de nature diverse. Ainsi, l'ABA est considérée comme la principale hormone impliquée dans la perception de nombreux stress abiotiques (Cramer et al.2011) - même si, dans certains cas, l'ABA s'accumule après l'infection par un pathogène (Ton et al.2009) -, tandis que les réponses aux stress biotiques sont préférentiellement médiées par l'antagonisme entre d'autres hormones de stress telles que SA et JA/ET acide (Liu et al.2008). Dans le cas de stress combinés, l'ABA joue le rôle de régulateur du dialogue entre les stress abiotiques et biotiques (Jensen et al.2008) en agissant principalement comme antagoniste de SA/JA/ET et en induisant ainsi une sensibilité de la plante aux maladies et aux attaques d'herbivores (Robert-Seilaniantz et al.2007). Dans d'autres cas, L'ABA présente une interaction positive avec la signalisation JA/ET et contribue positivement à la défense pré-invasion en étant responsable

de l'augmentation du dépôt de callose (Ton et Jakab, 2007). Enfin, l'activation de la signalisation SA par un pathogène peut atténuer les réponses ABA (Ben Rejeb et al.2014).

Chez *M. truncatula* Jemalong A17, le profil de l'expression génétique et des composés actifs impliqués dans le métabolisme des oxylipines en réponse à des stress simples ou combinés de sel et de blessure de feuilles ou de racines a révélé (i) l'identification de deux nouveaux membres appartenant à la famille de gènes CYP74 , enzymes impliquées dans le métabolisme des hydroperoxydes et jouant un rôle dans les mécanismes de défense directe ou indirecte, (ii) un modèle d'expression spécifique au tissu et au temps pour chaque membre en réponse à des stress simples ou combinés, (iii) un profil hormonal de JA impliquant une réponse systémique atténuée lors de stress combinés au sel et aux blessures des feuilles. Cette étude confirme le rôle important des jasmonates dans l'adaptation des légumineuses aux stress abiotiques et indique l'existence d'une interférence moléculaire complexe entre les signaux générés par des stress multiples (Domenico et al. 2019).

Chapitre 1 : Interaction des microorganismes du sol rhizobium avec le pois chiche sous déficience des sols en phosphore

I. Introduction

Le phosphore (P) est un élément essentiel pour le métabolisme, la croissance et la productivité des plantes. Impliqué dans plusieurs fonctions clés des plantes, notamment la synthèse et la stabilité de l'ADN et de l'ARN, le transfert et le stockage de l'énergie par l'ATP (adénosine triphosphate), la photosynthèse, la transformation des sucres et de l'amidon et le mouvement des nutriments dans la plante, il joue un rôle important dans la productivité des cultures (Gaind, 2017). De même, le P étant un composant fondamental des phospholipides membranaires, une nutrition adéquate en P est nécessaire pour l'intégrité structurelle et fonctionnelle des cellules (Plaxton William, 2015 ; Tiziani et al.2020).

En réponse à la déficience en P, les plantes présentent une série d'ajustements morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires pour améliorer leur capacité d'acquérir du P (Adnane et al.2015 ; Lazali et Bargaz, 2017). Les stratégies bien connues d'adaptation des plantes à la déficience en P comprennent des changements dans l'allocation de la biomasse racinaire, la morphologie des racines, l'exsudation de carboxylate et la symbiose mycorhizienne (Lazali et Bargaz, 2017 ; Wen et al.2020). Une augmentation de la longueur du chevelu racinaire qui améliore les échanges entre les racines et le sol et la surface absorbante pour l'absorption du P (Kohli et al.2020) a également été décrite comme une réponse adaptative à la déficience en P. L'efficacité d'utilisation du P par les plantes est définie par la capacité d'une plante à produire un rendement et une biomasse par unité de P dont elle dispose (Prodhan et al.2019). Une efficacité élevée d'utilisation du P dans les plantes peut être obtenue en : i) améliorant l'acquisition du P à partir de la rhizosphère et/ou ii) en améliorant l'utilisation du P acquis pour produire de la biomasse (Lazali et al.2017 ; Han et al.2022).

Les systèmes agricoles les plus durables et les plus productifs sont ceux dont l'efficacité d'utilisation du P est élevée, où les exportations de P sont équilibrées par des apports de P soigneusement contrôlés, et qui ont des rendements élevés par unité de P absorbée. Cela s'inscrit dans le cadre d'une stratégie d'agriculture à faibles intrants (LIFS) visant à réduire les apports chimiques de N et de P. Par conséquent, l'amélioration des principales cultures pour l'acquisition et l'efficacité d'utilisation du P est une préoccupation importante pour les biologistes et les sélectionneurs des plantes (Lazali et al.2018, Kohli et al.2020).

Les cultures de légumineuses, qui présentent la capacité unique d'établir une symbiose racinaire avec les bactéries rhizobia, ont une demande particulièrement élevée en P en raison de son rôle dans les réactions de transfert d'énergie dans les nodules pendant la fixation de N_2 . La réduction de chaque mole de N_2 par les rhizobia nécessite 16 moles d'adénosine triphosphate (ATP) (Keneni et al.2015 ; Sulieman et Tran, 2015). On estime que jusqu'à 20 % du P total de la plante est attribué aux nodules, principalement pour favoriser l'activité symbiotique. Dans des conditions de limitation du P, les nodules représentent un puits préférentiel

important pour l'incorporation du P au détriment des autres organes de la plante, la teneur en P des nodules pouvant être jusqu'à trois fois supérieure, comme cela a été mis en évidence chez diverses espèces de légumineuses (Suliman et Tran, 2015). La nodulation (y compris le développement des nodules), ainsi que l'acquisition et le métabolisme de l'azote, sont par conséquent inhibés en cas de faible apport en P (Valentine et al.2017b ; Prodhan et al.2019). Notamment, l'effet du P sur l'activité de la nitrogénase du nodule est plus important que l'effet sur tout autre composant de la symbiose (Keneni et al.2015). Les légumineuses sont largement cultivées dans de nombreuses régions semi-arides et tropicales du monde où la déficience en P menace gravement la productivité des cultures (Drevon et al.2015 ; Abdelrahman et al.2018). La limitation de la fixation symbiotique de l'azote due à la déficience en P bloque le développement d'une agriculture durable qui va de pair avec une utilisation réduite des engrais chimiques, notamment dans les sols méditerranéens (Lazali et Bargaz, 2017). La réponse adaptative du métabolisme des nodules à la déficience en P est donc cruciale pour améliorer l'efficacité symbiotique dans des conditions de déficience en P (Pang, Ryan, et al.2018). Les différences de réponses de nodulation à la déficience en P semblent être liées à l'espèce de légumineuse, au génotype de la plante, à la souche de rhizobium et aux interactions de ceux-ci avec les conditions de culture, y compris l'environnement bio-physique et les pratiques de gestion (Varshney et al.2021). L'amélioration de l'efficacité de l'utilisation du P pour la nodulation des légumineuses est un défi mondial face à une population mondiale croissante et à une raréfaction des réserves naturelles de phosphate (Pang et al.2018b).

Le pois chiche (*Cicer arietinum L.*) est globalement la troisième légumineuse alimentaire la plus importante après le haricot commun et le soja (Varshney et al.2021). Le pois chiche peut fixer 60 à 80 % de ses besoins en azote (Giller, 2018) soit 60 à 176 kg N ha⁻¹ (Khaitov et al.2018). Il est considéré comme un grand fixateur de N (Alem et al.2016), à condition que l'environnement naturel soit propice à une fixation symbiotique efficace. La fixation biologique hautement bénéfique de N₂ fait du pois chiche un composant de culture particulièrement attrayant pour soutenir le LIFS. Cependant, comme il est principalement cultivé comme une culture pluviale après la saison des pluies sur des sols marginaux avec des caractéristiques physiques et une fertilité médiocre, la productivité du pois chiche est souvent faible en raison de la déficience en nutriments minéraux dans les sols (Ullah et al.2020).

La déficience en P, qui entraîne des pertes de rendement de 29 à 45 %, a été désignée comme l'un des stress abiotiques les plus préjudiciables à cette légumineuse alimentaire vitale (Zerihun, 2017). Pour pouvoir se développer et être hautement productif dans un environnement aussi contraignant, l'acquisition des nutriments par le pois chiche doit être efficace. Bien que le pois chiche se caractérise par des racines étendues et des quantités significatives d'acides organiques, tels que les exsudats de carboxylate, qui solubilisent le P du sol (Krasilnikoff et al.2003), l'efficacité de l'absorption et de l'utilisation des nutriments est associée aux génotypes des cultures, entre autres facteurs (Srinivasarao et al.2006).

Les objectifs de cette étude menée dans des conditions de terrain à faible teneur en P étaient d'examiner

l'étendue et le modèle des relations entre les traits, et la variabilité génétique en particulier pour l'efficacité de l'absorption et de l'utilisation du P et les traits agronomiques critiques liés à la croissance, la nodulation et au rendement des plantes. L'analyse a été réalisée au sein d'un ensemble de sept cultivars de pois chiches commercialisés et largement cultivés dans la région agricole Algérienne d'Ain Defla. Nos principaux objectifs étaient de contribuer à (i) une meilleure compréhension de la relation quantitative entre le PUE, les capacités de nodulation et les performances de productivité et de germination, en interaction avec l'environnement pédo-climatique et (ii) au développement de cultivars de pois chiches efficaces et tolérants à faible teneur en P permettant la mise en œuvre de pratiques agricoles durables et écologiques tout en tirant le meilleur parti des sols marginaux. Nous proposons que notre approche puisse contribuer à établir un raisonnement pour initier un programme de sélection ciblé visant à améliorer la tolérance à la déficience en P de cette culture de légumineuses très importante.

2. Matériel et méthodes

2.1. Description de la région d'étude et des sites expérimentaux

L'étude est menée en plein champ durant deux campagnes agricoles 2018 et 2019 à Boumadfaa (latitude 36°21'23,5 "N et longitude 2°29'16,5 "E campagne 2018, latitude 36°21'48,4 "N et longitude 2°27'46,9 "E campagne 2019 ; **Figure 12-A**) dans l'agro-écosystème du Haut Chellif dans la région d'Ain Defla au Nord-Ouest de l'Algérie. Cette zone a été sélectionnée pour sa grande production de pois chiches en rotation avec les céréales. Les deux sites expérimentaux sont caractérisés par un sol limono-argileux. Cette région agricole est bien documentée pour la faible disponibilité en P et en N de ses sols (Lazali et al.2021).

Pour les deux sites d'études, neuf échantillons de sol aléatoires ont été collectés avant la mise en place des essais selon un échantillonnage standard en zigzag à 0-30 cm avec une tarière et conservés à 4 °C avant d'être analysés. Les échantillons de sol ont été broyés et tamisés à travers un tamis de 2 mm pour obtenir la fraction fine du sol afin d'identifier les propriétés physiques et chimiques du sol.

La région est caractérisée par un climat méditerranéen semi-aride ; des hivers humides et des étés chauds et secs. Les précipitations (mm) et les températures maximales et minimales de l'air (C°) ont été enregistrées quotidiennement pendant les expériences des deux campagnes agricoles (**Figure 12-B**). L'indice de sécheresse de différence normalisée (NDDI) (Gu et al.2007) a été calculé (**Figure 12-C**). Le NDDI est un indice combiné de l'état de la végétation dérivé de la télédétection qui s'est avéré plus sensible à la sécheresse dans des conditions agricoles par rapport à d'autres indices de sécheresse (Du et al.2018). Il est appelé indice combiné car il est dérivé en tant que différence normalisée de deux autres indices satellitaires : l'indice de végétation à différence normalisée (NDVI) qui est un indicateur de la santé ou de la verdure de la végétation, et l'indice d'eau à différence normalisée (NDWI) qui est un indicateur de la teneur en humidité du couvert végétal.

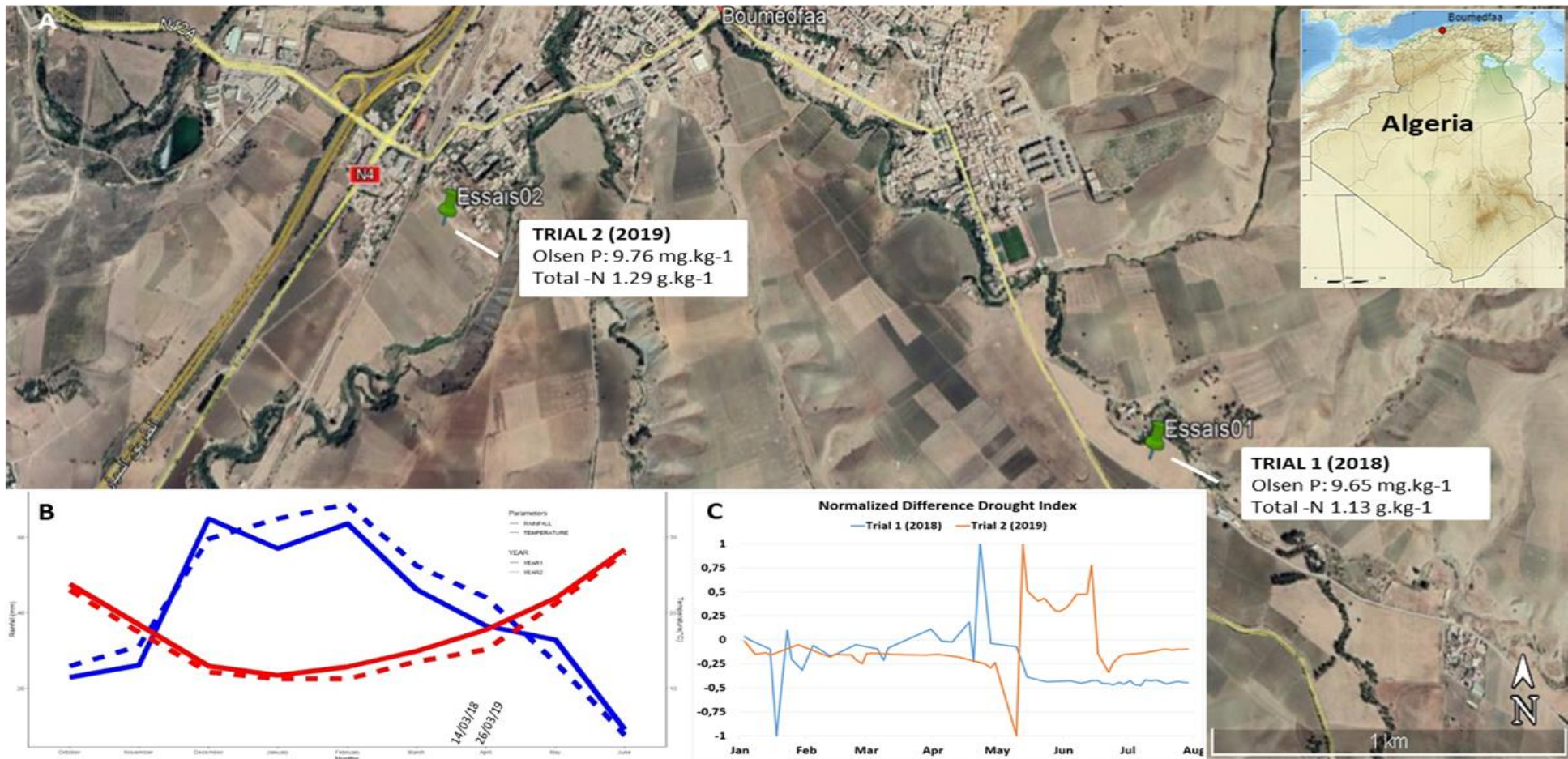


Figure 12 : Description géographique et pédoclimatique des sites expérimentaux en plein champs. Localisation des sites expérimentaux pour les deux campagnes agricoles (2018 et 2019) à Boumadfaa, Algérie.

(A) Les teneurs en azote total (N) et en phosphore biodisponible (P d'Olsen) du sol sont indiquées pour les deux essais. Des informations plus détaillées sur les caractéristiques du sol sont disponibles dans le Tableau 2. Diagramme ombrothermique pendant les deux saisons de croissance, 2018 (ligne pleine) et 2019 (ligne pointillée). (B) Les précipitations mensuelles (mm) (bleu) et les températures moyennes de l'air (°C) (rouge) enregistrées dans les conditions de terrain sont représentées avec l'échelle des précipitations = 2 × l'échelle des températures. Les dates de semis pour les deux saisons de culture sont indiquées en italique. (C) Indice de différence de sécheresse normalisé (NDDI). Un NDDI positif signifie une sécheresse, un NDDI négatif signifie l'absence de sécheresse.

Pour cette étude, la plateforme informatique en nuage Google Earth Engine (GEE) [<https://earthengine.google.com>] a été utilisée pour calculer les trois indices. Les données multispectrales de la plateforme satellitaire Sentinel 2 de l'Agence spatiale européenne, avec une résolution spatiale de 20 m et une résolution temporelle de 10 jours, ont constitué les données sous-jacentes pour le calcul des indices. Les images Sentinel au-dessus des zones étudiées, du début de l'année jusqu'à la fin de la récolte (juillet), ont été filtrées pour éliminer celles dont plus de 30 % des pixels sont couverts par des nuages. Les trois indices sont calculés comme suit :

$$NDVI = \frac{NIR - Red}{NIR + Red} = \frac{B8 - B4}{B8 + B4} = \frac{\rho_{800} - \rho_{670}}{\rho_{800} + \rho_{670}}$$

$$NDWI = \frac{SWIR - Green}{SWIR + Green} = \frac{B11 - B3}{B11 + B3} = \frac{\rho_{1600} - \rho_{560}}{\rho_{1600} + \rho_{560}}$$

$$NDDI = \frac{NDVI - NDWI}{NDVI + NDWI}$$

D'ou

NIR: Near-Infrared band

SWIR: Short-wave Infrared band

Red, Green: Red and Green bands

B#: Numéro de bande propre à Sentinel 2 et ρ_w : Longueur d'onde de la bande dans le spectre électromagnétique.

Les valeurs NDDI calculées ci-dessus sont ensuite mises à l'échelle de l'intervalle [-1, 1] pour une meilleure compréhension.

2.2. Mise en place des essais : Matériel végétal et plan expérimentale

Des prospections au niveau des stations de l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) en Algérie nous a permis de collecter dix-sept géotypes de pois chiche originaire de l'ICARDA (**Tableau supplémentaire 2**). L'étude a été menée avec sept géotypes, qui sont actuellement les plus cultivés par les agriculteurs au niveau de l'agroécosystèmes de Ain Defla (**Tableau 1**), avec des des caractéristiques agronomiques distinctes.

Tableau 1. Noms et généalogies des sept géotypes de pois chiches étudiés

Non du géotype	Autre Nomination	Pedigree
ILC32-79	ILC32-79	/
GHAB5	FLIP88-85C	X85 TH143/ILC 629 x FLIP 82-144C
	Ain Zada	
FLIP97-677C	Souagui	X94TH12/FLIP90-132CXS91347
FLIP90-13C	Seraidi	S90017((Pl.Se.Be. 81-40 x ILC 195) x FLIP 84-46C)
FLIP84-92C	Beni Chograne	ILC 72 x ILC 215
GHAB4	FLIP93-93C	X89TH258/ (FLIP 85-122CXFLIP 82-150C)/FLIP 86-77C
	Oued Rhumel	
FLIP01-29 C	FLIP01-29 C	X98TH28-1BH-17(FLIP92-148 x S96233)

Les graines ont été semées manuellement en mars avec une densité de semis de 30 graines par m², un espacement de 20 cm entre les plantes et de 25 cm entre les rangs, suivant un plan en blocs aléatoires complets (RCBD) avec trois répétitions, chaque bloc étant ensuite divisé en sept microparcelles (**Figure 13**), chaque parcelle étant utilisée au hasard pour l'un des sept cultivars. Les parcelles mesuraient 9 m² (3 m × 3 m) avec un espacement de 1 m des parcelles adjacentes.

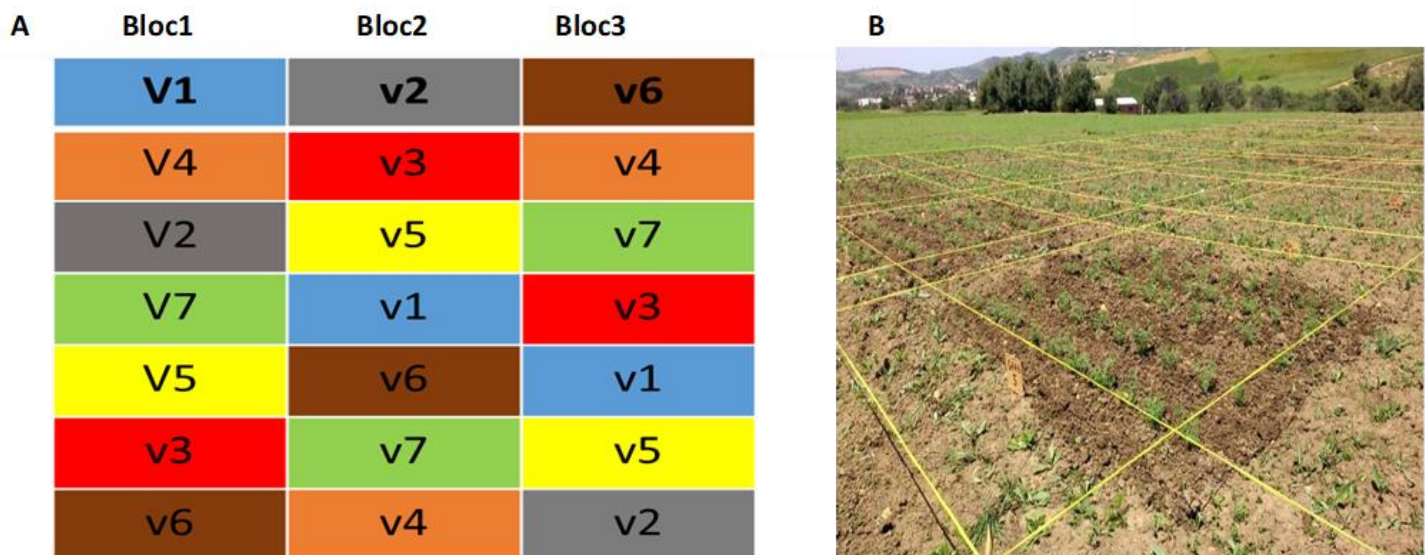


Figure 13 : Dispositif expérimental (A) mis en place sur le terrain pour les deux campagnes agricoles 2018 et 2019 et vue générale de l'essai (Campagne 2018) (B)

Aucun traitement phytosanitaire n'a été appliqué sur les essais expérimentaux, trois désherbage manuelle inter et intra-micro parcelles ont été effectués pour chaque compagne agricoles afin d'éliminer les adventices et favoriser la croissance.

Les deux essais ont été menés en régime pluviale (c'est-à-dire sans irrigation), sans inoculation rhizobienne ni traitement par les engrais. Ces pratiques culturales, réalisées dans les conditions écologiques prévalant à Boumadfaa en Algérie, correspondent à la gestion culturale classique des variétés de pois chiche dans cette région de production.

2.3. Echantillonnage et collecte de données

2.3.1. Diagnostique nodulaire : Évaluation des performances de croissance et de nodulation

Au stade plein floraison le principal stade phénologique au cours duquel les légumineuses fixent la quantité maximale de N par la fixation biologique de N₂ (Latati et al.2014 ; Yong et al.2018) qui correspond à 60 jours après le semis dans notre étude, la première série d'échantillonnage biologiques a eu lieu. Pour chaque saison de culture, six plantes par génotype par bloc ont été récoltées au hasard au niveau des rangs du milieu en creusant soigneusement autour du système racinaire à 20 cm de profondeur (Zhang et al.2020). Chaque plante a été divisée en partie aérienne, racines et nodules. Le sol environnant a été soigneusement retiré des échantillons de racines et de nodules. Tous les échantillons (c'est-à-dire les pousses, les racines et les nodules) ont été séchés pendant 48 heures à 65 °C avant d'être pesés.

2.3.2. Quantification de la teneur en azote et en phosphore dans les nodules, les pousses et la rhizosphère

Les teneurs en N total et en matière organique ont été quantifiées par les méthodes Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) et Walkley-Black (Walkley et Black, 1934) dans la plante (y compris les nodules et les pousses) et la rhizosphère des sept génotypes de pois chiche pour chaque compagne agricole.

Le P biodisponible dans le sol a été quantifié par la méthode Olsen (Olsen et al. 1954). La concentration de P dans la plante (nodules et pousses) a été déterminée par la méthode du vert de malachite après digestion par les acides nitrique et perchlorique en mesurant l'absorbance à 630 nm de longueur d'onde avec un spectrophotomètre (Valizadeh et al. 2003). L'efficacité d'utilisation du P (PUE) pour la fixation de l'azote, définie comme le rapport entre la biomasse du nodule et la teneur en P du nodule, a été déterminée conformément à (Lazali et al.2017).

Pour ces analyses, les six répétitions d'échantillons de sol ou de plantes prélevés pour chaque génotype de pois chiche au stade de pleine floraison dans chaque bloc ont été regroupées. Chaque échantillon groupé a été mesuré trois fois pour chaque élément (N et P).

Les pentes des modèles de régression linéaire entre les poids secs des nodules et des pousses ont été

retenues comme estimateurs de l'Efficacité d'Utilisation de la Symbiose Rhizobienne (EUSR) pour la production de biomasse des pousses avec le N₂ atmosphérique fixé par les nodules (Aydi et al.2004 ; Drevon et al.2015) (**Figure14**). Les intercepts des modèles correspondent à la production de biomasse des pousses sans nodules, c'est-à-dire avec l'azote du sol uniquement.

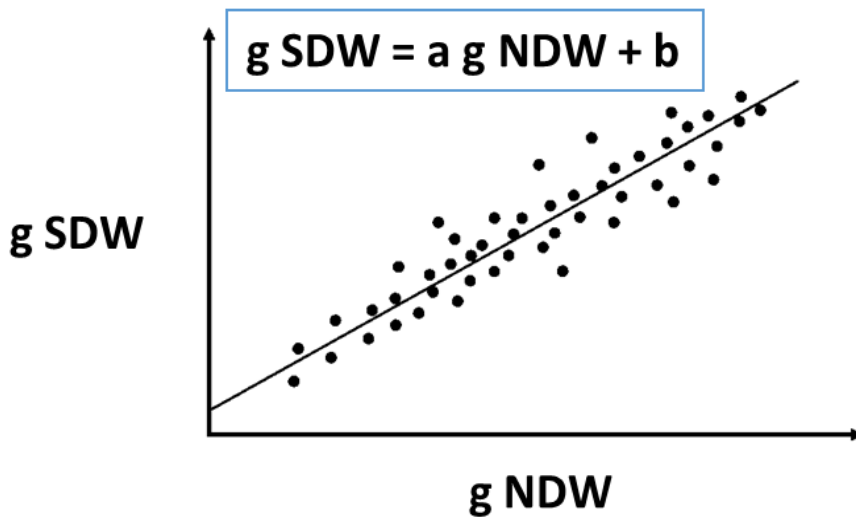


Figure 14 : Illustration de l'estimation de l'Efficacité d'Utilisation de la Symbiose Rhizobienne. (NDW : biomasse nodulaire ; SDW : biomasse aérienne sèche).

2.3.3. Récolte et paramètres de rendements

La deuxième série d'échantillonnage biologique a eu lieu au moment de la récolte à la maturité du grain (**Figure 15**). Le stade optimal de récolte correspond à 9 -11% d'humidité du grain, ce qui correspond à la maturité physiologique du grain. Le rendement de la culture a été déterminé sur 1m linéaire avec six échantillons par génotype par bloc pour chacune des deux saisons de culture, en excluant les rangs de bordures. Les composantes du rendement en grain évaluée : le nombre de gousses et de graines ainsi que le poids de 100 graines en grammes.



Figure 15: Stade maturité du grain campagne 2018.

2.3.4. Test de germination des graines *in vitro*

La faculté de germination des graines a été évaluée à partir des graines récoltées lors des deux essais au champ en 2018 et 2019. Pour chaque génotype de pois chiche et chaque saison de culture, le taux de germination de quatre-vingt-dix graines a été évalué par un test *in vitro* réalisé dans des boîtes de Pétri avec du papier filtre imbibé d'eau stérile en trois répétitions biologiques selon un dispositif en bloc aléatoire complet avec trois blocs (chaque répétition comptant trois boîtes de Pétri contenant dix graines). Les graines ont été désinfectées avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,96 % pendant 6 minutes, puis lavées 4 fois avec de l'eau distillée stérile. Elles ont été mises à germer à température constante à 25 °C à l'obscurité. La germination des graines a été suivie pendant 5 jours de culture, consistant à compter quotidiennement le nombre de graines ayant une racine saillante (**Figure 16**).

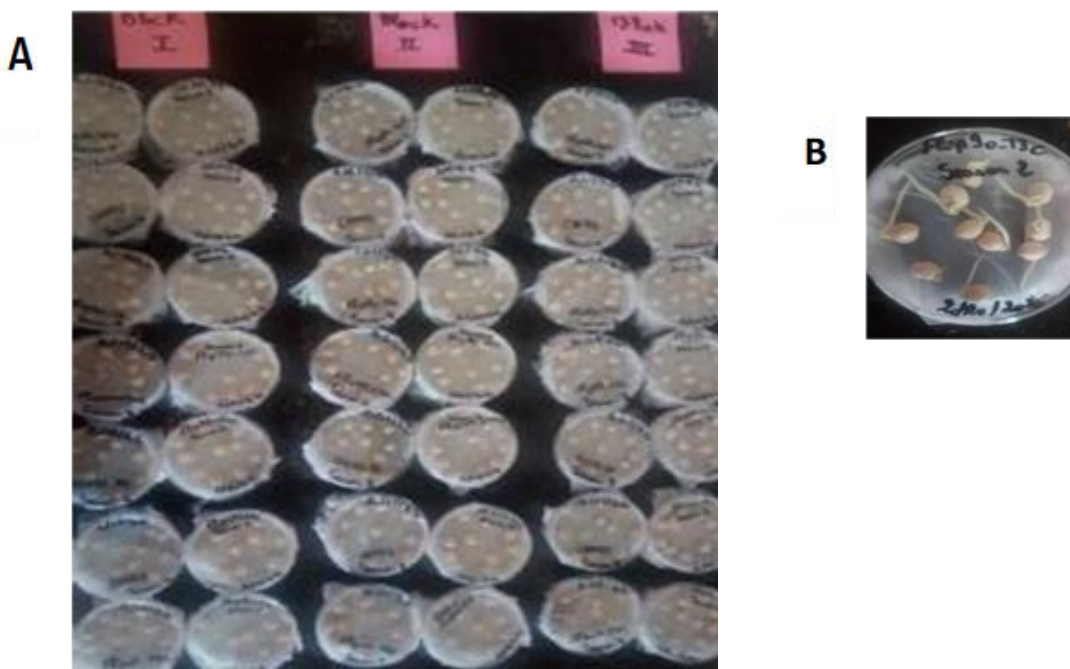


Figure 16 : Test de germination *in vitro* (A) les graines germées à la fin de l'expérimentation (après 5 jours)

2.4. Analyses statistiques

Toutes les données collectées à partir des essais sur le terrain ont été soumises à une ANOVA à deux facteurs avec une interaction entre les génotypes de pois chiches et les saisons de culture et le bloc emboîté dans les saisons de croissance comme effets fixes, selon le modèle suivant :

$$Y_{ijk} = \mu_{\text{trait}} + \text{Genotype}_i \times \text{Year}_j + \text{Block}_k(\text{Year}_j) + \varepsilon_{ijk}$$

Pour homogénéiser les variances et normaliser les résidus de l'ANOVA, des transformations de données ont été appliquées lorsque nécessaire. L'analyse a été effectuée à l'aide de la fonction `aov` du logiciel statistique R 4.1.0 (R Core Team, 2021). Les comparaisons de moyennes multiples ont été effectuées à l'aide de tests de Tukey (comparaisons par paires) à une P value $\leq 0,05$ en utilisant la fonction `HSD.test` du package R

multcomp.

Les données des essais de germination des graines in vitro ont été analysées à l'aide d'un modèle linéaire généralisé ajusté par le maximum de vraisemblance et utilisant une famille binomiale (logit). Le modèle mis en œuvre est le suivant :

$(\text{Nb_germinated_seeds}, \text{Nb_No_germinated_seeds}) \sim \text{Genotype} * \text{Year} + (1 | \text{Block_Repeat})$

Où le génotype, l'année et leur interaction sont considérés comme des effets fixes et l'effet Blocks niché dans les trois répétitions biologiques indépendantes comme un effet aléatoire. L'analyse a été effectuée à l'aide de la fonction glmer du package R lme4.

La relation entre le poids sec des pousses (SDW) et le poids sec des nodules (NDW) a été tracées par une analyse de régression linéaire avec la fonction ggscatter du package R ggpubr. Les graphiques de corrélation, l'Heatmap et l'ACP ont été obtenus en utilisant respectivement la fonction pairs panels du paquet psych, la fonction heatmap.2 du paquet gplots et la fonction fviz_pca_biplot du paquet factoextra du logiciel R.

3. Résultats

3.1. Le stress dû à la déficience en P affecte différemment certains traits fonctionnels de croissance et de nodulation chez les cultivars de pois chiche, indiquant différents mécanismes d'adaptation pour maintenir l'efficacité physiologique requise de la plante.

La réponse à la déficience en P a été étudiée par l'évaluation de sept cultivars de pois chiches dans des conditions de champs au niveau de l'agroécosystème Algériens d'Ain Defla pendant deux campagnes agricoles successives (2018 et 2019), dans des sols caractérisés par une faible disponibilité en P (Lazali et al.2021). La région est caractérisée par des précipitations irrégulières, avec une moyenne annuelle comprise entre 350 et 400 mm pendant la période de 2018 à 2019. Les précipitations les plus élevées ont été enregistrées dans la période comprise entre novembre et février. Juin était le mois le plus sec (précipitations moyennes d'environ 9 mm en 2018 et 7 mm en 2019 (**Figure 12-B**). Dans l'ensemble, comme le révèle l'indice de différence de sécheresse normalisé (NDDI), la période de sécheresse a été plus longue en 2019, notamment à la fin du cycle de culture, de la floraison à la mi-mai jusqu'à la récolte au début du mois de juillet (**Figure 17-C**).

Les analyses du sol effectuées à la date du semis ont révélé de faibles niveaux de P biodisponible dans le sol (Olsen P <10 mg kg⁻¹) et des niveaux moyens de N (1 g kg⁻¹ < N total < 1,3 g kg⁻¹) en 2018 et 2019 respectivement (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Propriétés granulométriques et chimiques du sol des deux campagnes agricoles 2018 et 2019

	Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	pH	CaCO ₃ (%)	M Organique (%)	P-Total (mg.kg-1)	P Olsen (mg.kg-1)	N-Total (g.kg-1)
Saison 1	38.67	43.8	18.5	8.11	26.15	1.45	234.13	9.65	1.13
Saison 2	38.12	35.1775	26.7025	8.225	24.515	1.395	214.25	9.7575	1.295

L'analyse comparative des performances des cultivars basée sur ces caractéristiques agronomiques et physiologiques peut donner des indications sur les différentes stratégies des cultivars pour s'adapter à cette contrainte environnementale. Des interactions statistiques significatives entre les géotypes de pois chiche et les saisons de culture sont rapportées pour le poids sec des racines (RDW), le poids sec des nodules (NDW) et le nombre de nodules (NN) (**Tableau 3**).

Ainsi, tous les géotypes de pois chiche ne présentent pas la même réponse phénotypique à l'environnement changeant. Cela suggère l'existence d'une plasticité phénotypique pour la réponse au stress de la déficience en P au sein des sept cultivars de pois chiche. Certains cultivars présentent des performances assez stables pour certains traits quel que soit l'environnement de culture, par exemple GHAB5 et FLIP90_13C pour

RDW (**Figure 17-C**) ou ILC32_79 pour NN (**Figure 17-B**). En revanche, d'autres cultivars sont fortement affectés dans leurs performances agronomiques en fonction des conditions environnementales, par exemple FLIP01_29C pour RDW (Figure 13-C) ou FLIP90_13C et FLIP84_92C pour NN (**Figure 157-B**).

Les performances en 2019 étaient significativement plus faibles qu'en 2018 pour la plupart des traits étudiés, à l'exception de SDW. Ceci est particulièrement notable pour les traits liés à la performance de nodulation comme NDW et NN qui ont significativement diminué au cours de la deuxième saison de culture (**Figure 17A, B**). Il est alors intéressant de noter qu'il existe une grande variation génotypique de NN parmi les sept cultivars de pois chiche au cours des deux années, aucune différence statistique de NDW n'a été observée entre les différents génotypes pour chaque année individuelle. Ceci pourrait indiquer un mécanisme d'adaptation conduisant au maintien d'un NDW optimal pour soutenir l'efficacité physiologique des nodules au détriment du nombre de nodules formés. Ce processus adaptatif putatif des plantes pour maintenir un niveau critique d'efficacité physiologique dans un environnement de croissance fortement contraint est également mis en évidence pour le SDW. Pour ce trait, aucune différence significative entre les génotypes ou les saisons de croissance n'a été détectée (**Figure 17-D**), ce qui suggère qu'un tel trait fonctionnel essentiel pour l'efficacité de la photosynthèse n'est pas plastique. Par conséquent, indépendamment des conditions de croissance et de la performance de la nodulation en termes de NDW et de NN, les cultivars de pois chiche soutiennent la croissance de la partie aérienne.

Tableau 3 : Analyse de variance des paramètres de croissance des plantes, et de la nodulation de sept géotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité de phosphore durant deux campagnes agricoles.

Source de variation	DF	SDW (g plant ⁻¹)			RDW (g plant ⁻¹)			NDW (g plant ⁻¹)			NN		
		Mean Sq	F value	Pr(>F)	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Géotypes	6	0.54132	2.7231	0.01415 *	0.025205	2.0937	0.05479 .	0.01741	3.0928	0.006209 **	0.2560	2.6769	0.01566 *
Saison de culture	1	0.02349	0.1182	0.73135	0.235864	19.5926	1.470e-05 ***	2.86168	508.3343	< 2.2e-16 ***	12.6487	132.2470	< 2e-16 ***
BLOCK(saison)	4	0.50777	2.5544	0.03971 *	0.026694	2.2174	0.06786 .	0.03510	6.2346	8.77e-05 ***	0.1925	2.0129	0.09344 .
Géotypes*Saison	6	0.34060	1.7134	0.11862	0.083304	6.9198	8.801e-07 ***	0.01271	2.2570	0.038850 *	0.4432	4.6341	0.00018 ***
Residuals	234	0.19879			0.012038			0.00563			0.0956		

Des expérimentations en plein champ avec 7 géotypes de pois chiche ont été menées dans un plan en blocs aléatoires complets (RCBD) avec 3 blocs durant deux saisons agricoles de 2018 à 2019 dans des sols déficients en P. Les données ont été collectées au stade floraison et analysées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs avec interaction avec le modèle à effets fixes. Pour homogénéiser les variances et normaliser les résidus de l'ANOVA, les transformations suivantes ont été utilisées : (SDW.g.plant)^{0,04}, (RDW.g.plant)^{0,3}, (NDW.g.plant)^{0,1} et (NN)^{0,3}. SDW, Shoot dry weight ; RDW, Root dry weight ; NDW, Nodule dry weight ; NN, Nodule number; DF, degree of freedom; Pr(>F), P-value.

Codes de signification des valeurs P : 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

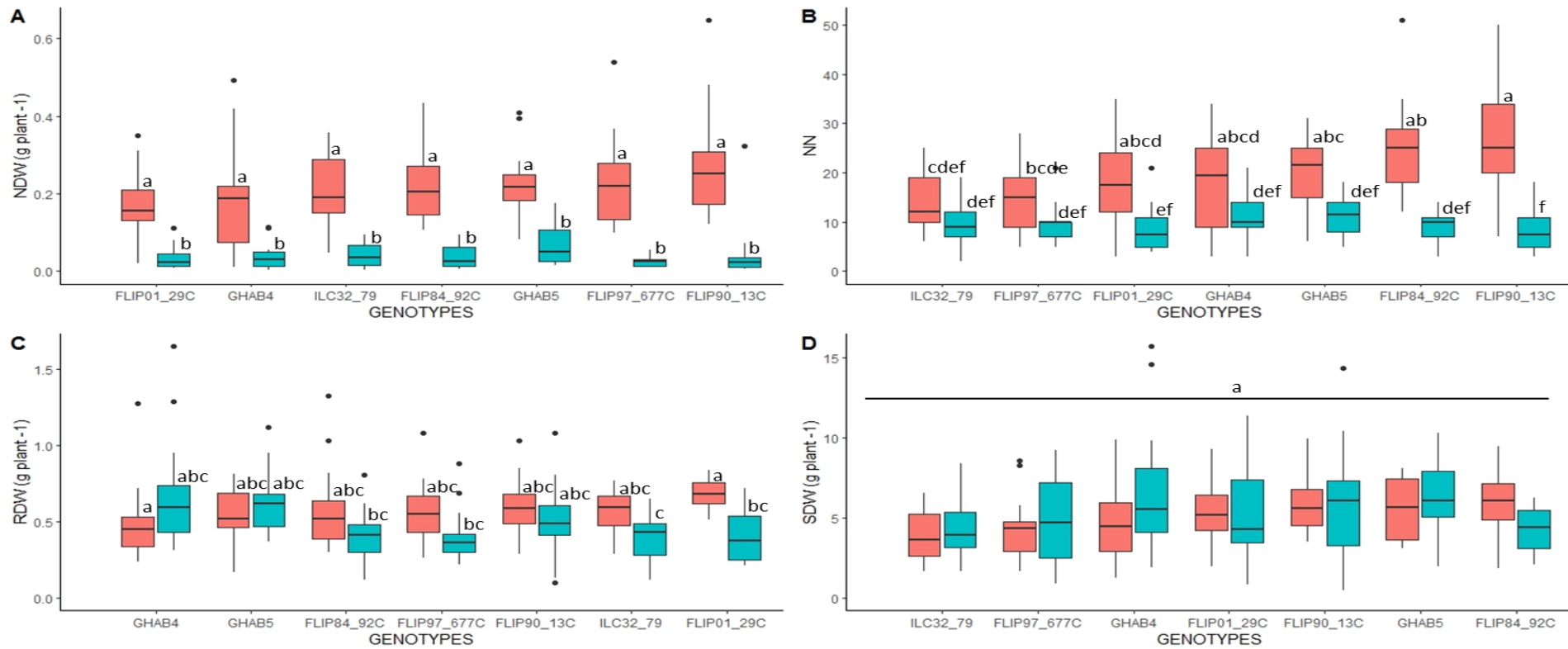


Figure 17 : Évaluation de la croissance végétale et des performances de nodulation de sept cultivars de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité en P pendant deux campagnes agricoles. La biomasse des nodules (A), le nombre de nodules (B) la biomasse les racines et des pousses (C, D) ont été mesurés au stade floraison. Dix-huit échantillons ont été enregistrés pour chacune des deux saisons de culture en 2018 (rouge) et 2019 (bleu). Les lettres identifient les groupes significativement différents selon le test de Tukey pour les comparaisons de moyennes multiples à P = 0,05. NDW, poids sec des nodules ; NN, nombre de nodules ; RDW, poids sec des racines ; SDW, poids sec des pousses.

3.2. La culture dans des sols à faible disponibilité en P modifie différemment les composantes du rendement en grains au sein de sept cultivars de pois chiches, mais n'a pas d'impact sur la germination des graines.

Les composantes du rendement (c'est-à-dire le nombre de gousses et de graines, le poids de 100 graines) et le rendement en grains varient significativement entre les sept cultivars de pois chiches et entre les deux campagnes agricoles (**Tableau 4**) (**Figure 18 A.B et C**).

Des interactions statistiques significatives entre les génotypes de pois chiches et les campagnes de culture ont été signalées pour le nombre de gousses et de graines et pour le rendement en grains, mais pas pour le paramètre du poids de 100 graines (**Tableau 5**).

Il est intéressant de noter que les trois cultivars ayant le plus faible nombre de gousses et de graines, à savoir FLIP01_29C, FLIP97_677C et GHAB5, ont présenté les valeurs de poids de 100 graines les plus élevées (**Figure 18 A-C**). Enfin, les cultivars FLIP97_677C et GHAB5 ont présenté les valeurs de rendement en grains les plus élevées, surtout au cours de la première année (**Figure 18-D**). Le cultivar FLIP84_92C a été le plus sensible aux changements environnementaux entre les deux saisons de culture. En effet, ce cultivar, qui présentait les valeurs les plus élevées pour le nombre de gousses et de graines en 2018, ses performances diminuent significativement en 2019 (**Figure 18-A, B**). Comme attendu, cette diminution des composantes du rendement a eu un fort impact sur le rendement en grains qui présente la valeur la plus faible parmi tous les cultivars en 2019 (**Figure 18-D**).

Tableau 4 : Analyse de variance pour les composantes du rendement en grains de sept géotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité en phosphore

Source de variation	DF	Nombre de gousses			Nombre de graines		
		Mean Sq	F value	Pr(>F)	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Géotypes	6	0.609	5.7221	1.674e-05 ***	0.772	6.1094	6.945e-06 ***
Saison de culture	1	93.711	879.7762	< 2.2e-16 ***	91.405	723.7358	< 2.2e-16 ***
BLOCK(saison)	4	0.305	2.8663	0.02443 *	0.293	2.3174	0.0585975 .
Géotypes*Saison	6	0.594	5.5736	2.346e-05 ***	0.515	4.0756	0.0007107 ***
Residuals	195	0.107			0.126		

Des expérimentations en plein champ avec 7 géotypes de pois chiche ont été menées dans un plan en blocs aléatoires complets (RCBD) avec 3 blocs durant deux saisons de culture de 2018 à 2019 sous un sol déficient en P. Les données ont été collectées au stade maturité en grain et analysées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs avec interaction avec le modèle à effets fixes. Pour homogénéiser les variances et normaliser les résidus de l'ANOVA, les transformations suivantes ont été utilisées : (nombre de gousses)^{0,3}, (nombre de graines)^{0,3}. DF, degré de liberté ; Pr(>F), P value.

Codes de signification des valeurs P : 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Tableau 5. (a) Analyse de variance pour le rendement en grains de sept géotypes de pois chiches cultivés sous une faible disponibilité en P.

Source de variation	Rendement en grain (qx/ha)			
	DF	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Géotypes	6	0.631	10.2932	5.379e-09 ***
Saison de culture	1	82.229	1340.4660	< 2.2e-16 ***
BLOCK(saison)	4	0.372	6.0640	0.0001932 ***
Géotypes*Saison	6	0.434	7.0796	2.241e-06 ***
Residuals	108	0.061		

Tableau 5. (b) Analyse de variance pour le poids de 100 graines de sept géotypes de pois chiches cultivés sous une faible disponibilité en P.

Source de variation	Poids de 100 graines (g/100 seeds)			
	DF	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Géotypes	6	1309448	32.1891	2.44e-10 ***
Saison de culture	1	48312	1.1876	0.2866
BLOCK(saison)	4	59857	1.4714	0.2420
Géotypes*Saison	6	43675	1.0736	0.4055
Residuals	24	40680		

Des expériences de terrain avec sept géotypes de pois chiches ont été menées dans le cadre d'un plan en blocs complets aléatoires (RCBD) avec 3 blocs pendant deux saisons de croissance de 2018 à 2019 sous un sol carencé en P. Les données ont été analysées à l'aide d'une ANOVA à deux voies avec interaction avec un modèle à effets fixes. Pour homogénéiser les variances et normaliser les résidus de l'ANOVA, les transformations suivantes ont été utilisées : (Poids de 100 graines (g/100 graines))² et (Rendement en grains (qx/ha))^{0,34}. DF, degré de liberté ; Pr(>F), valeur P. Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

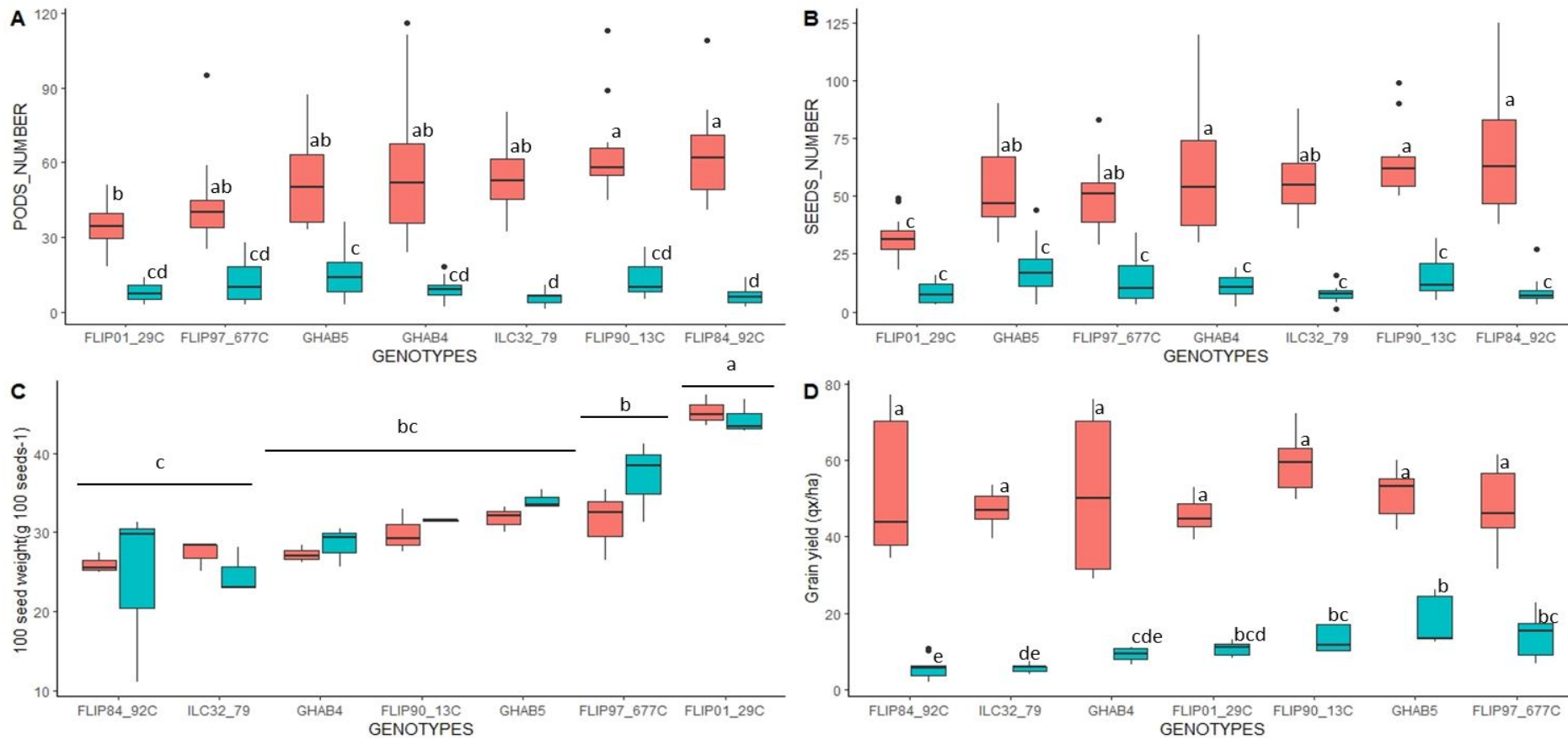


Figure 18: Évaluation des composantes du rendement de sept cultivars de pois chiches cultivés dans des conditions de champ à faible disponibilité en P pendant deux saisons de culture. Les données sur le nombre de gousses (A), le nombre de graines (B), le poids de 100 graines (C) et le rendement en grains (D) ont été enregistrées à partir de dix-huit répétitions pour chacune des deux saisons de culture en 2018 (rouge) et 2019 (bleu). Les lettres identifient les groupes significativement différents selon le test de Tukey pour les comparaisons multiples de moyennes à $P = 0,05$.

De même que les paramètres liés aux traits de nodulation, des performances significativement plus élevées ont été enregistrées en 2018 qu'en 2019 pour tous les traits de rendement, à l'exception du poids de 100 graines ($P < 0,001$, **Tableau 5(a)** et **Figure 18-A, B et C** respectivement). Cependant, bien que ce dernier trait fonctionnel ne varie pas en fonction de la saison de croissance, une différence significative entre les génotypes de pois chiche a été observée ($P < 0,001$), le poids de 100 graines étant le plus élevé pour FLIP01_29C (45 g 100 seeds⁻¹) et le plus faible pour ILC32_79 et FLIP84_92C (26 g 100 seeds⁻¹ et 25 g 100 seeds⁻¹, respectivement) (**Figure 18-C**). Ainsi, alors que le rendement en grain de tous les cultivars de pois chiches étudiés est fortement impacté par des conditions de croissance défavorables, le poids des graines se maintient quel que soit l'environnement de culture. Ceci suggère que les sept cultivars de pois chiches ont déclenché des adaptations physiologiques à un environnement de croissance défavorable en réduisant la production de gousses et de graines tout en assurant un remplissage correct des réserves dans les grains formés. Une telle stratégie adaptative peut maximiser le potentiel de germination pour produire la génération suivante et donc la survie de la population.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé un essai de germination des graines *in vitro*. La germination des graines des sept cultivars de pois chiches a été évaluée à partir de graines récoltées lors des deux essais successifs sur le terrain en 2018 et 2019 (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Évaluation de la faculté germinative des graines récoltées au cours des deux saisons de croissance successives pour les sept cultivars de pois chiche étudiés

GENOTYPES	2018	2019	Taux de Germination Moyen (%)
FLIP01_29C	98.89 (±3.33)	100 (±0.00)	99.45
FLIP84_92C	98.89 (±3.33)	98.89 (±3.33)	98.89
FLIP90_13C	100 (±0.00)	100 (±0.00)	100.00
FLIP97_677C	93.33 (±11.18)	100 (±0.00)	96.67
GHAB4	98.89 (±3.33)	100 (±0.00)	99.45
GHAB5	98.89 (±3.33)	100 (±0.00)	99.45
ILC32_79	98.89 (±3.33)	100 (±0.00)	99.45
Taux de Germination Moyen (%)	98.25	99.84	

La faculté de germination de 90 graines de chaque combinaison Cultivar-Année a été évaluée dans trois expériences indépendantes, chacune d'entre elles étant configurée comme un plan en blocs complets randomisés avec trois blocs. Les valeurs moyennes du taux de germination sont rapportées ainsi que les écarts types des données brutes entre parenthèses.

Les taux de germination allaient de 93 % pour les graines de FLIP97_677C récoltées en 2018 à 99 % et 100 % pour tous les autres échantillons. Aucune différence statistiquement significative du nombre de graines germées n'a été détectée en fonction des génotypes de pois chiche et des saisons culturales (test du rapport de vraisemblance : 4,2415, probabilité du test du chi carré : 0,644). Ce résultat valide notre hypothèse selon laquelle, dans des conditions de faible disponibilité en P, tous les cultivars de pois chiche développent des adaptations biologiques pour maintenir la germination des graines et la production d'une descendance viable.

3. 3. Les variations génotypiques de l'efficacité de l'utilisation de la symbiose rhizobienne et de l'acquisition de l'azote suggèrent que la déficience en P peut entraver de manière différentielle le bon établissement de la symbiose d'une manière qui dépend du cultivar.

Les deux essais expérimentaux ont été menés en plein champs dans des sols caractérisés par une faible disponibilité de P et de N, et aucun traitement d'inoculation rhizobienne ou de fertilisation n'a été appliqué. Ainsi, la croissance et le rendement en grains du pois chiche dépendent entièrement d'une symbiose efficace avec les rhizobiums fixateurs de N₂ atmosphérique. Au moment de l'échantillonnage la nodulation était active, comme le témoigne la couleur rouge des nodules due à la présence caractéristique de la leghémoglobine dans les nodules fonctionnels (**Figure 19**) et l'accumulation de N dans les plantes.

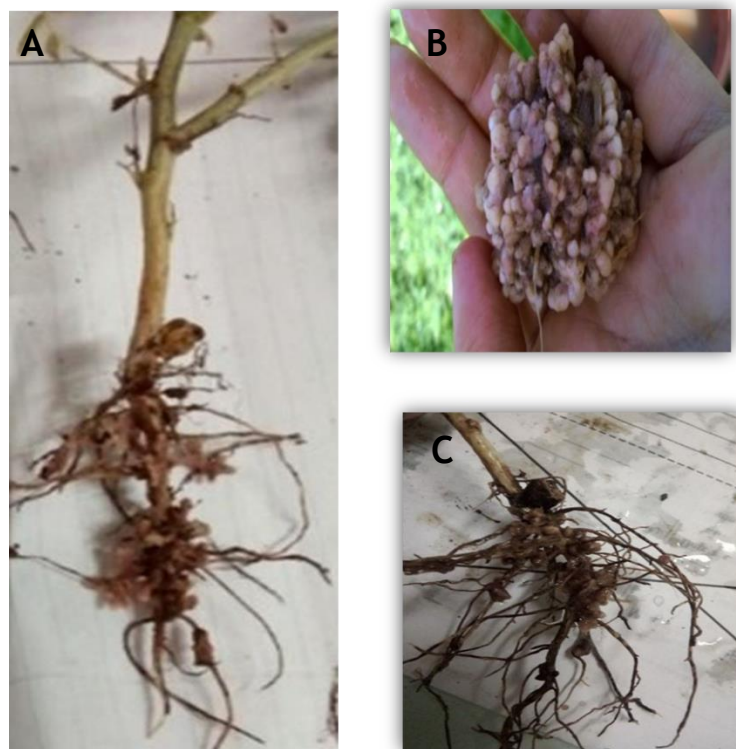


Figure 19 : Nodules fonctionnels comme le témoigne la couleur rouge des nodules due à la présence caractéristique de la leghémoglobine. (A) et (C) nodules FLIP90_1C pendant la saison 2018, (B) nodules ILC32_79 pendant la saison 2019.

Afin d'évaluer la performance de la symbiose et de mieux observer la relation entre la nodulation et la biomasse des parties aériennes, ces dernières ont été tracées en fonction de la biomasse correspondante des nodules. Les pentes des régressions linéaires sont considérées comme une estimation de l'efficacité de l'utilisation de la symbiose rhizobienne (EURS) pour la production de biomasse des pousses avec le N₂ atmosphérique fixé par les nodules (Drevon et al.2015). L'EURS des cultivars testés varie en fonction des saisons de culture (**Tableau 7**). Des corrélations positives significatives entre la biomasse des parties aériennes et des nodules mettant en évidence l'efficacité des nodules pour la fixation de N ont été révélées pour les cultivars GHAB4 et FLIP84_92C en 2018 et ILC32_79 en 2019, indiquant une bonne EURS pour

ces combinaisons génotype / année (**Tableau 7**). L'EURS la plus élevée a été détecté chez les cultivars ILC32_79 pendant la saison 2019 (37 g DSW g⁻¹ NDW), malgré ses faibles NN et NDW (**Figure 20 A, B**). Cela suggère que ce cultivar est capable de maximiser le rapport croissance aérienne/masse de nodules dépendant de N₂ malgré des conditions de croissance défavorables. Enfin, d'autres cultivars tels que FLIP01_29C et FLIP97_677C n'ont pas montré d'EURS significatif dans aucune des deux essais successifs en champ. Nous émettons l'hypothèse que les souches de rhizobia naturellement présentes dans les sols des sites expérimentaux pourraient ne pas convenir aux cultivars de pois chiche FLIP01_29C et FLIP97_677C, car la fixation de N₂ dans la symbiose légumineuse-rhizobia dépend du génotype de la légumineuse, de la souche de rhizobium et des interactions de ces derniers avec l'environnement bio-physique (Giller, 2018).

Tableau 7 : Efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EURS) de sept génotypes de pois chiches cultivés sous une faible disponibilité en P pendant deux campagnes agricoles 2018 et 2019.

Cultivar	2018			2019		
	Equation de la régression linéaire	R	P-value	Equation de la régression linéaire	R	P-value
FLIP01-29 C	SDW = -3NDW+5.9	-0.13	0.6	SDW = -30NDW+6.3	-0.28	0.25
FLIP84-92C	SDW = 11NDW+3.5	0.46	0.085.	SDW = -10NDW+4.7	-0.25	0.33
FLIP90-13C	SDW = 0.29NDW+5.8	0.02	0.93	SDW = 8.7NDW+5.4	0.18	0.47
FLIP97-677C	SDW = 0.75NDW+4.5	-0.046	0.86	SDW = -35NDW+5.7	-0.17	0.49
GHAB4	SDW = 11NDW+2.8	0.46	0.0047 **	SDW = 32NDW+5.4	0.27	0.27
GHAB5	SDW = 6.9NDW+3.9	0.35	0.16	SDW = 7.5NDW+5.8	0.18	0.47
ILC32-79	SDW = 3.6NDW+3.2	0.2	0.42	SDW = 37NDW+2.9	0.61	0.007 **

Les équations décrivent le modèle de régression de la biomasse des parties aériennes en fonction de la biomasse des nodules. Les régressions ont été établies de manière linéaire à partir de dix-huit répétitions récoltées au stade de la floraison pour chacune des deux saisons de croissance. R, coefficient de corrélation ; codes de signification des valeurs P : 0 '****' 0,001 '***' 0,01 '**' 0,05 '*' 0,1 '.' 1.

L'acquisition de l'azote a été évaluée en mesurant la teneur en N des plantes (dans les nodules et les pousses) et dans le sol proche racinaire au stade floraison. Comme attendu pour les légumineuses qui ont la capacité unique de fixer N₂, une corrélation très élevée a été observée entre les teneurs en N des nodules et des pousses alors que des corrélations beaucoup plus faibles ont été trouvées entre ces deux paramètres et la teneur en N du sol (**Figure 20**).

Des interactions statistiques significatives entre les génotypes de pois chiches et les saisons de croissance ont été observées pour la teneur en azote des plantes et du sol (**Tableau 8**).

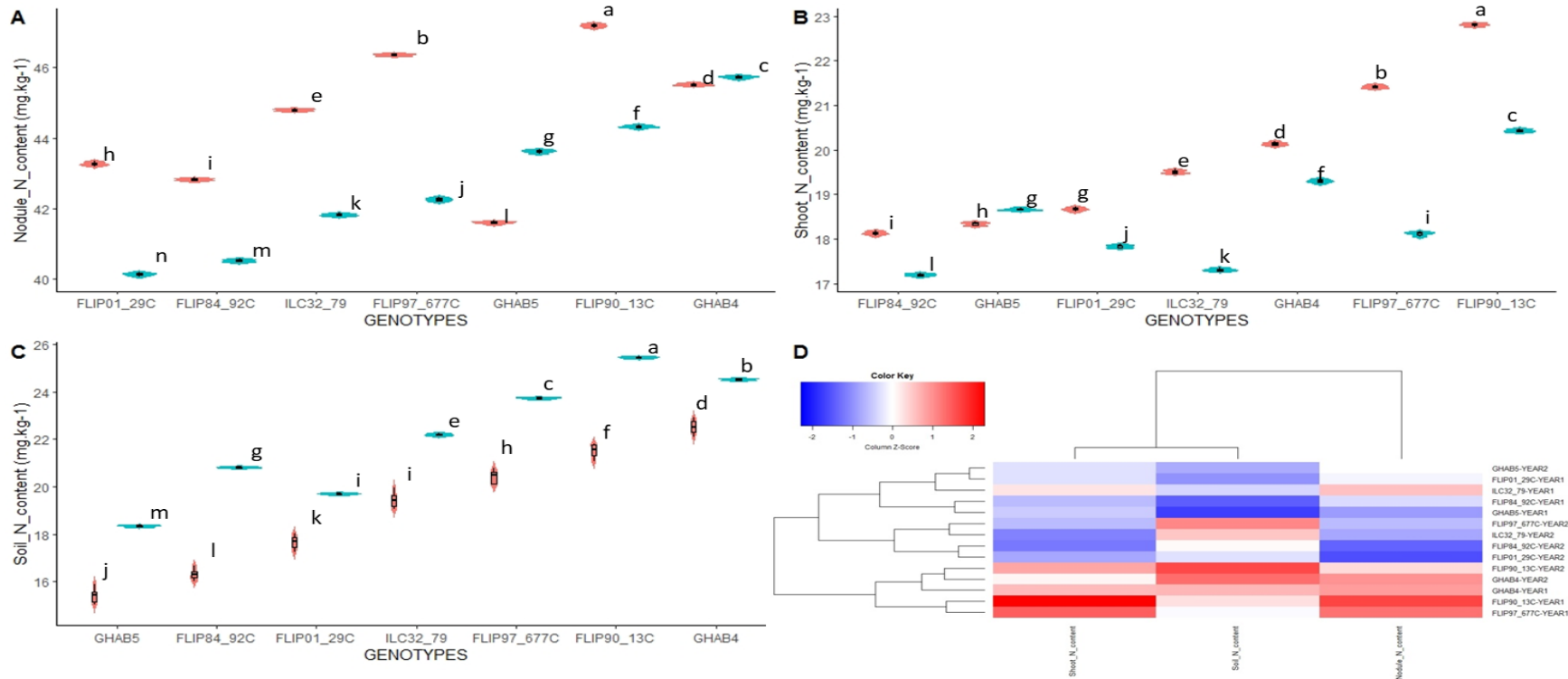


Figure 20 : Évaluation de l'acquisition de l'azote par sept cultivars de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité en P pendant deux saisons de culture. La teneur en azote des nodules (A), des pousses (B) et du sol (C) ainsi qu'un regroupement hiérarchique pour les génotypes de pois chiche basé sur l'acquisition de l'azote (D) sont représentés. Les données ont été enregistrées à partir de neuf répétitions pour chacune des deux saisons de croissance de 2018 (rouge) à 2019 (bleu). Les lettres identifient les groupes significativement différents selon le test de Tukey pour les comparaisons multiples de moyennes à $P = 0,05$. Le regroupement hiérarchique a été calculé sur la base des corrélations de Pearson. Les scores Z ont été calculés et utilisés pour générer la carte thermique. Le dendrogramme de gauche montre les relations entre les génotypes de pois chiches et les saisons de croissance en fonction des différents paramètres d'acquisition de l'azote. Le dendrogramme de la partie supérieure montre les relations entre les paramètres d'acquisition de l'azote en fonction du modèle de performance des génotypes de pois chiches. La couleur rouge indique une valeur élevée et la couleur bleue une valeur faible. Le graphique a été obtenu en utilisant la fonction `heatmap.2` du paquet `gplot` du logiciel R.

Tableau 8: Analyse de variance pour l'acquisition de l'azote par sept génotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité de phosphore.

Source of variation	DF	Nodule N content (mg.kg ⁻¹)			Shoot N content (mg.kg ⁻¹)			Soil N content (mg.kg ⁻¹)		
		Mean Sq	F value	Pr(>F)	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Mean Sq	F value	Pr(>F)
GENOTYPES	6	52.638	70973.88	< 2.2e-16 ***	11.1422	25156.4383	< 2.2e-16 ***	204371	3527.4937	< 2e-16 ***
YEAR	1	110.714	149280.35	< 2.2e-16 ***	22.9032	51709.7873	< 2e-16 ***	501741	8660.1584	< 2e-16 ***
BLOCK(YEAR)	4	0.025	33.63	< 2.2e-16 ***	0.0001	0.1605	0.9578	95	1.6376	0.17
GENOTYPES*YEAR	6	21.229	28624.30	< 2.2e-16 ***	2.3157	5228.3503	< 2.2e-16 ***	7547	130.2669	< 2e-16 ***
Residuals	108	0.001			0.0004			58		

Des expériences de terrain avec 7 génotypes de pois chiche ont été menées dans un plan en blocs aléatoires complets (RCBD) avec 3 blocs pendant deux campagnes agricoles de 2018 à 2019 au niveau des sols déficients en P. Les données ont été récoltées au stade floraison et analysées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs avec interaction avec le modèle à effets fixes. Pour homogénéiser les variances et normaliser les résidus de l'ANOVA, les transformations suivantes ont été utilisées : (teneur en azote des pousses (mg.kg-1))^{0,8}, (teneur en azote du sol (mg.kg-1))².

N, Azote ; DF, Degré de liberté ; Pr(>F), Valeur P. Codes de signification : 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

En général, des teneurs en azote les plus élevées dans les nodules et les pousses ont été mesurées en 2018 qu'en 2019, alors qu'inversement, la teneur en azote du sol était plus élevée en 2019 qu'en 2018 (**Figure 20 A-C**). Ainsi, pour la plupart des cultivars, la capacité à acquérir de l'azote a fortement varié en fonction des conditions environnementales de croissance. Seuls les cultivars GHAB4 et GHAB5 ont présenté des valeurs de teneur en N assez similaires dans les pousses et les nodules au cours des deux années (**Figure 20 A, B**), ce qui indique que ces deux cultivars peuvent maintenir leur capacité à fixer le N₂ atmosphérique dans des environnements changeants. En revanche, en 2018, le cultivar FLIP90_13C a constamment présenté les plus fortes concentrations de N dans les nodules (47,1 mg N kg⁻¹ NDW) et les pousses (22,8 mg kg⁻¹ SDW) et une forte concentration de N dans le sol (25,45 mg kg⁻¹) (**Figure 20 A, B et C**). Le regroupement des génotypes sur la base de leur acquisition de N a montré deux groupes de génotypes, mais n'a pas permis de faire une quelconque différenciation entre les deux saisons de croissance. L'analyse de regroupement hiérarchique a divisé les traits mesurés en deux groupes distincts : le premier groupe comprend la teneur en N des pousses et du sol et le second groupe comprend la teneur en N des nodules (**Figure 20 D**).

Bien que les performances de FLIP90_13C en matière d'acquisition de N aient fortement chuté au cours de la campagne 2019, ses teneurs en N des nodules, des pousses et du sol étaient encore parmi les valeurs les plus élevées. Ainsi, bien que sa capacité d'acquisition de N soit très sensible à l'environnement, ce cultivar reste un bon candidat pour initier un programme de sélection visant à améliorer l'acquisition de N.

Les résultats sur l'EUSR et l'acquisition de N suggèrent que des conditions de croissance stressantes dues à une déficience en P dans les sols peuvent entraver le bon établissement de la symbiose d'une manière dépendante du génotype. En outre, les sept cultivars ne sont peut-être pas tous bien adaptés aux populations de rhizobiums du sol indigène.

3. 4. L'acquisition du phosphore et l'efficacité de son utilisation pour la formation des nodules, deux caractéristiques essentielles pour une croissance optimale du pois chiche dans une agriculture à faible apport en P, sont génétiquement découplées.

La nutrition en P est particulièrement critique pour la croissance et la productivité des cultures de légumineuses en raison de la forte demande en P pour la fixation de N₂ par la symbiose rhizobienne. L'acquisition du P a été évaluée en mesurant la teneur en P des plantes (dans les nodules et les pousses) et le P biodisponible extrait du sol proche racinaire au stade floraison. Comme pour les teneurs en N, une forte corrélation a été observée entre les teneurs en P des nodules et des pousses alors qu'une corrélation plus faible a été observée entre ces deux paramètres et la teneur en P du sol (**Figure 21**).

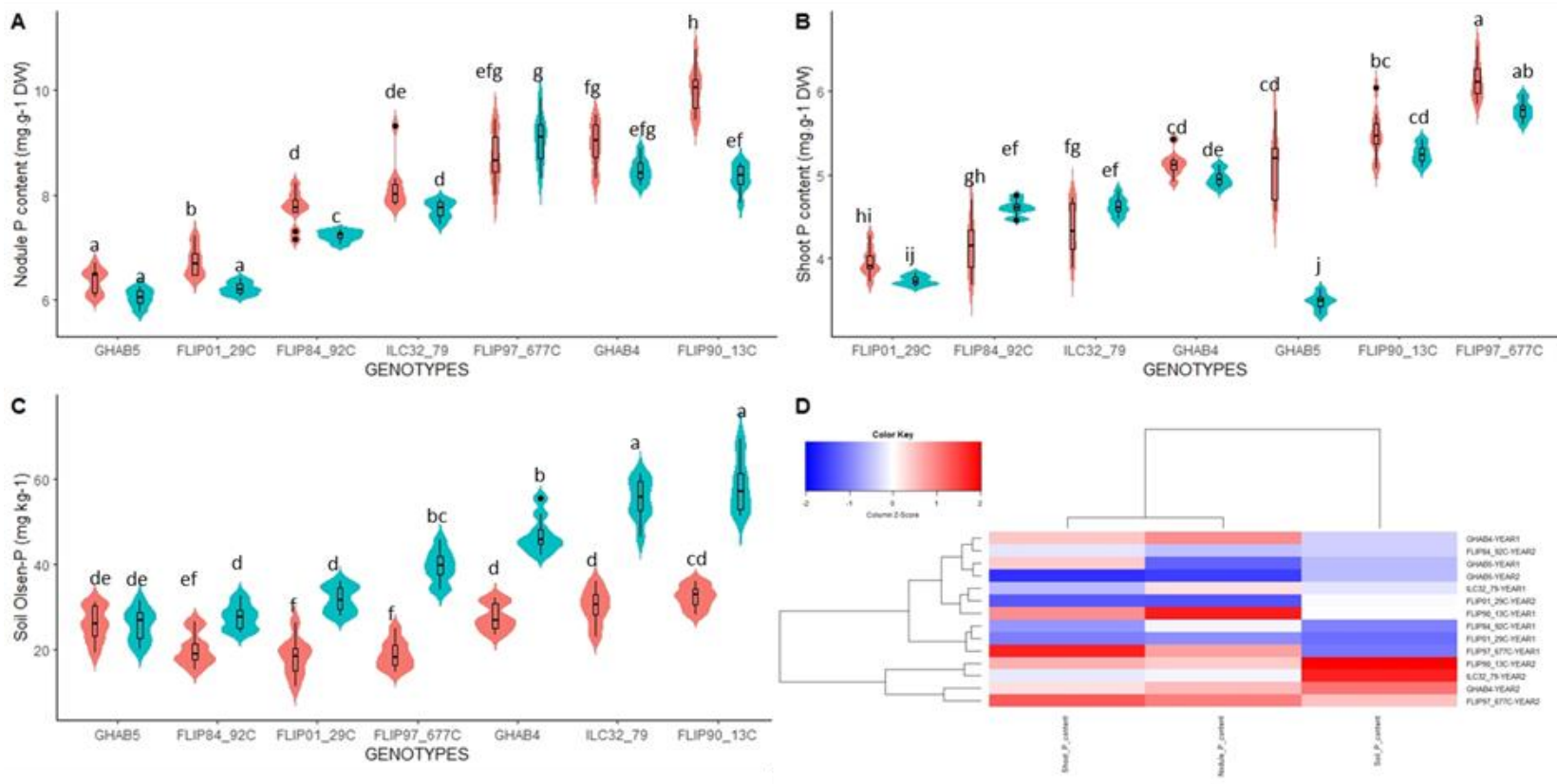


Figure 21 : Évaluation de l'acquisition du phosphore de sept cultivars de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité en P pendant deux saisons de croissance. La teneur en phosphore des nodules (A), des pousses (B) et du sol (C) ainsi qu'un regroupement hiérarchique pour les génotypes de pois chiche basé sur l'acquisition de P (D) sont représentés. Les données ont été enregistrées à partir de neuf répétitions pour chacune des deux saisons de croissance de 2018 (rouge) à 2019 (bleu). Les lettres identifient les groupes significativement différents selon le test de Tukey pour les comparaisons multiples de moyennes à $P = 0,05$. Le regroupement hiérarchique a été calculé sur la base des corrélations de Pearson. Les scores Z ont été calculés et utilisés pour générer la carte thermique. Le dendrogramme de gauche montre les relations entre les génotypes de pois chiches et les saisons de croissance en fonction des différents paramètres d'acquisition du phosphore. Le dendrogramme de la partie supérieure montre les relations entre les paramètres d'acquisition du phosphore en fonction du modèle de performance des génotypes de pois chiches. La couleur rouge indique une valeur élevée et la couleur bleue une valeur faible. Le graphique a été obtenu en utilisant la fonction `heatmap.2` du paquet `gplot` du logiciel R.

Des interactions statistiquement significatives entre les géotypes de pois chiche et les saisons de culture ont été observées pour les trois paramètres ($P < 0,001$, **Tableau 9**), ce qui indique que les sept cultivars n'ont pas tous montré des réponses similaires aux changements environnementaux en ce qui concerne l'acquisition du P. Ainsi, certains cultivars, tels que GHAB4, FLIP97_677C et ILC32_79 ont montré une performance assez stable au cours des deux années pour l'acquisition de P de la plante (à la fois dans les nodules et les pousses) tandis que d'autres, y compris FLIP90_13C, ont montré de fortes altérations de leur contenu en P dans les nodules et les pousses au cours de la deuxième année (**Figure 21 (A, B)**).

Cependant, malgré l'interaction significative de Géotypes X Années, les valeurs de la teneur en P des plantes étaient généralement significativement plus faibles au cours de la deuxième année alors que les valeurs du P biodisponible extrait dans le sol étaient plus élevées (**Figure 21**). Cependant, les valeurs élevées de la teneur en P biodisponible du sol n'étaient pas toujours associées à une teneur en P plus élevée des nodules et des pousses. Dans l'ensemble, ces résultats sont similaires, bien que moins marqués, à ce qui a été décrit précédemment pour les paramètres d'acquisition de l'azote.

Quant à l'acquisition de N, bien que la performance de FLIP90_13C dans l'acquisition de P par les nodules ait diminué au cours de la saison 2019, ses teneurs en P dans les nodules, la pousse et le sol étaient encore parmi les valeurs les plus élevées, ce qui en fait un bon candidat pour initier un programme de sélection visant à améliorer l'acquisition des nutriments P et N en même temps (**Figure 20, 21**). Si on se concentre uniquement sur la capacité d'acquisition du P, les cultivars FLIP97_677C et dans une moindre mesure GHAB4 semblent être deux candidats encore plus intéressants. En effet, malgré la grande différence dans les concentrations de P biodisponible dans le sol au cours des deux années, ces deux derniers cultivars ont constamment montré d'excellentes et stables capacités à acquérir du P dans les nodules et les pousses au cours des deux saisons de croissance (**Figure 21**). Enfin, FLIP01_29C et FLIP84_92C ne sont pas bien adaptés à la croissance dans des conditions de faible teneur en P. Ils ont tous les deux montré une faible capacité à acquérir du P dans les nodules et les pousses et étaient également les moins productifs en termes de nombre de gousses et de graines dans ces sols déficients en P (**Figure 18, 21**).

Pour estimer l'efficacité des plantes à utiliser le P pour la nodulation, le rapport entre la biomasse des nodules et la teneur en P des nodules a été calculé. Le PUE est un critère important à considérer car il est fortement corrélé aux performances des composantes du rendement (c'est-à-dire le nombre de gousses et de graines, **Figure 18**). Le PUE pour la nodulation a varié de manière significative au cours des deux saisons de croissance parmi les géotypes de pois chiche ; aucune interaction GXE n'a été détectée (**Tableau 10 (a)**).

Tableau 9 : Analyse de variance pour l'acquisition du phosphore de sept géotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité de phosphore.

Source de variation	DF	Nodule P content (mg.g ⁻¹ DW)			Shoot P content (mg.g ⁻¹ DW)			Soil P content (mg kg ⁻¹)		
		Mean Sq	F value	Pr(>F)	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Mean Sq	F value	Pr(>F)
GENOTYPES	6	0.00305967	338.8538	< 2.2e-16 ***	0.098244	202.9406	< 2.2e-16 ***	131.32	89.9665	< 2e-16 ***
Saison de culture	1	0.00083471	92.4429	3.509e-16 ***	0.024356	50.3122	1.433e-10 ***	750.15	513.9268	< 2e-16 ***
BLOCK(Saison de culture)	4	0.00001561	1.7293	0.1488	0.000133	0.2755	0.8932	4.08	2.7938	0.02976 *
GENOTYPES*Saison de culture	6	0.00008412	9.3162	3.174e-08 ***	0.024663	50.9460	< 2.2e-16 ***	35.09	24.0433	< 2e-16 ***
Residuals	108	0.00000903			0.000484			1.46		

Des expérimentations en plein champs avec sept géotypes de pois chiche ont été menées dans un plan en blocs aléatoires complets (RCBD) avec 3 blocs pendant deux saisons de croissance de 2018 à 2019 sous un sol déficient en P. Les données ont été récoltées au stade de la floraison et analysées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs avec interaction avec le modèle à effets fixes. Pour homogénéiser les variances et normaliser les résidus de l'ANOVA, les transformations suivantes ont été utilisées : (teneur en P des nodules (mg/g DW))^{-1,3}, (teneur en P des pousses (mg/g DW))^{0,3} et (teneur en P du sol (mg kg⁻¹))^{0,7}. P, Phosphorus; DW, Dry weight; DF, degré de liberté ; Pr(>F), P value. Codes de signification des valeurs P : 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '.' ' 1.

Tableau 10. (a) Analyse de variance pour l'efficacité d'utilisation du P de sept géotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité de P.

Source of variation	DF	P use efficiency		
		Mean Sq	F value	Pr(>F)
GENOTYPES	6	0.0000660	3.0357	0.0236 *
YEAR	1	0.0047073	216.5611	1.645e-13 ***
BLOCK(YEAR)	4	0.0000182	0.8376	0.5148
GENOTYPES*YEAR	6	0.0000106	0.4871	0.8114
Residuals	24	0.0000217		

Des expérimentations en plein champs avec sept géotypes de pois chiche ont été menées dans un plan en blocs complets aléatoires (RCBD) avec 3 blocs pendant deux saisons de culture de 2018 à 2019 sous un sol déficient en P. Les données ont été récoltées au stade de la floraison et analysées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs avec interaction avec le modèle à effets fixes. P, Phosphore ; DF, Degré de liberté ; Pr(>F), Valeur P. Codes de signification : 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '.' ' 1.

Le génotype GHAB4 a présenté la valeur de PUE la plus faible pour la nodulation, tandis que GHAB5 a présenté la valeur la plus élevée (12,4 à 23,1 mg de poids sec de nodule mg⁻¹ de contenu P de nodule, respectivement) (**Tableau 10(b)**). Tous les autres cultivars ont montré des valeurs intermédiaires de PUE statistiquement similaires.

Tableau 10. (b) Comparaison des moyennes multiples de l'efficacité d'utilisation du phosphore de sept génotypes de pois chiches cultivés en champ sous un sol déficient en P sur deux saisons en 2018 et 2019.

GENOTYPES	P use efficiency (mg NDW.mg kg ⁻¹)
GHAB4	0.0124 b
FLIP97_677C	0.0147 ab
ILC32_79	0.0153 ab
FLIP01_29C	0.0154 ab
FLIP90_13C	0.0160 ab
FLIP84_92C	0.0165 ab
GHAB5	0.0231 a

Letters identify significantly different groups according to Tukey test for multiple mean comparisons at P = 0.05.

Nos résultats ont montré que l'acquisition de P et le PUE pour la formation des nodules sont génétiquement découplés (Figure 10). Il est intéressant de noter que le cultivar GHAB5 a montré de manière significative la plus faible capacité à acquérir du P dans les nodules (Figure. 10-A), son bon PUE pour la nodulation indique ses capacités physiologiques efficaces pour convertir cette faible teneur en P des nodules en formation de tissu nodulaire. En tant que tel, il peut être une bonne lignée parentale dans un programme de sélection pour améliorer spécifiquement ce caractère critique pour une bonne performance agronomique dans les systèmes agricoles à faibles intrants.

3. 5. L'analyse fonctionnelle intégrative des traits de croissance et de productivité ainsi que de l'efficacité de la nutrition physiologique de l'azote et du phosphore dans des conditions de faible disponibilité en phosphore indique des candidats prometteurs pour le développement de variétés efficaces dans une agriculture à faibles intrants.

Une analyse de regroupement hiérarchique a été effectuée sur la base de la performance des sept génotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de faible disponibilité en P pendant les deux campagnes agricoles. Les objectifs étaient (i) d'avoir un aperçu de la physiologie ou de l'adaptation aux sols à faible fertilité en P et (ii) de trouver les traits clés pour évaluer la tolérance au stress en P. Quinze traits liés à la croissance des plantes (poids sec des racines et des pousses), les composantes du rendement en grains (nombre de gousses et de graines et poids de 100 graines), l'efficacité de la symbiose rhizobienne (nombre

de nodules, poids sec des nodules, teneur en N des nodules, des pousses et du sol et EUSR) et l'acquisition et l'utilisation du P (teneur en P des nodules, des pousses et du sol et PUE) ont été inclus dans l'analyse (**Figure 22**).

L'analyse de regroupement hiérarchique a divisé les traits mesurés en deux groupes distincts. Le cluster I comprend les traits principalement associés à la croissance des plantes et à la synthèse des tissus. Trois sous-clusters ont été identifiés qui regroupent respectivement (1) PUE avec NDW et RDW ; (2) SDW avec les teneurs en P des plantes (y compris les nodules et les pousses) ; (3) NN avec les teneurs en N des pousses et du sol. EUSR, également inclus dans le groupe I, n'a cependant pas été pris en compte dans les autres paramètres. Le cluster II est principalement associé aux composantes du rendement en grains et est divisé en deux sous-groupes. Le cluster IIa regroupe les deux paramètres très fortement corrélés qui sont le nombre de gousses et de graines, tandis que le cluster IIb relie étroitement le paramètre du poids de 100 graines à la teneur en N des nodules et, dans une moindre mesure, à la teneur en P du sol. Ainsi, le regroupement hiérarchique aide à identifier les relations entre les différents traits et, en tant que tel, donne un aperçu des paramètres corrélés (positivement ou négativement). Cela peut indiquer les traits les plus faciles et les plus utiles à enregistrer, car le phénotypage reste souvent la partie la plus coûteuse de la sélection. Par exemple, NDW est un bon indicateur de PUE (**Figure 21, 22**) ce qui élimine le besoin de quantifier davantage la teneur en P des nodules.

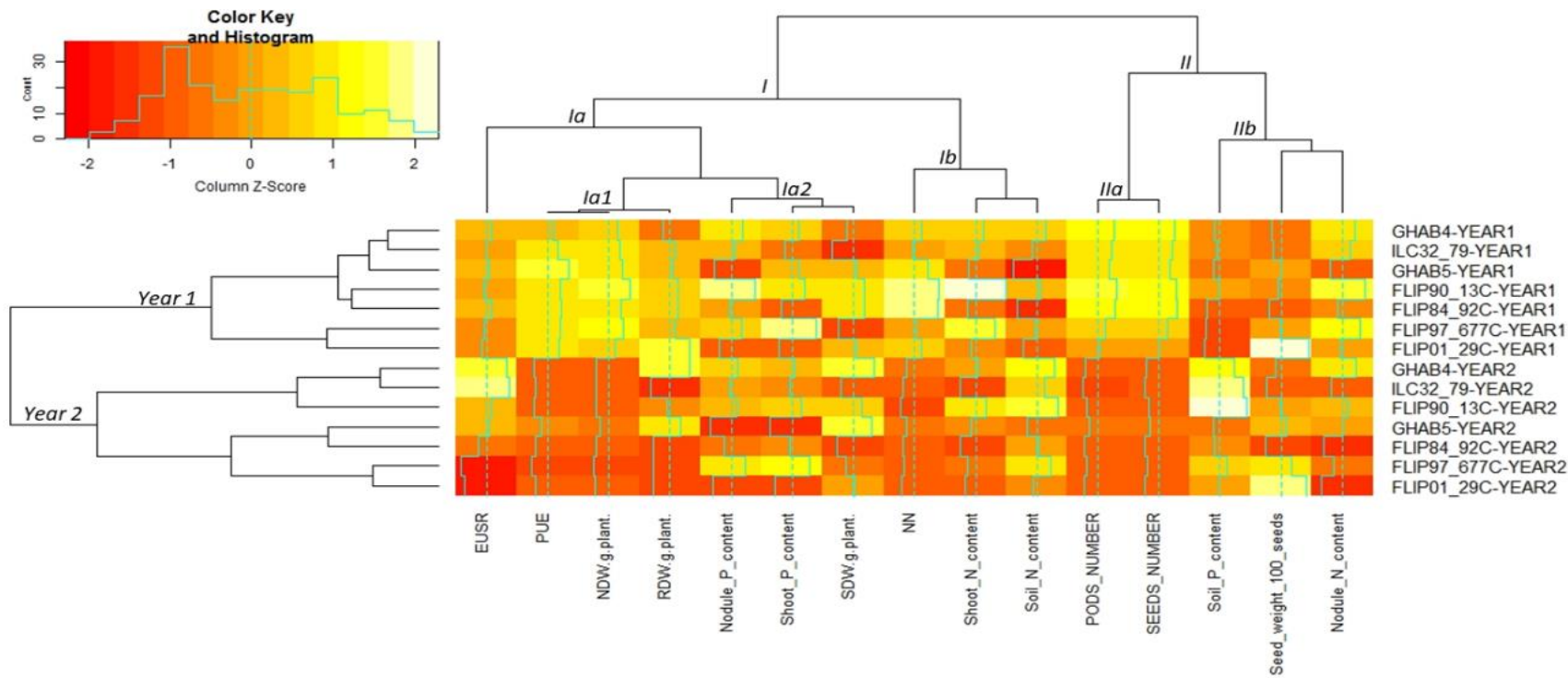


Figure 22. Analyse de regroupement hiérarchique de 15 paramètres fonctionnels des plantes de sept génotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de terrain sous une faible disponibilité de P dans le sol durant deux saisons de croissance de 2018 à 2019. Le regroupement hiérarchique pour les génotypes de pois chiche basé sur la biomasse végétale (SDW, RDW), les composantes du rendement (nombre de gousses et de graines), l'acquisition de nutriments (teneur en P et N dans les nodules et les pousses) et la nodulation (nombre de nodules et biomasse, efficacité de la symbiose rhizobienne) et les paramètres de disponibilité de N et P du sol a été calculé sur la base des corrélations de Pearson. Les scores Z ont été calculés et utilisés pour générer la carte thermique. Le dendrogramme de gauche montre les relations entre les génotypes de pois chiches et les saisons de croissance en fonction des différents paramètres fonctionnels des plantes. Le dendrogramme de la partie supérieure montre les relations entre les paramètres en fonction du modèle de performance des génotypes de pois chiche. La couleur jaune indique une valeur élevée et la couleur orange une valeur faible. Le graphique a été obtenu en utilisant la fonction heatmap.2 du package gplot du logiciel R.

SDW, poids sec des pousses ; RDW, poids sec des racines ; NDW, poids sec des nodules ; NN, nombre de nodules ; PUE, efficacité d'utilisation du phosphore et EUSR, efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne.

Comme attendu, la méthode a clairement distingué les deux saisons de culture (mentionnées comme grappes de l'année 1 et de l'année 2 dans **la Figure 12**) malgré les concentrations assez similaires de N et de P dans le sol enregistrées pendant les deux saisons de culture (**Figure 12-A, Tableau 2**). Ceci suggère que d'autres facteurs environnementaux, probablement liés à la sécheresse (**Figure 12-C**), contribuent à la variation environnementale majeure et façonnent la performance fonctionnelle des plantes sous une faible disponibilité en P. Plus précisément, la deuxième année des essais a été caractérisée par des valeurs plus faibles pour la plupart des traits fonctionnels mesurés, en particulier ceux liés aux composantes du rendement (nombre de gousses et de graines, **Figure 22**, Cluster IIa) et l'efficacité de la nodulation (y compris PUE et NDW, Cluster Ia1 ; NN, Cluster Ib et teneur en N des nodules, Cluster Iib). Inversement, les teneurs en N et en P dans le sol étaient les deux seuls paramètres dont les valeurs étaient plus élevées la deuxième année que la première année (cluster Ib et cluster Iib, respectivement). D'autres traits fonctionnels, principalement liés au développement et au métabolisme des pousses (y compris la teneur en P et le SDW des pousses, cluster Ia2 ; et la teneur en N des pousses, cluster Ib) ainsi que le poids de 100 graines (cluster Iib) ont montré de fortes différences entre les différents cultivars mais des contrastes moins marqués au cours des deux saisons de culture. Ce résultat confirme notre précédente affirmation selon laquelle quelles que soient les conditions environnementales de croissance, les cultivars de pois chiche adaptent leur physiologie et leur métabolisme au profit de la croissance aérienne pour maintenir les capacités photosynthétiques et du remplissage des grains pour assurer la descendance.

Enfin, en ce qui concerne le regroupement des génotypes de pois chiche, deux paires de cultivars très contrastés (GHAB4/ILC32_79 et FLIP97_677C/FLIP01_29C, respectivement) ont été regroupés de manière cohérente au cours des deux années. Un regroupement aussi clair pourrait indiquer une diversité génétique des réponses physiologiques entre ces deux groupes de génotypes contrastés. Bien que leur performance ait été fortement influencée par les variations environnementales, GHAB4/ILC32_79 a montré des valeurs plus faibles du poids de 100 graines mais des valeurs plus élevées de la teneur en N des nodules, de l'EURS et de la teneur en P du sol que FLIP97_677C/FLIP01_29C. Nous avons précédemment révélé dans cette étude que la différence de poids de 100 graines n'avait aucune implication sur la germination et la production de la génération suivante. Ainsi, l'intérêt agronomique particulier de chacun de ces couples de cultivars repose sur d'autres traits fonctionnels liés à l'efficacité d'acquisition et d'utilisation de l'azote et à la capacité de solubiliser le P dans le sol pour produire une source de P biodisponible pour la plante. Sur la base de cette analyse intégrative incluant les 15 traits mesurés, les trois autres génotypes, à savoir GHAB5, FLIP90_13C et FLIP84_92C, ont montré des performances intermédiaires et leur classification a été modifiée en fonction des années.

4. Discussion

De nos jours, les systèmes d'agriculture à faibles intrants (Low Input Farming Systems - LIFS) qui visent à minimiser les intrants chimiques (par exemple, les quantités d'engrais et de pesticides achetés) et à rechercher la plus grande efficacité des ressources agricoles en vue d'une agriculture plus durable sont fortement encouragés par une demande sociétale de pratiques agricoles éco-responsables. Ces pratiques plus respectueuses de l'environnement visent à réduire les coûts de production tout en augmentant la rentabilité des exploitations à court et à long terme et, simultanément, à éviter la pollution des eaux de surface et des eaux souterraines ainsi que les résidus de pesticides dans les aliments (Sarkar et al.2020 ; Cesco et al.2021). Cependant, cette approche est face à plusieurs obstacles et défis qui doivent être surmontés, comme la faible efficacité des cultures dans des environnements limitant les nutriments. Le développement de nouvelles variétés améliorées tolérantes aux contraintes environnementales est l'un des voies les plus prometteuses pour atteindre cet objectif. À cette fin, la compréhension des réponses des plantes et des mécanismes d'adaptation à la déficience en nutriments est donc essentielle pour l'amélioration génétique des cultures économiquement importantes.

En raison de leur capacité unique à fixer l'azote atmosphérique grâce à leur symbiose racinaire avec les rhizobiums, les cultures de légumineuses peuvent enrichir naturellement la teneur en azote du sol, disponible ensuite pour d'autres cultures après les rotations. Par conséquent, elles sont des composantes particulièrement précieuses du LIFS. Parmi celles-ci, le pois chiche, qui est une légumineuse alimentaire importante dans le monde entier, est un fixateur d'azote élevé bien connu et donc un candidat encore meilleur pour aider à améliorer la performance d'un tel système agricole contraint. Cependant, la productivité du pois chiche est souvent fortement affectée par les nutriments limitants dans le sol, la déficience en P étant l'une des contraintes les plus sérieuses. La déficience en P provoque une série de changements dans les plantes qui affectent négativement les caractéristiques agronomiques souhaitables telles que la biomasse végétale et le rendement (Oukaltouma et al. 2020).

Dans cette étude, nous comparons la performance d'un ensemble de sept cultivars de pois chiches communément cultivés dans des conditions de faible disponibilité en P pendant deux campagnes agricoles successives. En plus des traits agronomiques classiques enregistrés pour l'évaluation de la tolérance à la déficience en P, cet essai réalisé en plein champs dans des conditions écologiques nous a permis d'évaluer les composantes du rendement lorsqu'ils sont soumis aux conditions pédo-climatiques naturelles prévalant dans une région de culture bien connue pour la rareté du P des sols (Lazali et al.2021).

Nous mettons en œuvre une analyse intégrative pour révéler les relations fonctionnelles entre les traits fonctionnels et les proxies liés à la croissance, à la productivité et à l'aptitude des plantes ainsi qu'à l'efficacité physiologique dans la nutrition en P et en N et la symbiose rhizobienne fixatrice de N₂. Nos principaux objectifs sont les suivants : (i) révéler les principaux caractères de sélection particulièrement pertinents pour améliorer l'efficacité dans des conditions de croissance de déficientes en P, (ii) identifier

éventuellement des géotypes candidats prometteurs pour le développement de cultivars de pois chiches tolérants à la faible fertilité du sol en P et (iii) définir une stratégie de sélection pour combiner efficacement les caractères critiques pour une production efficace dans des systèmes agricoles à faibles intrants dans les variétés nouvellement développées.

Dans cette étude, les géotypes de pois chiches cultivés dans des conditions de faible teneur en phosphore ont montré une variation significative pour tous les traits mesurés, avec quelques exceptions, dont la germination. Les traits liés au rendement (c'est-à-dire le nombre de graines et le poids de 100 graines) et à l'acquisition de P et de N étaient les traits les plus contrastés entre les cultivars. Les présentes conclusions sont conformes aux résultats d'autres études. Par exemple, Pang et al. (2018a) ont trouvé une différence significative dans la croissance des plantes, la teneur en P des pousses, l'acquisition de P et l'efficacité d'utilisation de P parmi 226 géotypes de pois chiches cultivés dans des pots contenant du sable alimenté en FePO_4 , une forme de P peu soluble. Des différences géotypiques significatives dans la croissance des racines et des pousses, dans l'efficacité de l'acquisition et de l'utilisation du P ainsi que dans l'acquisition des macronutriments (c.-à-d. Zn, Fe, Cu et Mn) ont été observées au sein de 20 géotypes de pois chiches évalués dans des expériences de culture en pots avec un sol contenant des niveaux variés de P ajouté (Srinivasarao et al. 2006). Des variations géotypiques significatives dans l'acquisition de P et le PUE ont été observées parmi 155 géotypes de pois chiches évalués dans des conditions de terrain avec et sans engrais P en Éthiopie (Keneni et al. 2015). Kaur et al. (2021) ont classé 25 cultivars de pois chiches comme sensibles, tolérants et modérément tolérants aux conditions de déficience en phosphore, sur la base des traits morpho-physiologiques et des performances de rendement dans des conditions de phosphore faibles et normales. Dans cet article, l'existence d'une variation géotypique dans l'absorption des nutriments : N et P et dans les principaux traits agronomiques liés au rendement au sein de cet ensemble de cultivars de pois chiches les plus largement cultivés en réponse à une faible disponibilité de P suggère leur utilité pour initier un programme de sélection visant à améliorer la tolérance au P dans une région de production donnée.

La nutrition P joue un rôle clé dans le développement des nodules et la fixation de N_2 . Non seulement le P affecte la formation des nodules (Liu et al. 2018), mais la limitation du P a également un impact négatif sur le processus de fixation de l'azote (Valentine et al. 2017a ; Zerihun, 2017). Comme attendu, une forte corrélation positive entre les concentrations de P et de N des nodules a été révélée dans notre étude. L'efficacité d'utilisation du P dans les plantes est composée de deux éléments : L'efficacité d'acquisition du P et l'efficacité d'utilisation du P, qui est définie comme la production de matière sèche par unité de P dans la plante (Pang et al. 2018b). Les plantes peuvent donc mettre en œuvre différentes stratégies pour faire face à la déficience en P visant soit à maintenir l'utilisation du phosphore, soit à améliorer l'acquisition et l'absorption du P (Stevens et al. 2019). Comme cela a été rapporté chez diverses légumineuses, les nodules sont de forts puits de P pendant la privation de P et présentent un pourcentage de déclin de P plus faible que les autres organes de la plante pour maintenir leurs fonctions métaboliques (Suliman et Phan Tran, 2015).

Un schéma similaire est observé dans notre étude, puisque des concentrations élevées de P dans les nodules ont été mesurées en même temps que des rapports élevés entre la teneur en P des nodules et celle des pousses (de 1,44 pour le génotype GHAB5 à 1,77 pour ILC32_79). Ces résultats soutiennent le maintien de l'homéostasie du P dans les nodules comme une stratégie adaptative putative déployée par les sept cultivars de pois chiches dans les conditions de culture stressantes de déficience en P dans nos essais. L'effet de la privation de P sur le nombre de nodules par unité de masse de pousse peut varier en fonction de l'espèce de légumineuse, du génotype et des conditions expérimentales, ce qui peut entraîner une augmentation, une diminution ou une absence d'altération de ce caractère végétal (Tang et al. 2001). Chez *Virgilia divaricate*, une légumineuse arborescente qui pousse dans des sols pauvres en nutriments dans la région floristique du Cap (CFA), bien que le nombre de nodules diminue avec un faible taux de P, leur biomasse reste inchangée (Stevens et al. 2019). De même, dans notre étude, la biomasse des nodules reste constante dans tous les génotypes bien que ceux-ci soient différemment affectés pour le nombre de nodules (**Figure 17**).

En dehors de la stabilisation de l'homéostasie du P dans la fraction symbiotique de la plante et du maintien de la biomasse des nodules, l'augmentation du PUE pour la nodulation est essentielle pour améliorer l'efficacité symbiotique dans des conditions d'appauvrissement du P. La corrélation très élevée déjà décrite entre le PUE et le poids sec des nodules (NDW) souligne l'importance d'un tel mécanisme adaptatif pour faire face à l'impact négatif de la déficience en P sur les capacités de fixation de l'azote par la symbiose des légumineuses et, finalement, sur la production de biomasse végétale et les performances de rendement. La capacité à acquérir le P du sol et à l'utiliser efficacement pour augmenter la croissance des plantes est une caractéristique clé pour l'adaptation aux sols à faible teneur en P, comme cela a été rapporté chez d'autres légumineuses (Pang, Zhao, et al. 2018). Nos résultats montrent que les processus d'efficacité d'acquisition et d'utilisation du P sont génétiquement découplés, ce qui permet de concevoir des stratégies de sélection distinctes pour promouvoir l'une ou les deux composantes de PUE, dans le but de développer de nouvelles variétés de pois chiches tolérantes à la déficience en P.

Jusqu'à présent, la plupart des études sur la réponse des légumineuses à la déficience en P ont été réalisées en conditions contrôlées. Cependant, en conditions de terrain, le stress dû à la déficience en P du sol peut être encore accentué par la sécheresse (Pang, Ryan, et al. 2018). Le phosphate présent dans le sol se diffuse très lentement (environ 0,1 mm/jour). Lorsque la teneur en eau du sol diminue pendant une période de sécheresse, les rayons des pores remplis d'eau et la mobilité du P diminuent également (Farooq et al. 2016). L'interaction néfaste entre les stress combinés de la déficience en P et de la sécheresse est susceptible d'augmenter dans un avenir proche sous l'effet du changement climatique. Cela pourrait être particulièrement important dans les zones semi-arides où les cultures de légumineuses sont largement cultivées et qui souffrent déjà de graves déficiences en P. Selon nos résultats, la saison de croissance 2018 a été plus productive que 2019 en termes de poids sec des plantes (nodule et racine), de nombre de nodules et de rendement. Les baisses les plus importantes dans les performances en 2019 ont été observées pour le

nombre de gousses et de graines et donc le rendement en grains pour tous les génotypes. Comme le montre l'analyse NDDI, cette mauvaise performance est principalement due à des précipitations erratiques en 2019 pendant la phase de floraison (deux semaines après l'apparition des bourgeons), entraînant des épisodes de sécheresse occasionnels pendant cette phase de développement critique, particulièrement sensible au manque d'eau chez le pois chiche et les autres grandes cultures.

Néanmoins, alors que le rendement en grains de tous les cultivars de pois chiches étudiés est fortement affecté, le poids des graines et, en fin de compte, la germination sont maintenus quel que soit l'environnement de croissance. Cela implique que les sept cultivars de pois chiches développent une stratégie adaptative qui favorise le remplissage des grains et la germination, permettant la production d'une descendance viable. Cela pourrait également indiquer que l'espèce était capable de solubiliser le P du sol en caractéristiques appropriées du grain, nécessaires à une germination soutenue, quelles que soient les conditions auxquelles elle était exposée (Adusei et al. 2020). La même stratégie « maintien d'une bonne fonction par rapport au nombre est également observée pour les nodules où le poids sec des nodules a été conservé alors que le nombre de nodules a diminué sous le stress de la sécheresse la deuxième année.

La réponse génotypique à la déficience naturelle en P a varié de manière significative entre les sept génotypes de pois chiches. Les génotypes identifiés comme performants sous des concentrations minimales de P ont probablement la capacité d'utiliser plus efficacement le phosphore disponible dans le sol. Au vu des caractéristiques et comportements spécifiques des différents cultivars étudiés, plusieurs stratégies de sélection peuvent émerger. FLIP90_13C est un bon candidat pour améliorer simultanément l'acquisition des éléments nutritifs P et N. En effet, malgré sa sensibilité aux changements de conditions environnementales au cours des deux saisons de culture, ce cultivar a systématiquement acquis plus de N et de P dans les nodules et a réalloué efficacement ces deux nutriments aux pousses. Il a également montré la plus haute teneur en P disponible dans le sol rhizosphérique, mettant en évidence sa bonne capacité à solubiliser le P non-assimilable, probablement grâce aux interactions qu'il établit avec les micro-organismes de la rhizosphère. Il présentait également le plus grand nombre de nodules, ce qui contribuerait à l'amélioration de l'efficacité de la culture capacité à tolérer la déficience en phosphore. Ses bonnes capacités d'acquisition de N et de P se traduisent en définitive par des performances élevées en termes de production de grains et de semences. GHAB4 est un autre candidat intéressant car il a montré des performances stables pour l'acquisition de N et P sur les deux saisons de croissance, ce qui souligne sa capacité à maintenir de telles capacités dans un environnement changeant. Enfin, GHAB5 est particulièrement intéressant pour son PUE supérieur.

L'identification de génotypes présentant des métabolismes efficaces de P et de N et de bonnes performances dans les composantes du rendement dans des conditions aussi pauvres en P indique la possibilité d'utiliser certains des cultivars de cet ensemble de référence de pois chiche dans les programmes de sélection afin d'améliorer l'acquisition et l'efficacité d'utilisation du P dans des environnements à faible teneur en P. Nos

résultats confirment la faisabilité des programmes de sélection pour améliorer le PUE du pois chiche et réduire la dépendance aux engrais commerciaux. Les associations marqueur-trait nouvellement décrites, liées aux traits racinaires critiques pour l'acquisition et l'efficacité d'utilisation du P (Thudi et al.2021), aideront sans aucun doute à atteindre efficacement cet objectif. La combinaison de l'approche de sélection assistée par la génomique (Varshney et al.2021) avec une évaluation phénotypique approfondie des principales cibles de sélection décrites ici dans des conditions de terrain à faible disponibilité en P devrait permettre de développer avec succès un nouveau cultivar de pois chiche amélioré plus tolérant et plus efficace vis-à-vis de la déficience en P du sol. Cela peut être réalisé en prenant éventuellement en compte les caractéristiques de l'absorption des micronutriments (par exemple le zinc (Zn) et le calcium (Ca)) ainsi que les voies métaboliques impliquées dans l'acclimatation des nodules en cas de privation de Pi, comme les acides gras, les phytostérols et les métabolites secondaires, comme le recommandent d'autres auteurs (Suliman et al.2019 ; 2022). Enfin, étant donné que les souches de rhizobium diffèrent considérablement dans leur tolérance à la déficience en P (Allito et al.2015) et en raison de la forte dépendance des légumineuses à l'égard des symbiotes pour mieux utiliser les ressources en P et en N disponibles. L'adaptation des souches rhizobiennes à la variété de légumineuse hôte est également un facteur important pour maximiser la productivité des légumineuses à grains (Marra et al.2019). Comme les souches de rhizobium diffèrent considérablement dans leur tolérance à la carence en P ou dans leur capacité à solubiliser le P (Mabrouk et al.2018), d'autres études sont également nécessaires pour étudier les interactions les plus performantes entre les génotypes de pois chiche efficaces en P et les souches de rhizobium dans les sols pauvres en P.

5. Conclusion

La déficience en P affecte différemment la croissance fonctionnelle et les traits de nodulation entre les cultivars de pois chiche. Ceci suggère l'existence de différents mécanismes adaptatifs pour maintenir l'efficacité physico-chimique requise de la plante. La carence en P modifie aussi différemment les composantes du rendement en grain, mais n'a pas d'impact sur la germination des graines. Enfin, la déficience en P peut entraver le bon établissement de la symbiose d'une manière qui dépend du cultivar. L'acquisition et l'efficacité de l'utilisation du phosphore pour la formation de nodules, deux caractéristiques critiques pour une croissance optimale, sont génétiquement découplées dans l'ensemble des cultivars analysés. En utilisant les propriétés distinctives de ces cultivars, qui sont adaptés à une région agro-écologique donnée d'Algérie, nous proposons différentes stratégies de sélection pour augmenter la part de la culture du pois chiche en tant que fixateur d'azote élevé dans les systèmes agricoles à faibles intrants. Nous suggérons que notre approche peut contribuer à établir un raisonnement pour initier un programme de sélection ciblé visant à améliorer la tolérance à la carence en P de cette légumineuse très importante.

Chapitre 2 : Etude de génétique d'association de la réponse à la verticilliose sous stress salin ou non au sein de la population tunisienne Soliman de *Medicago truncatula*

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel végétal

L'analyse de la biodiversité de la réponse de *Medicago truncatula* au flétrissement vasculaire causé par *Verticillium alfalfae* a été réalisée sur 90 accessions naturelles d'une population tunisienne. Les accessions constituant la population de Soliman (région située à 45 km au sud-est de Tunis, en bordure du Golfe de Tunis, **Figure 23**) ont été prélevées dans une plaine salée et font partie de diverses études sur l'adaptation au sel des populations tunisiennes de *M. truncatula* (Friesen et al. 2014 ; Vu et al. 2015 ; Moriuchi et al. 2016 ; Mazurier, 2018). Des gènes candidats pour la tolérance à la salinité ou encore pour la plasticité transgénérationnelle en réponse au stress salin ont été étudiés en comparant les données génomiques et les phénotypes de populations prospectées dans des régions salines (régions de Soliman et Enfidha) et non salines (régions d'El Kef et Bulla Regia).

Quatre-vingt seize accessions de la zone de Soliman sur les 252 que compte la population, ont été sélectionnées en fonction de l'électroconductivité du sol de leur origine (48 accessions issues de sols à faible électroconductivité (entre 0,66 et 3,48 dS/m) et 48 issues de sols à forte électroconductivité (3,58 et 17,01 dS/m, **Figure 21**) et leur génome a été séquencé (E. von Vettberg, The University of Vermont, personal communication). Notre étude a été menée avec 89 accessions pour lesquelles il y'avait suffisamment de graines. Les quatre lignées parentales de populations de lignées recombinantes RIL (Recombinant Inbred Lines), A17, F83005. 5, DZA315.16 et DZA45.6, dont la réponse à la souche *Va V31.2* de *V. alfalfae* est bien caractérisée (Ben et al. 2013), ont été utilisées comme lignées de référence.



Figure 23 : Répartition géographique des accessions de *Medicago truncatula* de la population Soliman. (Source: Thèse M. Mazurier, 2018)

Les graines de *M. truncatula* nécessitent une scarification avant leur mise en germination en les frottant sur du papier de verre. Elles sont ensuite placées dans des boîtes de Petri sur du papier absorbant imbibé d'eau et stratifiées à l'obscurité à 4°C pendant 2 à 4 jours, puis mises à température ambiante pendant une nuit.

Les graines germées sont ensuite transférées dans de petits pots individuels en tourbe (Jiffy) disposés sur des plateaux de 45x36cm recouverts d'une fine couche de vermiculite humide. Pour le maintien d'un micro-climat humide favorisant le développement des jeunes plantules, les plateaux sont placés sous des mini-serres fermées pendant 3 jours puis ouvertes progressivement dans un phytotron avec une photopériode de 16 heures à 25°C et 8 heures de nuit à 20°C.

1.2. Espèce Pathogène

La souche Va V31.2 de *Verticillium alfalfae* a été isolée à partir de racines de luzerne (*Medicago sativa*) à Castanet-Tolosan et identifiée par J. Gondran (INRA, Lusignan, France) en 1977 (Molinéro-Demilly et al. 2006). Dans le but d'obtenir une sporulation adéquate et suffisante pour l'inoculation des plantes, le champignon est cultivé sur du milieu Potato Dextrose Agar (PDA) à partir du stock de glycérol de la souche (suspension de spores conservée à -80°C dans 25% de glycérol) et incubé à 24°C et à l'obscurité pendant 15 jours.

1.3. Plans expérimentaux mis en œuvre pour le phénotypage en réponse aux stress combinés et modèles d'analyse statistique associés - Plan en blocs augmentés

Le phénotypage des 90 accessions Soliman et des quatre accessions de référence a été réalisé en conditions saline ([+Verticillium/+Sel], dans le cadre de cette thèse) et non saline ([+Verticillium/-Sel], Thèse de M. Mazurier, 2018) en trois répétitions biologiques indépendantes (**Figure 24**). Pour chaque accession, entre 8 et 10 plantes sont phénotypées par répétitions biologiques, en fonction du taux de germination ; au total, 2883 plantes ont été phénotypées dans le cadre de cette thèse.

Un plan en blocs augmentés a été mis en place en incluant comme accessions « témoins » (ou « checks ») dans chacune de ces répétitions les accessions A17, F83005.5, DZA315.16 et DZA45.6 ainsi que quatre accessions Soliman apparues les plus résistantes (SOL902, SOL908, SOL916 et SOL920) et quatre accessions les plus sensibles (SOL7, SOL390, SOL948 et SOL949) en conditions non salines (Mazurier, 2018).

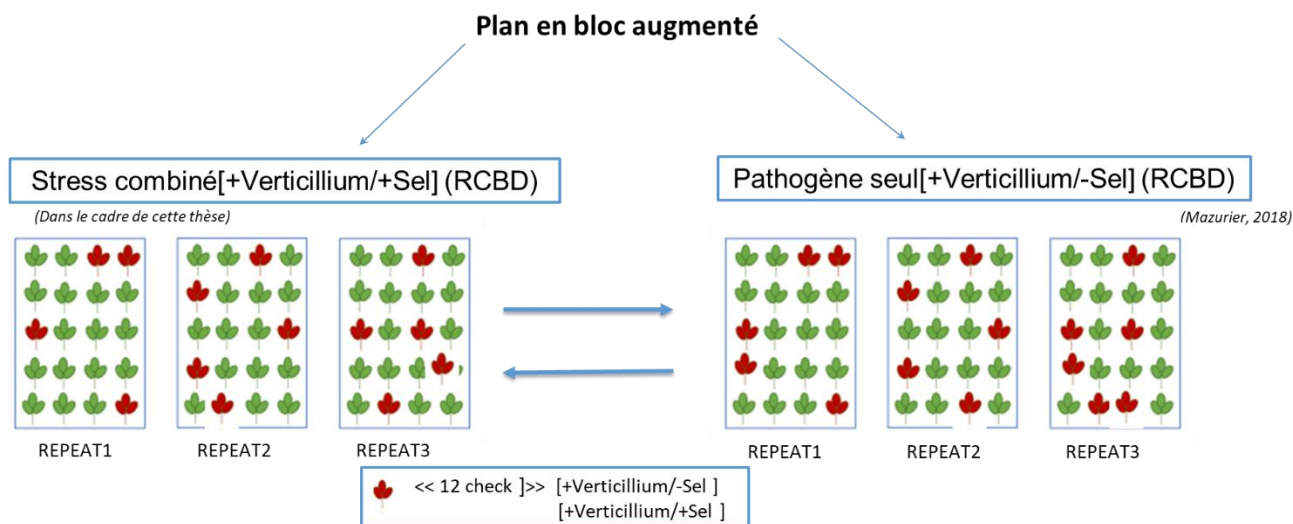


Figure 24 : Représentation schématique d'un plan en bloc augmenté pour le phénotypage en réponse aux stress combinés

Afin d'évaluer l'effet du sel sur la progression de la maladie et la colonisation du champignon, ces accessions « checks » ont été phénotypées dans quatre conditions de culture :

- Trois conditions de stress : stress combinés [+Verticillium/+Sel], stress 'maladie' seul [+Verticillium/-Sel], et stress salin seul [-Verticillium/+Sel],
- et une condition 'contrôle'[-Verticillium/-Sel].

La comparaison des réponses des accessions en conditions de stress combinés [+Verticillium/+Sel] et de stress 'maladie' seul [+Verticillium/-Sel] permet d'évaluer l'effet du sel sur la progression de la maladie et la colonisation des plants par le champignon. L'évaluation en conditions de stress salin seul sans inoculation par Verticillium [-Verticillium/+Sel] permet de s'assurer que les symptômes de flétrissement observés chez les plantes inoculées par le pathogène après un traitement au sel (i.e. condition [+Verticillium/+Sel]) sont bien des symptômes typiques de la verticilliose et non une réaction au sel. Les symptômes dus au stress salin se caractérisent principalement par une brûlure de la périphérie des feuilles et sont donc bien distincts des symptômes de flétrissement dus à la verticilliose.

Les données phénotypiques des 12 lignées « checks » en conditions de stress 'maladie' seul [+Verticillium/-Sel], qui sont disponibles pour toutes les expériences de phénotypage (effectuées par M. Mazurier ou dans le cadre de cette thèse), sont utilisées pour estimer l'effet de bloc de chacune des répétitions et pour corriger l'ensemble des données par la méthode des moyennes marginales (ou lsmeans).

1.4. Analyse phénotypique

1.4.1. Traitement en sel et inoculation

Sur la base des résultats d'expériences préalables réalisées au sein du laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement LEFE (Toulouse), la concentration optimale de sel de 150 mM a été appliquée (C. Ben,

communication personnelle). Cette concentration de sel permet de discriminer les accessions de *M. truncatula* sensibles et tolérantes au stress salin sans affecter le développement mycélien ni la capacité de sporulation de la souche *Va* V31.2 de *V. alfalfae*.

Le premier traitement en sel a eu lieu 5 jours après le semis avec une concentration de 50mM NaCl (1L/100 jiffys). Au stade de la première feuille trifoliée (10 jours après le transfert dans les pots Jiffy), les plantes sont inoculées avec une solution de 10^6 spores/mL de *Va* V31-2. La suspension de spores est obtenue en immergeant le mycélium dans de l'eau stérile et en le frottant à l'aide d'un râteau stérile. La concentration de cette suspension est déterminée en utilisant une cellule de Malassez. Pour standardiser l'inoculation, les racines des plantes sont coupées sur 1cm, puis elles sont placées dans des plateaux contenant 800 mL de suspension de spores à 10^6 spores/mL ou d'eau stérile (cas des témoins) pendant 30 minutes. A la fin de cette imbibition, les plantes sont transférées dans des plateaux contenant du terreau, puis placées dans un phytotron avec les mêmes conditions de germination (16 h de jour à 25°C et 8 h de nuit à 20°C).

Le suivi des symptômes de la maladie est ensuite réalisé plante par plante 2 à 3 fois par semaine pendant 4 semaines en utilisant une échelle croissante de 0 à 4 (**Figure 25**, Ben et al. 2013) avec :

0 = 0% (plantule saine)

1 = 1-33% (léger jaunissement)

2 = 34-66% (jaunissement important des feuilles)

3 = 67-100% (jaunissement avec nécrose)

4 = mort de la plantule



Figure 25 : Echelle de suivi des symptômes de maladie (Source : Ben et al. 2013)

Le second traitement au sel est effectué 2 jours après l'inoculation avec une concentration de 100mM NaCl (1L/ 64 jiffys). Pour maintenir la survie des plantes, une irrigation avec de l'eau (800 ml/64 plantes) a été réalisée à 10 dpi (days post inoculation), 17dpi et 25 dpi.

1.4.2. Réisolement de *V. alfalfae* à partir de fragment de tiges de *M. truncatula*

À la fin du suivi des symptômes de flétrissement (soit 28 jours après inoculation), un fragment de tige de chaque plante des 12 accessions « checks » est prélevé pour les deux conditions en sel, [+Verticillium/+Sel] / [+Verticillium/-Sel], pour étudier la colonisation des parties aériennes des plantes par *Va* V31-2. Des fragment d'une longueur de 2 cm rassemblés par génotype par condition en sel (6 fragments) sont

désinfectés pendant 15 secondes par l'éthanol à 70%, suivi de 6 minutes en bain d'eau de Javel à 0,96% de chlore actif et de trois rinçage d'une minute dans de l'eau stérile. Les fragments sont ensuite disposés dans des boîtes de Petri contenant du PDA et de la streptomycine à 100µg/mL. Les boîtes sont mises à incuber à 24°C pendant 5 jours. Le taux de réisolement correspond au rapport du nombre d'extrémités où se développe *Va V31-2* par le nombre total d'extrémités auquel on soustrait le nombre d'extrémités colonisées par des endophytes (bactéries ou champignons) (Mazurier, 2018) soit :

$$\text{Taux de réisolement} = \frac{\text{Nombre d'extrémités colonisées par } Va V31.2}{\text{Nombre total d'extrémités} - \text{Nombre d'extrémités colonisées par des endophytes}}$$

1.4.3. Evaluation de la réponse au stress salin seul au sein des 12 accessions « checks »

La réponse au sel seul [-*Verticillium*/+Sel] des 12 accessions Check a été évaluée en trois répétitions biologiques indépendantes. Le suivi des symptômes liés au stress salin est réalisé plante par plante 2 à 3 fois par semaine pendant 4 semaines avec la même échelle de suivi des symptômes de maladie (**Figure 25**).

1.5. Analyse statistique des données phénotypiques

L'ensemble des analyses de données ont été réalisées avec le logiciel R (R Cran 2021, version 4.1.1).

1.5.1. Calcul de paramètres de maladie et de réponse au stress salin

1.5.1.1. MSS

Le MSS (Maximum Symptom Score) correspond au score de maladie pour chacune des plantes à la fin du suivi des symptômes de flétrissement 28 jours après inoculation.

Pour les 12 accessions « checks » évaluées en conditions [-*Verticillium*/+Sel], le MSS correspond au score maximum de symptômes de brûlures causées par le sel en fin d'expérience.

1.5.1.2. AUDPC

La progression de la maladie est quantifiée par l'AUDPC (Area Under the Disease Progress Curve) qui est calculée, pour chacune des plantes, sur la base de la courbe de symptômes de flétrissement pendant 28 jours après inoculation, en utilisant le package R 'agricolae'.

Les courbes de progression de la maladie ainsi que les représentations graphiques de boxplot ont été tracés à l'aide du package R 'ggplot2'.

1.5.1.3. AUSPC

Pour les 12 accessions « checks » évaluées en conditions [-*Verticillium*/+Sel], la progression des symptômes de réponse au stress salin est quantifiée par l'AUSPC (Area Under the Symptom Progress Curve) qui est calculée, pour chacune des plantes, sur la base de la courbe de symptômes de brûlures dues au stress salin pendant 28 jours, en utilisant le package R 'agricolae'.

1.5.2. Analyses de variance sur les paramètres de maladie et de réponse au stress salin

Les analyses de variance des paramètres de maladie (MSS, AUDPC) et de réponse au stress salin (MSS, AUSPC), réalisées au sein des accessions « checks » ou de la population Soliman, ont été faites à l'aide de modèles linéaires mixtes.

Les modèles mis en œuvre, tenant compte ou non de l'effet des conditions en sel et de l'interaction avec les accessions en fonction des objectifs de l'étude, sont les suivants :

$$Y_{ijk} = \mu_{\text{trait}} + \text{Accessions}_i + \text{Répétition}_j + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

$$Y_{ijkl} = \mu_{\text{trait}} + \text{Accession}_i \times \text{Condition}_j + \text{Répétition}_k + \varepsilon_{ijkl} \quad (2)$$

où les accessions, les conditions en sel ([+Verticillium/+Sel] et [+Verticillium/-Sel]) et leur interaction sont considérées comme des effets fixes et l'effet des répétitions biologiques indépendantes comme un effet aléatoire. L'analyse a été effectuée à l'aide de la fonction lmer du package R 'lmerTest'.

Les tests de Shapiro (vérification du postulat de normalité des résidus de l'ANOVA), les tests de Levène (vérification du postulat d'homogénéité des variances) ont été réalisés avec le logiciel R. Des comparaisons de moyennes multiples ont été effectuées à l'aide des tests Tukey (comparaisons par paires) à une valeur $p \leq 0,05$.

1.5.3. Analyse statistique du taux de réisolement du champignon

Les données du taux de réisolement ont été analysées à l'aide d'un modèle linéaire mixte généralisé ajusté par le maximum de vraisemblance et utilisant une famille binomiale (logit). Le modèle mis en œuvre avec la fonction glmer du package R 'lme4'.

1.5.4. Analyses de génétique d'association par GWAS

L'analyse de génétique d'association (GWAS, Genopme-Wide Association Study) a été réalisée sur les données phénotypiques moyennes marginales (lsmeans) d'AUDPC et de MSS corrigées de l'effet 'répétition expérimentale' des 90 accessions de la population tunisienne Soliman de *M. truncatula*. Les données des plantes traitées au sel et les plantes non traitées ont été analysées séparément.

Le décodage précis de l'architecture génétique des traits quantitatifs complexes dans une population diversifiée n'est possible que si des modèles statistiques précis peuvent distinguer les véritables associations biologiques des faux positifs découlant de la structure de la population et de la parenté sans surcorriger et aboutir à des faux négatifs. L'utilisation de covariables pour la structure des populations et la parenté dans le modèle statistique permet de contrôler ces facteurs de confusion (Kaler et al. 2020).

Plusieurs modèles d'analyse de GWAS ont été testés afin de sélectionner le plus approprié permettant de réduire les faux positifs et de faire face aux associations dues à la parenté et à la structure de la population à savoir: le modèle linéaire général (GLM, general linear model), le modèle linéaire mixte (MLM, mixed linear model), le MLM compressé (CMLM, compressed MLM) et la méthode multi-loci (FarmCPU,

Méthode Multi-loci ‘Fixed and Random Model Circulating Probability Unification’).

L'étude de génétique d'association a été réalisée avec le logiciel R par le biais du package GAPIT3.

1.5.4.1. Données génotypiques

L'analyse de GWAS a été réalisée sur 90 accessions de la population Soliman de *M. truncatula*. Afin de limiter le nombre de faux positifs, les SNPs ont été filtrés en ne conservant qu'un alignement minimal de 44 accessions et avec deux niveaux de fréquence d'allèles minimales (MAF=0.1 et MAF=0.2, minimum allele frequency). Au total, 75 736 SNP et 172 498 SNP respectivement sont conservés sur un total de 243 041 SNP pour l'étude pour chaque paramètre (AUDPC et MSS) pour chaque condition [+Verticillium/+Sel] et [+Verticillium/-Sel].

1.5.4.2. Matrice de kinship et structure des populations

Les faux positifs peuvent survenir en raison d'une ascendance commune plus récente et de la parenté, ce qui peut être contrôlé par l'inclusion d'une matrice de parenté dans le modèle d'analyse.

GAPIT calcule automatiquement la matrice de parenté ou ‘Kinship matrix’ en tenant compte de l'ensemble des SNP et en utilisant la méthode de VanRaden. Pour le modèle CMLM, l'analyse de GWAS sera effectuée avec le niveau de compression optimal en utilisant l'algorithme de regroupement par défaut (moyen) et le type de parenté de groupe (moyen) (Wang et Zang, 2021).

La structure de population est calculée par défaut par GAPIT par une analyse en composantes principales (ACP) sur la base de l'information apportée par les SNP.

1.5.4.3. Modèles statistiques pour la génétique d'association

Les performances des modèles testés sont comparées sur la base des QQ-plots (ou diagrammes quantile-quantile) et des Manhattan plots, afin de vérifier si les P-values ne sont ni sous-estimées ni sur-estimées. Les QQ-plots permettent de vérifier que les P-values suivent une loi uniforme, c'est-à-dire que les P-values attendues et les P-values calculées sont proches, excepté pour les SNP significatifs.

Les Manhattan plots sont une représentation des P-values de chacun des SNP en fonction de leur position physique sur les chromosomes. L'apparition d'un grand nombre de SNP isolés présentant une P-value très significative dénote un problème de modèle d'analyse (Korte et Farlow, 2013).

General linear model (GLM)

Le modèle GLM le plus simple, ou modèle dit ‘naïf’, est un modèle permettant de détecter l'association entre les phénotypes et les marqueurs sans prendre en considération la structure de la population:

$$Y = X\beta + \epsilon \quad (3)$$

avec Y comme vecteur des observations (correspondant à l'AUDPC ou au MSS), X la matrice de marqueurs

SNP, β désigne le vecteur inconnu des effets alléliques à estimer et ϵ le vecteur des résidus de l'analyse.

Le GLM peut tenir compte de la structure de la population (ici, les coordonnées des accessions sur les trois premières composantes principales de l'ACP) comme covariable des effets fixes pour réduire les faux positifs qui proviennent uniquement de la structure de la population (Pritchard et al. 2000 ; Price et al. 2006). Dans ce cas, X est la matrice des marqueurs SNP et de la structure de la population (matrice Q).

Mixed linear model (MLM)

Pour tenir compte des relations entre les individus au sein des sous-populations, la parenté entre les individus a été introduite par le biais du modèle linéaire mixte (MLM) en utilisant des marqueurs génétiques couvrant l'ensemble du génome (Zhu et al. 2008). Le MLM utilise les composantes principales de l'ACP et la kinship dans le modèle afin de réduire les faux positifs qui découlent de la parenté familiale et de la structure de la population (Yu et al. 2006).

Le MLM comprend à la fois des effets fixes et des effets aléatoires. L'inclusion d'individus en tant qu'effets aléatoires permet au MLM d'incorporer des informations sur les relations entre les individus. Ces derniers sont transmis par la matrice de parenté (Kinship), qu'elle est utilisée dans un MLM comme matrice de variance-covariance entre les individus. La matrice de parenté (K) basée sur un marqueur génétique est utilisée conjointement avec la structure de la population (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000) :

$$Y = X\beta + Zu + \epsilon \quad (4)$$

Y représente le vecteur des observations (AUDPC ou MSS), X est la matrice contenant les allèles aux marqueurs SNP ainsi que la structure de la population qui sont ajustés comme un effet fixe, β est un vecteur inconnu comprenant les effets des allèles au SNP et des sous-populations qui doivent être estimés, Z représente la matrice connue des effets génétiques qui sont ajustés comme un effet aléatoire, u et enfin ϵ est le vecteur des résidus du modèle. u et ϵ sont des effets aléatoires qui doivent être estimés. u suit une distribution normale standard avec une moyenne de zéro et une variance σ^2_a (variance génétique additive) ; ϵ suit également une distribution normale standard avec une variance homogène σ^2_e (variance résiduelle). De plus,

$$\text{Var} \begin{pmatrix} u \\ \epsilon \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} G & 0 \\ 0 & R \end{pmatrix}$$

où $G = \sigma^2_a.K$ et $R = I.\sigma^2_e$ avec K, matrice de kinship (apparentement) entre les individus.

Compressed MLM (CMLM)

Dans un MLM classique, comme la parenté est dérivée à partir de tous les marqueurs, l'incorporation de la parenté pour les marqueurs de test dans le modèle entraîne une confusion entre les marqueurs de test et les effets génétiques des individus avec une structure de variance définie par la parenté (Zhang et al. 2010b). La méthode CMLM regroupe les individus en groupes et intègre la valeur génétique des groupes (au lieu des accessions individuelles) dans la matrice d'apparentement K comme effet aléatoire dans le modèle. Ceci

améliore la puissance statistique ainsi que l'efficacité du calcul par rapport aux méthodes MLM classiques (Zhang et al. 2010a).

FARMCPU Méthode Multi-loci 'Fixed and Random Model Circulating Probability Unification'

Les trois modèles décrits précédemment, GLM, MLM et CMLM, sont caractérisés par l'analyse de l'effet d'un seul locus.

Le modèle FarmCPU utilise une méthode MLM modifiée, le Multiple Loci Linear Mixed Model (MLMM), et incorpore plusieurs marqueurs simultanément comme covariables dans un MLM afin d'éliminer partiellement la confusion entre les marqueurs de test et la parenté, ce qui permet de faire une analyse multi-loci (Liu et al. 2016).

Pour éliminer complètement les facteurs de confusion, le MLMM est divisé en deux parties - le modèle à effet fixe (FEM) et le modèle à effet aléatoire (REM) - et les utilise conjointement :

1. Le FEM contient le test des marqueurs un par un, et plusieurs marqueurs associés comme covariables pour contrôler les faux positifs,
2. pour éviter un surajustement du modèle, les marqueurs associés dans le FEM ainsi que les marqueurs en LD avec le marqueur testé sont retirés du REM, pour définir la parenté,
3. les *P values* des marqueurs de test et des marqueurs associés sont regroupée à chaque interaction (Liu et al. 2016).

FarmCPU rejoint les avantages du modèle linéaire mixte MLM et de la régression pas à pas (modèle à effet fixe GLM) et surmonte leurs inconvénients en les utilisant de manière itérative. L'ensemble des marqueurs associés est ajusté comme effet fixe dans un modèle à effet fixe (GLM) pour tester les marqueurs un par un à travers le génome. Pour éviter un ajustement excessif du modèle pour tester les marqueurs, l'ensemble des marqueurs associés est optimisé par une méthode de maximum de vraisemblance. La simulation informatique et les analyses de données réelles ont démontré que FarmCPU a une puissance plus élevée et moins de faux positifs que le MLM (Liu et al. 2016).

1.5.4.4. Seuil de significativité des p-values associées aux SNP

La méthode la plus simple d'analyse des résultats du GWAS et souvent très conservatrice consiste à déterminer le seuil de significativité des p-values associées aux SNP par une correction des tests multiples de Bonferroni (un seuil de 5%) (Korte et Farlow, 2013). Alternativement, le seuil calculé par False Discovery Rate (FDR) peut être appliqué (Benjamini et Hochberg, 1995). Dans notre étude, nous considérerons le seuil arbitraire de 4 pour identifier les SNP potentiellement associés à la variation phénotypique des traits étudiés au sein de la population Soliman.

1.5.5. Analyse bio-informatique pour l'identification de gènes candidats et leur annotation fonctionnelle

En se basant sur les données sur le déséquilibre de liaison et les taux de recombinaison décrits pour *M. truncatula* dans une étude précédente (Branca et al. 2011), les régions de (+ /-) 10 kb environnant les SNP statistiquement significatifs ont été explorées sur le site JBrowser pour le génome de *M. truncatula* (<http://genolab.inp-toulouse.fr:3838/MtrBioDiv/>) et les gènes prédits dans ces régions génomiques listés.

Les annotations fonctionnelles des gènes ont été identifiées selon leur Gene Ontology (GO). On peut déterminer le GO associé au gène à l'aide de son nom sur le site Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>).

2. Résultats

2.1. Analyse préliminaire de l'effet du sel sur la réponse à *V. alfalfae* Va V31.2 au sein d'un panel de diversité de 12 accessions « checks » de *M. truncatula*

Avant de nous lancer dans une analyse de génétique d'association pour étudier l'architecture génétique de la réponse aux de stress 'Verticilliose' et 'Sel' combinés, nous avons mené une étude préliminaire sur un sous-ensemble d'accessions nous permettant de répondre à plusieurs questions clés :

1. Le sel affecte-t-il l'évolution des symptômes de flétrissement et la colonisation des plantes par le champignon ?
2. Existe-t'il une interaction entre le génotype de la plante et la condition d'inoculation par le pathogène associée ou non au stress salin ?

Afin de répondre à ces questions, une analyse détaillée de la réponse à la souche *Va* V31.2 a été menée en conditions saline et non saline au sein d'un panel de 12 accessions de *M. truncatula*. Les 12 accessions correspondent aux quatre lignées de référence A17, F83005.5, DZA315.16 et DZA45.6 dont la réponse à *Va* V31.2 est bien connue (Ben et al. 2013) ainsi qu'aux huit lignées de la population tunisienne Soliman décrites par M. Mazurier comme étant respectivement les plus sensibles (SOL7, SOL390, SOL948 et SOL949) et les plus résistantes (SOL902, SOL908, SOL916 et SOL920) à cette souche (Mazurier, 2018).

Pour les 12 accessions, l'évolution des symptômes de flétrissement de chaque plante pendant 4 semaines après inoculation par le champignon et le taux de réisolement du pathogène à partir des tissus des plantes infectées pour chaque accession en fin d'expérience ont été évalués dans trois conditions de stress : pathogène seul [+Verticillium/-Sel], stress salin seul [-Verticillium/+Sel] et stress combinés [+Verticillium/+Sel].

2.1.1. Analyse préliminaire de la réponse des accessions au stress 'sel' seul

La réponse au sel [-Verticillium/+Sel] des 12 accessions a été examinée en trois répétitions biologiques indépendantes. Deux paramètres de sensibilité au stress salin ont été évalués :

- l'AUSPC (Area Under the Symptom Progress Curve), phénotype permettant de quantifier l'évolution des symptômes liés au stress salin au cours du temps ;
- le MSS (Maximum Symptom Score) qui représente la sévérité des symptômes liés au stress salin à la fin de l'expérimentation (dans notre cas 28 jours après traitement).

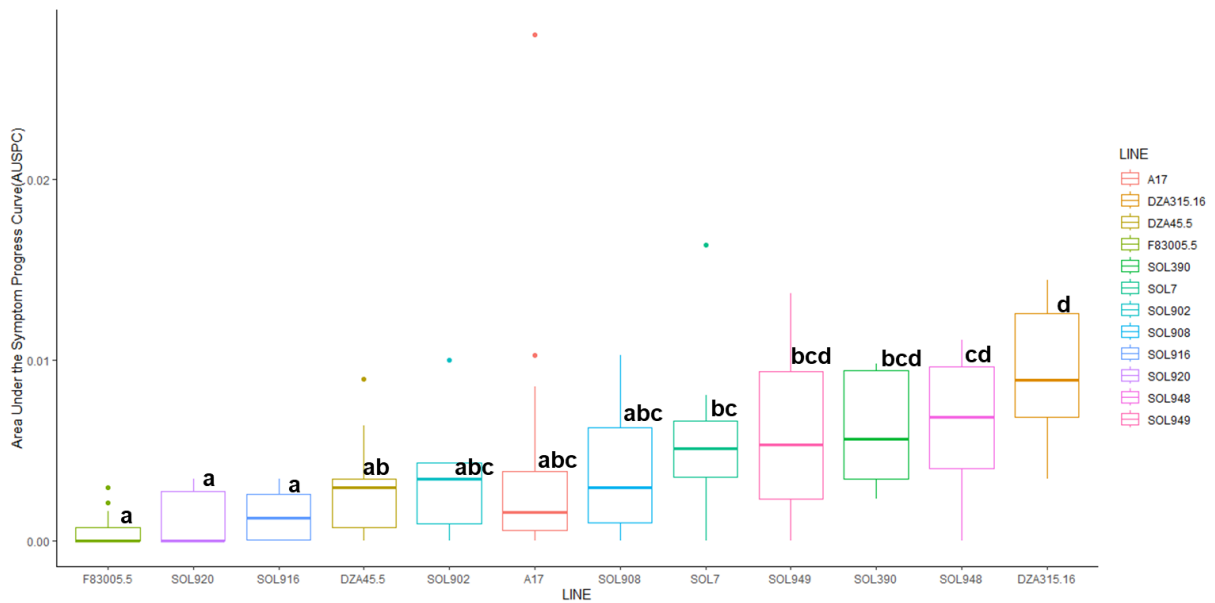
L'analyse de variance a révélé une variation significative de la réponse des accessions au stress salin seul (**Tableau 11**), avec des accessions résistantes au sel (telles que F83005.5, SOL920, SOL916), moyennement sensibles (telles que A17, SOL908), et des accessions sensibles (telles que DZA315.16, SOL949) (**Figure 26**).

Tableau 11: Tables d'ANOVA pour les phénotypes AUSPC et MSS pour les 12 accessions en réponse au stress salin.

Source de variation	ddl	AUSPC		MSS	
		F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
Accession	11	14.210	< 2.2e-16 ***	23.207	< 2.2e-16 ***
Répétitions	2	29.253	8.546e-12 ***	27.587	3.077e-11 ***
Résiduelle	189				

Afin d'homogénéiser les variances et normaliser les résidus de l'ANOVA, les transformations suivantes ont été réalisées : (AUSPC)⁻², (MSS)^{0,38}.

A



B

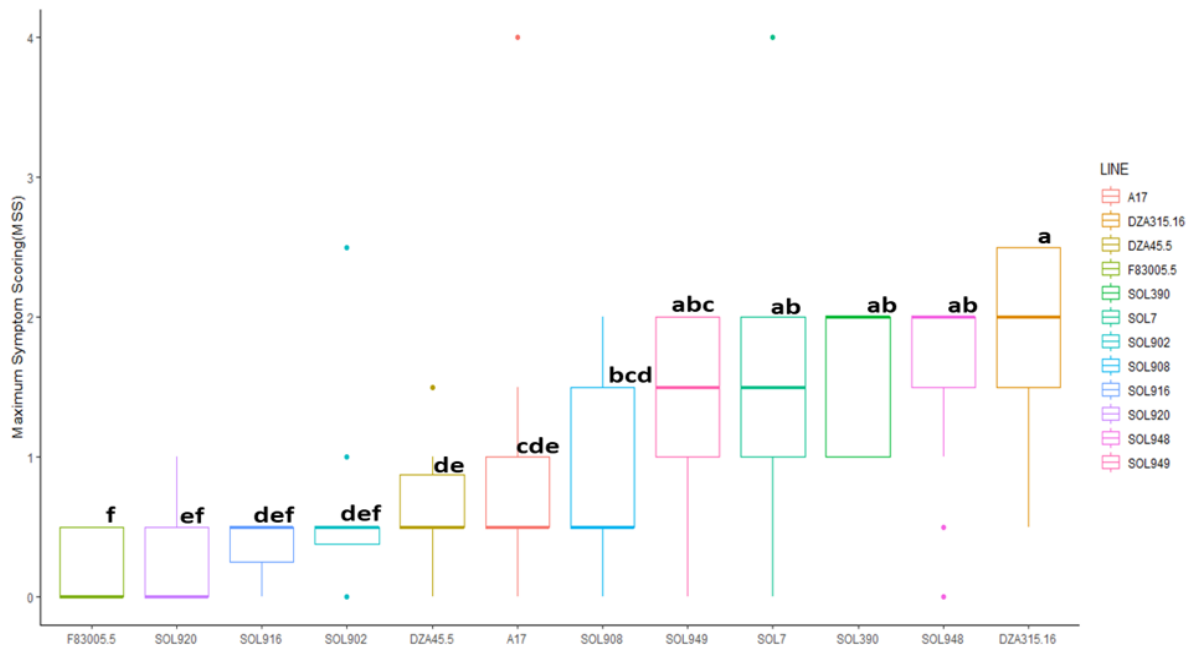


Figure 26 : Boxplots des paramètres AUSPC (A) et MSS (B) en réponse au sel des 12 accessions évalués en trois répétitions biologiques indépendantes. Les lettres identifient les groupes significativement différents selon le test de Tukey pour les comparaisons de moyennes multiples à P = 0,05.

2.1.2. Analyse de l'effet du sel sur l'évolution des symptômes de maladie

La réponse des 12 accessions à *Va* V31.2 a été évaluée en conditions saline [+Verticillium/+Sel] et non saline [+Verticillium/-Sel] afin de pouvoir examiner l'effet du sel sur l'évolution des symptômes de la maladie.

La distribution des phénotypes MSS et AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) en réponse à l'inoculation par *Va* V31.2 en condition saline ou non sont présentées sous forme de boîtes à moustache pour les 12 accessions dans la **Figure 27** : cette représentation permet de visualiser la diversité de la réponse à *Va* V31.2 au sein du panel. Le stress salin modifie la réponse à Verticillium au sein de ce panel d'accessions. En conditions salines, nous n'observons plus les deux groupes distincts de lignées sensibles et résistantes à Verticillium mais une variation continue entre les lignées très résistantes et les lignées très sensibles. Ceci révèle une interaction significative entre les accessions et les deux types de stress (*Va* V31.2 simple ou combiné au sel) (**Figure 28**), qui est confirmée par l'analyse de variance (**Tableau 12**).

Tableau 12: Tables d'ANOVA pour les phénotypes MSS et AUDPC pour les 12 accessions inoculées par *Va* V31.2 soumises ou non à un stress salin.

Source de variation	Ddl	MSS		AUDPC	
		F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
Accession	11	71.6777	< 2.2e-16 ***	68.721	< 2.2e-16 ***
Condition	1	241.3115	< 2.2e-16 ***	124.856	2.2e-16 ***
Accession:Condition	11	6.7472	9.031e-11 ***	5.439	2.601e-08 ***

Le modèle d'analyse de variance pour évaluer l'effet du sel sur l'évolution des symptômes de maladie est un modèle linéaire mixte (MLM), $Y_{ijkl} = \mu_{\text{trait}} + \text{Accession}_i \times \text{Condition}_j + \text{Répétition}_k + \epsilon_{ijkl}$ où les accessions, les conditions en sel et leur interaction sont considérées comme des effets fixes et l'effet des répétitions biologiques indépendantes comme un effet aléatoire. L'analyse a été effectuée à l'aide de la fonction lmer du package lmerTest. Aucune transformation de données afin de valider les postulats de l'ANOVA n'a été nécessaire. Les valeurs des P-values sont indiquées. ddl : degré de liberté, AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve, MSS : Maximum Symptom Score.

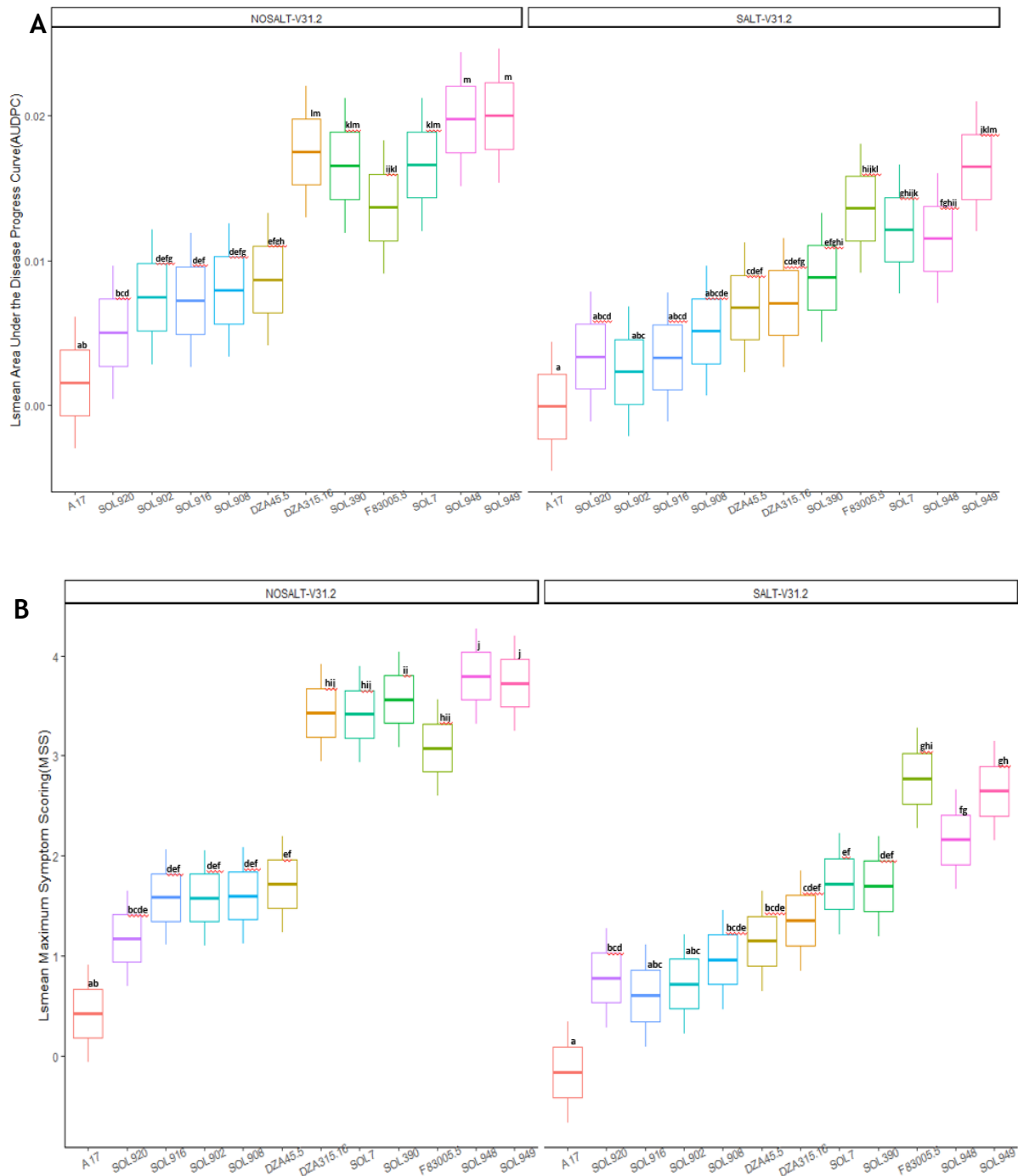


Figure 27 : Boîtes à moustache représentant les moyennes ajustées de l'effet 'répétition' de l'AUDPC (A) et du MSS (B) des 12 accessions après inoculation par *Va* V31.2 et soumises ou non au stress salin [+Verticillium/+Sel ; +Verticillium/-Sel]. Pour les 12 accessions, trois répétitions biologiques ont été effectuées. Pour chaque répétition, un nombre moyen de dix plantes par accession par traitement a été analysé. Les phénotypes AUDPC et MSS en condition [+Verticillium/+Sel] sont corrigés de l'effet dû au sel seul [-Verticillium/+Sel] pour chaque accession.

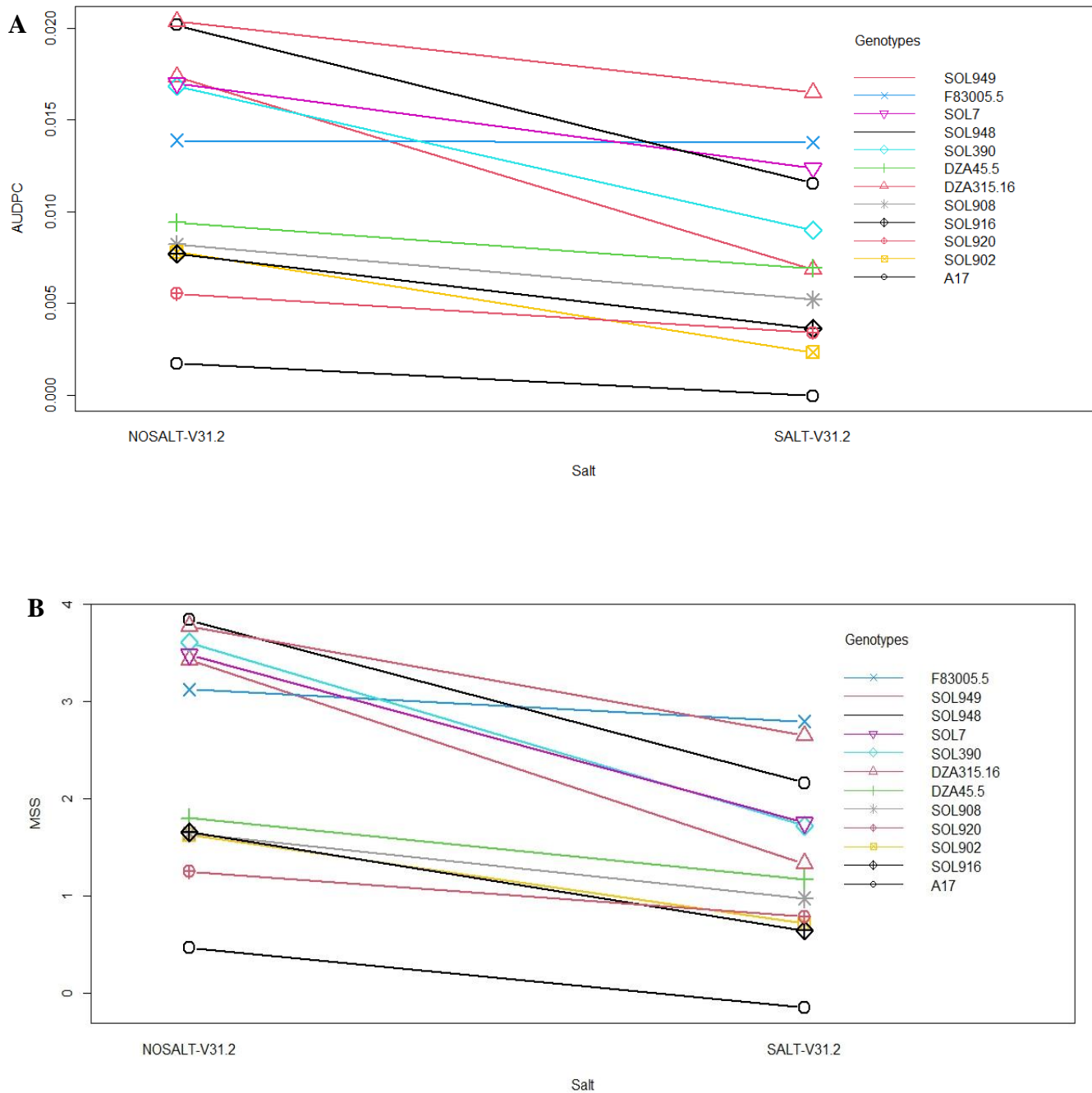


Figure 28: Interaction plots pour les paramètres de maladie AUDPC (A) et MSS (B) des 12 accessions après inoculation par *V. alfalfae* Va V31.2 et soumises ou non au stress salin [+Verticillium/+Sel ; +Verticillium/-Sel].

2.1.3. Le sel affecte-t-il la colonisation des plantes par le champignon ? - Analyse du taux de réisolement de *V. alfalfae* Va V31.2

L'objectif du ré-isolement de *Va* V31.2 à partir des tiges des 12 accessions soumises aux stress simples (Verticillium seul) ou combinés (Verticillium +stress salin) est d'évaluer l'effet du sel sur la colonisation des parties aériennes de *M. truncatula* par le champignon.

Aucune différence significative du taux de ré-isolement de *Va* V31.2 a été détectée en fonction des accessions ou de la condition en sel. Le sel n'a donc pas d'effet sur la colonisation des plantes par le champignon. (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Tables d'ANOVA du taux de ré-isolement de *Va* V31.2 à partir des fragments de tige des accessions « checks » soumises ou non au stress salin.

	ddl	Resid. Df	Deviance	Resid. Dev	Pr(Chi)
Accession	11	9.2503	36	9.2153	0.5988
Condition en sel	1	0.8149	35	8.4004	0.3667
Répétitions	1	0.0441	34	8.3563	0.8337
Accession : Condition en sel	11	1.6201	23	6.7362	0.9994

2.1.4. Conclusion.

L'existence d'une interaction significative entre accessions et type de stress pour les phénotypes AUDPC et MSS indique que les accessions ne répondent pas de la même manière aux stress combinés. Cela laisse supposer différents contrôles génétiques de la réponse aux stress 'maladie' seul et en combinaison avec le stress salin que nous nous proposons d'étudier par une analyse de GWAS sur la population Soliman. Nous comparerons l'architecture génétique de la réponse aux stress 'Verticilliose et sel' combinés avec l'architecture génétique de la réponse à *Verticillium* seul (évaluée en condition non saline).

2.2. Analyse de la biodiversité de la réponse à *V. alfalfae* *Va* V31.2 au sein de la population Soliman de *M. truncatula* soumise ou non au stress salin.

La diversité naturelle de la réponse à la souche *Va* V31.2 de *V. alfalfae* a été analysée sous stress salin au sein de 90 accessions de la population Soliman de *M. truncatula* originaire d'une région saline du Nord de la Tunisie. Trois répétitions biologiques indépendantes ont été réalisées pour chaque accession (dont les répétitions 2 et 3 par mes soins), avec en moyenne 10 plantes par accession, excepté pour les accessions SOL38, et SOL425 pour lesquelles nous ne disposons pas assez de graines.

Afin de pouvoir comparer les données obtenues en condition saline dans le cadre de cette thèse avec les données en condition non saline obtenues dans le cadre de la thèse de Dr M. Mazurier (2018), un plan en bloc augmenté a été mis en place au sein duquel la réponse des 12 accessions analysées en détail précédemment sont utilisées comme « checks ». Pour chacune des trois expériences de phénotypage de la population Soliman en condition [+*Verticillium*/+Sel], la réponse à la souche *Va* V31.2 de ces 12 accessions est évaluée en conditions saline [+*Verticillium*/+Sel]. Cela nous permet ensuite de corriger, pour chaque accession, la moyenne des index de maladie de l'effet dû à l'expérience.

L'ensemble du jeu de données reflète les symptômes de flétrissement pour plus de 5 000 plantes individuelles dans les deux conditions de sel, dont 2883 évaluées dans le cadre de cette thèse.

2.3. Evolution des symptômes de flétrissement foliaire chez la population Soliman soumise ou non au stress salin

2.3.1. Evolution des symptômes de flétrissement foliaire sous stress salin

L'évolution des symptômes de flétrissement foliaire en condition non saline ayant été décrite précédemment (Mazurier, 2018), dans cette partie, je vais me concentrer sur la présentation de l'évolution des symptômes de flétrissement foliaire sous stress salin, dont les données expérimentales ont été en très grande partie obtenues dans le cadre de ma thèse.

Comme précédemment décrit, l'évolution des symptômes de flétrissement a été caractérisée selon deux paramètres de maladie : le MSS et l'AUDPC.

Une biodiversité de la réponse à *Va* V31.2 a été observée au sein des 90 accessions de la population Soliman évaluées sous condition saline (**Figure 29**). Ainsi, l'évolution des symptômes de flétrissement au sein de la population Soliman et des quatre lignées de référence de *M. truncatula* permet de distinguer : (i) des accessions résistantes telles que SOL319, SOL914, SOL916 ou SOL920, qui apparaissent aussi résistantes que la lignée de référence résistante A17, (ii) des accessions modérément sensibles telles que SOL396 et SOL404 et des accessions très sensibles telles que SOL362, SOL949 et SOL948.

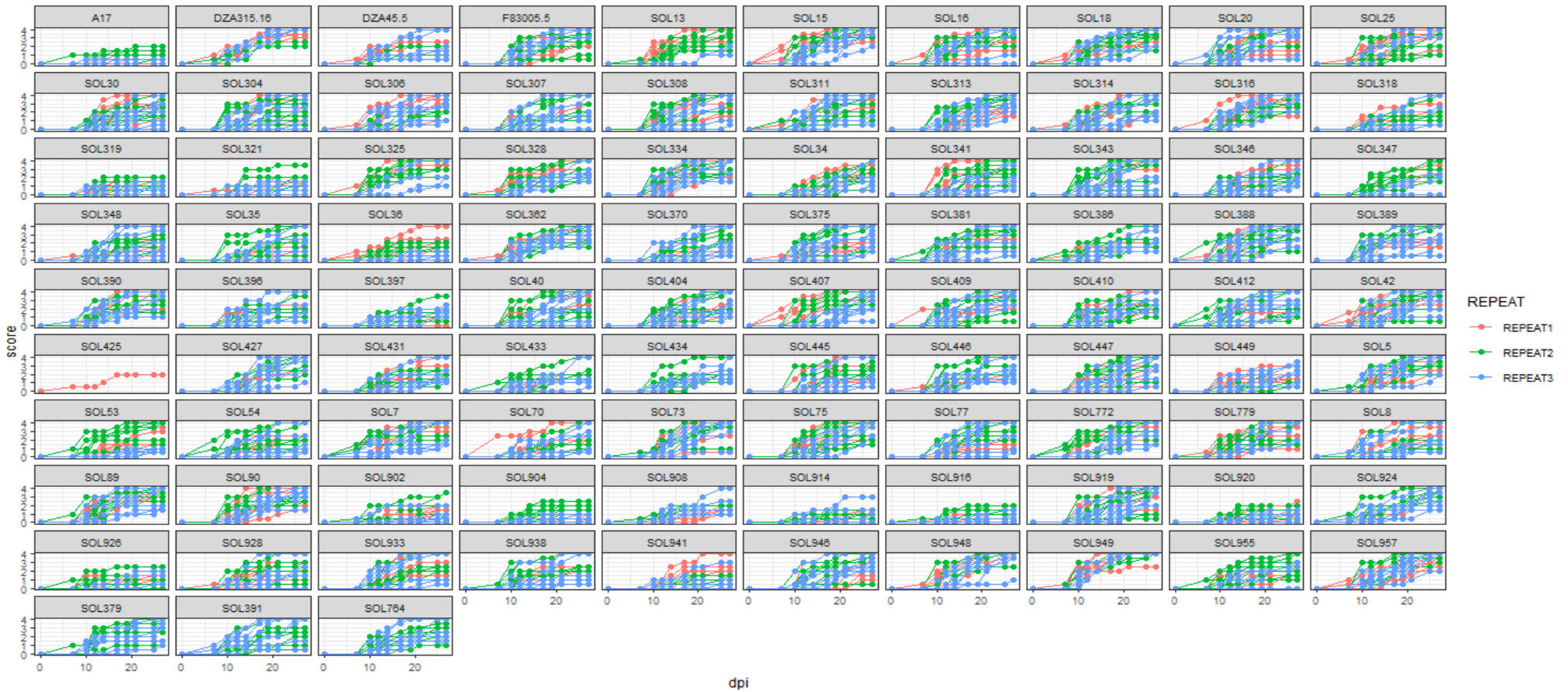


Figure 29 : Développement des symptômes de flétrissement chez la population Soliman de *M. truncatula* inocuées par *V. alfalfae* Va V31.2 sous stress salin [+Verticillium/+Sel]. Les symptômes de flétrissement sont notés avec une échelle de 0 à 4 (score) durant 28 jours après inoculation (dpi, days post inoculation). Chaque courbe de maladie représente la réponse d'une plante individuelle. Les différentes couleurs correspondent aux trois répétitions indépendantes. Les accessions sont classées en ordre alphabétique.

La distribution des phénotypes de maladie est continue au sein de la population indiquant, comme attendu, que la réponse à *V. alfalfae* en conditions salines est un caractère quantitatif au contrôle polygénique (**Figure 30**). En moyenne, 24 accessions montrent une résistance contre *Va* V31.2 (score < 2) alors que 66 de ces accessions (soit 73%) sont sensibles avec un MSS supérieur à 2,5 (**Figure 30-B**). L’AUDPC (**Figure 30-A**) quantifie la vitesse d’évolution du développement des symptômes permettant d’identifier des lignées montrant un même niveau de symptômes final mais avec des cinétiques de développement de maladie très différentes.

L’ANOVA met en évidence un effet significatif en fonction des accessions sur les phénotypes MSS et AUDPC (P-value <e-10, **Tableau 14**) indiquant que la réponse à *Va* V31.2 dépend du génotype de la lignée. Il existe donc une variabilité génotypique pour la réponse à cette souche du pathogène au sein de la population Soliman. Le contrôle génétique de la réponse au pathogène peut donc être étudié par génétique d’association sur la base de l’analyse de ces deux paramètres de maladie.

Tableau 14: Tables d'ANOVA des phénotypes AUDPC et MSS en réponse à *V. alfalfae* *Va* V31.2 sous stress salin pour les accessions Soliman et « checks » de *M. truncatula*.

Source de variation	ddl	AUDPC		MSS	
		F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
Accessions	92	10.624	< 2.2e-16***	12.756	2.2e-16 ***

Le modèle d’analyse de variance est un modèle linéaire mixte (MLM) $Y_{ijk} = \mu_{\text{trait}} + \text{Accession}_i + \text{Répétition}_j + \varepsilon_{ijk}$ où le facteur ‘Accessions’ (incluant 89 accessions de la population Soliman et les 4 lignées parentales) est considéré comme un effet fixe et l’effet des répétitions biologiques indépendantes comme un effet aléatoire. L’analyse a été effectuée à l’aide de la fonction lmer du package R lmerTest. Les valeurs des P-values sont indiquées. ddl : degré de liberté, AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve, MSS : Maximum Symptom Score.

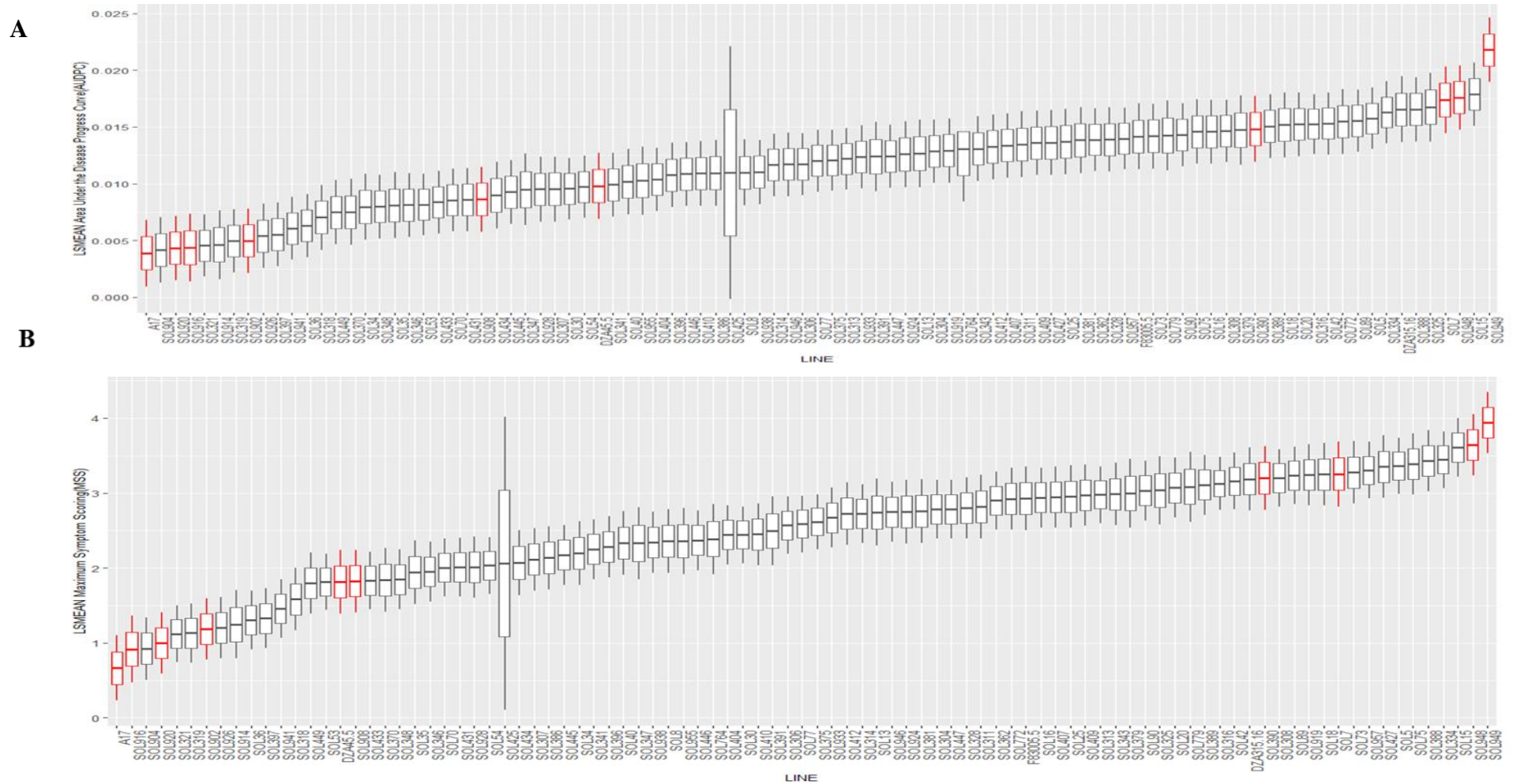


Figure 30: Boîtes à moustache représentant l’AUDPC (A) et le MSS (B) moyens ajustés par répétition (lsmeans) des 94 accessions de *M. truncatula* quatre semaines après inoculation par *V. alfalfae* Va V31.2 sous stress salin [+Verticillium/+Sel]. Les 12 accessions en rouge sont les accessions « checks ». Trois répétitions biologiques ont été effectuées. Un nombre moyen de dix plantes par accession a été inoculé.

2.3.2. Etude comparative de la réponse des accessions de la population Soliman de *M. truncatula* à *V. alfalfae* Va V31.2 dans des conditions salines et non salines.

Afin de savoir comment la salinité affecte le développement de la maladie du flétrissement vasculaire causé par *Verticillium* au sein de la population Soliman de *M. truncatula*, une analyse comparative de la réponse des plantes au stress uniquement causé par l'infection par le champignon ou combiné au stress salin a été réalisée.

Les distributions des valeurs ajustées d'AUDPC (décrivant la dynamique de flétrissement) ainsi que de MSS (évaluant la sévérité de la maladie) au sein de la population Soliman en conditions salines ou non mettent en évidence que le sel n'affecte pas la réponse à la verticilliose de toutes les lignées de la même manière (**Figure 31**). En général, le sel augmente le niveau de sévérité de la maladie et ce, tout particulièrement pour les accessions les plus sensibles. Cela suggère l'existence d'une interaction significative entre le génotype des lignées et le traitement au sel pour la réponse à la maladie.

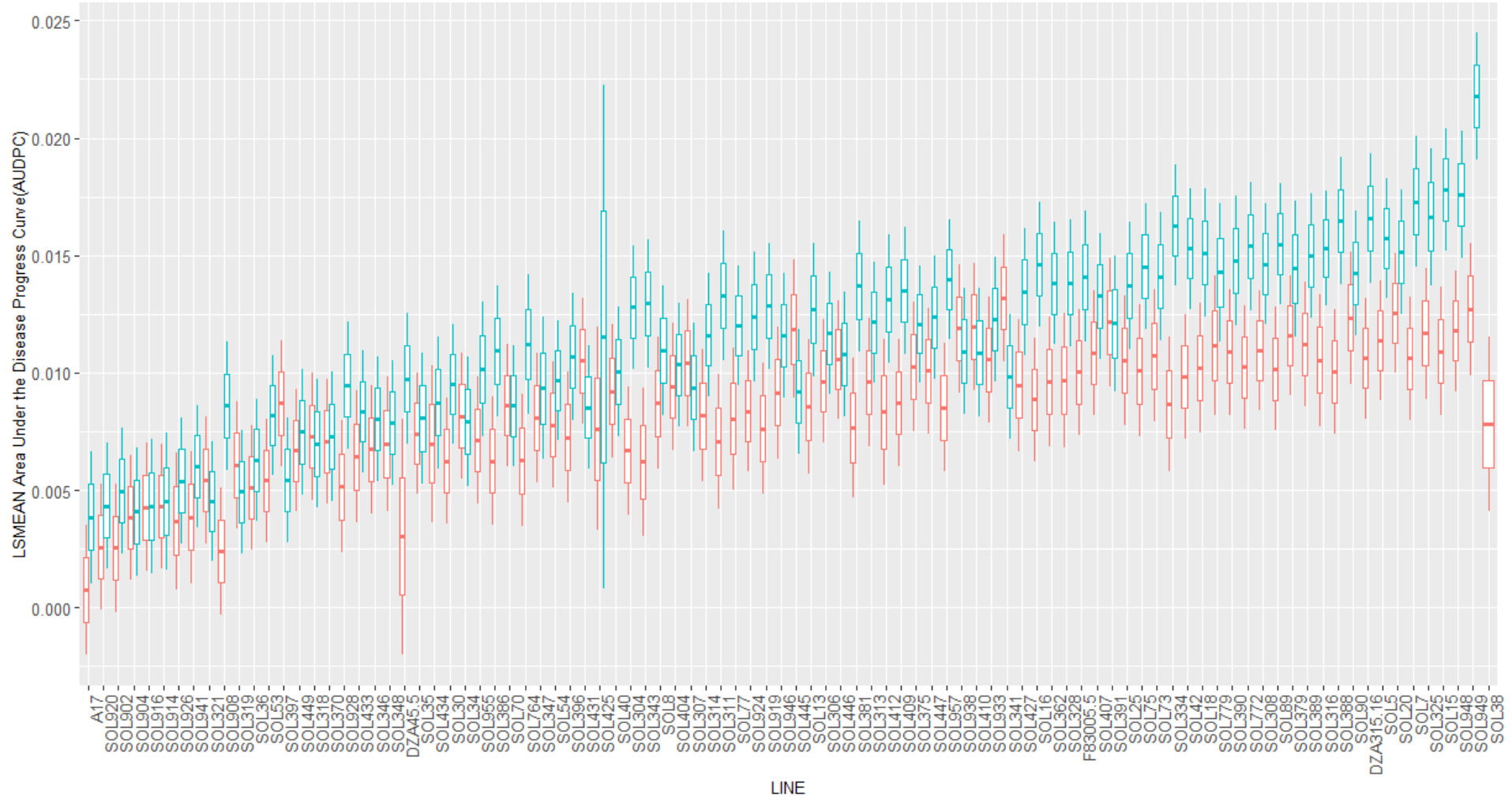
L'analyse de l'effet du génotype de la plante, du traitement en sel, et de l'interaction de ces facteurs dans le développement des symptômes de la maladie du flétrissement souligne que l'interaction entre le génotype et le traitement en sel affecte significativement la performance de la plante quel que soit le paramètre de maladie étudié (**Tableau 15**). Ce résultat indique que le traitement en sel affecte différemment la réponse à *Verticillium* au sein des accessions de *M. truncatula* de la population tunisienne de Soliman.

Tableau 15: Tables d'ANOVA des phénotypes MSS et AUDPC en réponse à *V. alfalfae* Va V31.2 des accessions Soliman et « checks » de *M. truncatula* soumises ou non au stress salin.

Source de variation	ddl	MSS		AUDPC	
		F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
Accessions	93	17.6417	< 2.2e-16 ***	14,0776	< 2.2e-16 ***
Traitement en sel	1	6.1061	0.01351 *	263,2285	< 2.2e-16 ***
Accessions : Traitement en sel	92	2.7528	2.513e-16 ***	2,5661	4.404e-14 ***

Le modèle d'analyse de variance est un modèle linéaire mixte (MLM) $Y_{ijkl} = \mu_{\text{trait}} + \text{Accessions}_i \times \text{Traitement}_j + \text{Répétition}_k + \varepsilon_{ijkl}$ où les facteurs 'Accessions' (incluant 90 accessions de la population Soliman et les 4 lignées parentales), 'Traitement' (incluant [+*Verticillium*/-Sel] et [+*Verticillium*/+Sel]) et leur interaction sont considérés comme des effets fixes et l'effet des répétitions biologiques indépendantes comme un effet aléatoire. L'analyse a été effectuée à l'aide de la fonction lmer du package R lmerTest. Les valeurs des P-values sont indiquées. ddl : degré de liberté, AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve, MSS : Maximum Symptom Score.

A



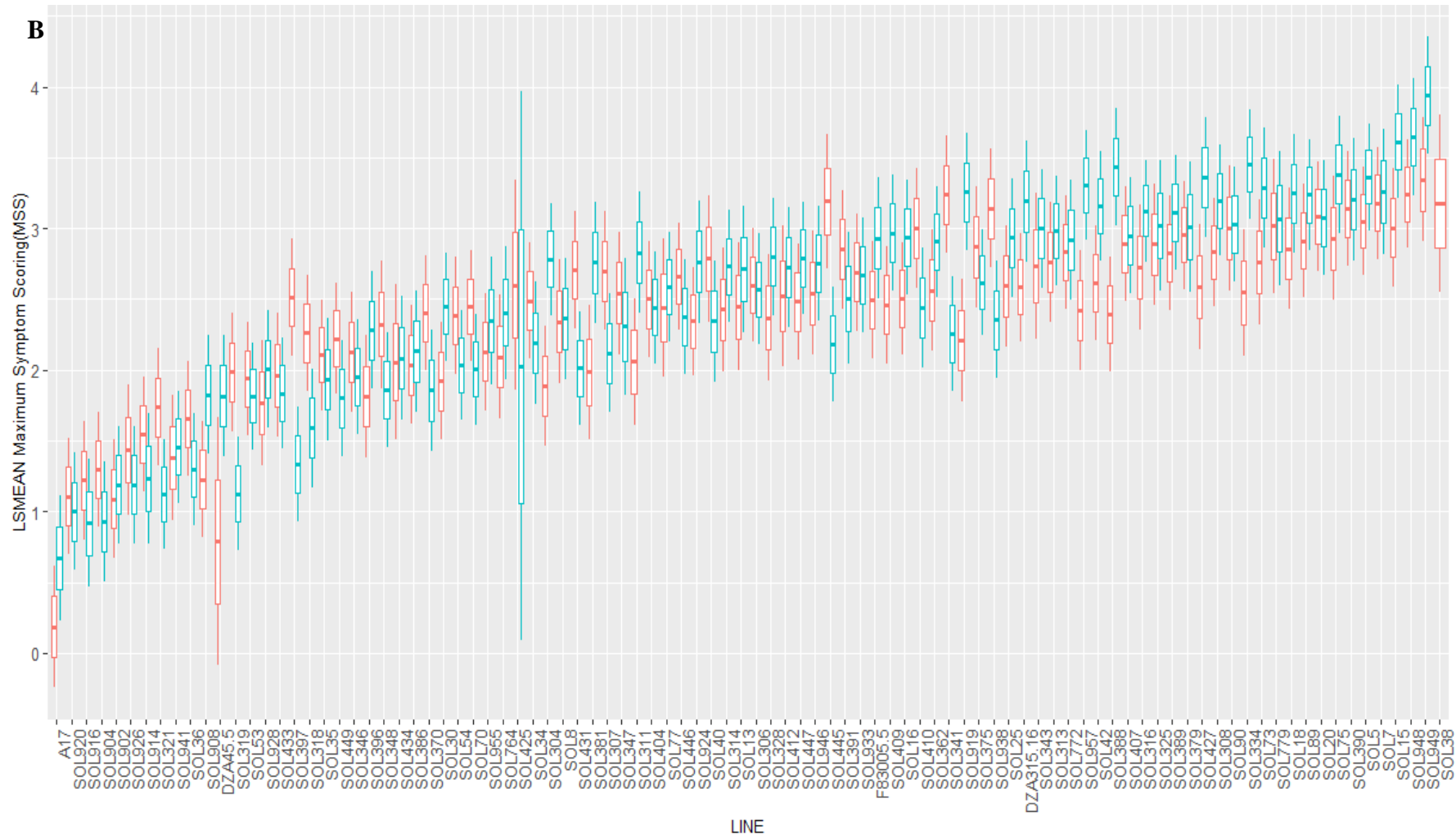


Figure 31: AUDPC (A) et MSS (B) moyens ajustés de l'effet 'répétition' des 94 accessions de *M. truncatula* (incluant les 90 accessions Soliman et les 4 lignées de référence) après inoculation par *V. alfalfae* Va V31.2 et soumises ou non au stress salin [+Verticillium/-Sel]: rouge, [+Verticillium/+Sel]: bleu. Le MSS et l'AUDPC ont été calculés à partir de l'évolution des symptômes pendant 4 semaines après l'inoculation en trois répétitions biologiques indépendantes pour chaque condition (Salt et No Salt). Données en conditions non salines obtenues par M. Mazurier (2018).

L'effet des deux stress combinés (*V. alfalfae* et le sel) sur la réponse de la plante n'est pas seulement additif mais dépend du génotype de la plante. Comme indiqué précédemment, le stress salin accroît la sensibilité des accessions et ce, tout particulièrement pour les plus sensibles. Ainsi, pour les accessions SOL7, SOL15, SOL948, SOL_949 le sel augmente très fortement leur sensibilité vis-à-vis de *Va* V31.2. Par ailleurs, le sel n'a presque pas d'effet sur la réponse à la maladie pour les accessions A17, SOL902, SOL904, SOL916 et SOL920. De manière très intéressante, le sel diminue significativement la sensibilité des accessions SOL25, SOL53, SOL321 et SOL341 vis à vis de *Va* V31.2 (**Figure supplémentaire 1**).

Une étude de génétique d'association sur ces données sera intéressante afin (i) de comparer l'architecture génétique de la réponse à la verticilliose en condition saline ou non, au sein d'une population originaire d'une plaine salée, (ii) d'identifier des QTL de résistance à *V. alfalfae* *Va* V31.2 en condition saline, qui serait potentiellement propre à cette population.

2.2.3. Analyse de GWAS pour la résistance à la verticilliose au sein de la population tunisienne Soliman de *M. truncatula* soumise ou non à un stress salin et identification de gènes candidats

L'analyse de GWAS a été réalisée sur les données phénotypiques moyennes marginales (lsmmeans) d'AUDPC et de MSS corrigées de l'effet 'répétition expérimentale' des 90 accessions de la population tunisienne de *M. truncatula* de la plaine salée de Soliman. Les données des plantes traitées au sel et des plantes non traitées au sel ont été analysées séparément. Plusieurs modèles d'analyse de GWAS ont été testés afin de sélectionner le plus approprié permettant de réduire les faux positifs et de faire face aux associations dues à la parenté entre les accessions et à la structure de la population: le GLM, le MLM, le CMLM et le FarmCPU (*cf* Matériel et Méthodes, page **103**).

La **Figure 32** représente les Q-Q plots obtenus pour chacun des quatre modèles sur les données phénotypiques d'AUDPC (**Fig. 32-A**) et de MSS (**Fig. 32-B**). En théorie, l'ensemble des P-values (exprimées ici en $-\log_{10}(p)$) doivent suivre une loi uniforme à l'exception de la queue de distribution qui représente les P-values significatives obtenues pour le phénotype d'intérêt. Dans le cas des modèles GLM, MLM, CMLM (**Fig. 32-A, B et C**), il y a une déviation importante des P-values obtenues par rapport aux P-values attendues en dessous de la bissectrice : ces modèles les sous-estiment, ils ne sont donc pas les plus adaptés à cette analyse.

Pour le modèle FarmCPU (**Fig. 32-D**), l'allure du Q-Q plot est plus satisfaisante, seule la queue de distribution des résidus dévie des valeurs attendues et ce, en dessus de la bissectrice. En effet, les modèles multi-loci peuvent intégrer de nombreux loci, ce qui permet une meilleure précision et une plus grande fiabilité des résultats. De plus, ils peuvent également intégrer des informations supplémentaires telles que les informations d'admixture génétique et les informations de relation génétique, ce qui peut aider à

améliorer la précision des estimations.

La suite de l'analyse a donc été conduite en utilisant le modèle FarmCPU avec des niveaux de fréquence de l'allèle mineur différents ((MAF, Minor Allele Frequency : 0.1 et 0.2 ; **Figure supplémentaire 2**). Les SNP rares avec une faible fréquence d'allèle mineur (MAF) causent généralement des faux positifs, en particulier pour les petits échantillons et les caractères qui n'ont pas une distribution normale. Cependant, de nombreux variants génétiques causaux sont rares. Une pratique recommandée est de ne pas les supprimer, mais de les interpréter avec prudence en filtrant les SNP dans les rapports GWAS.

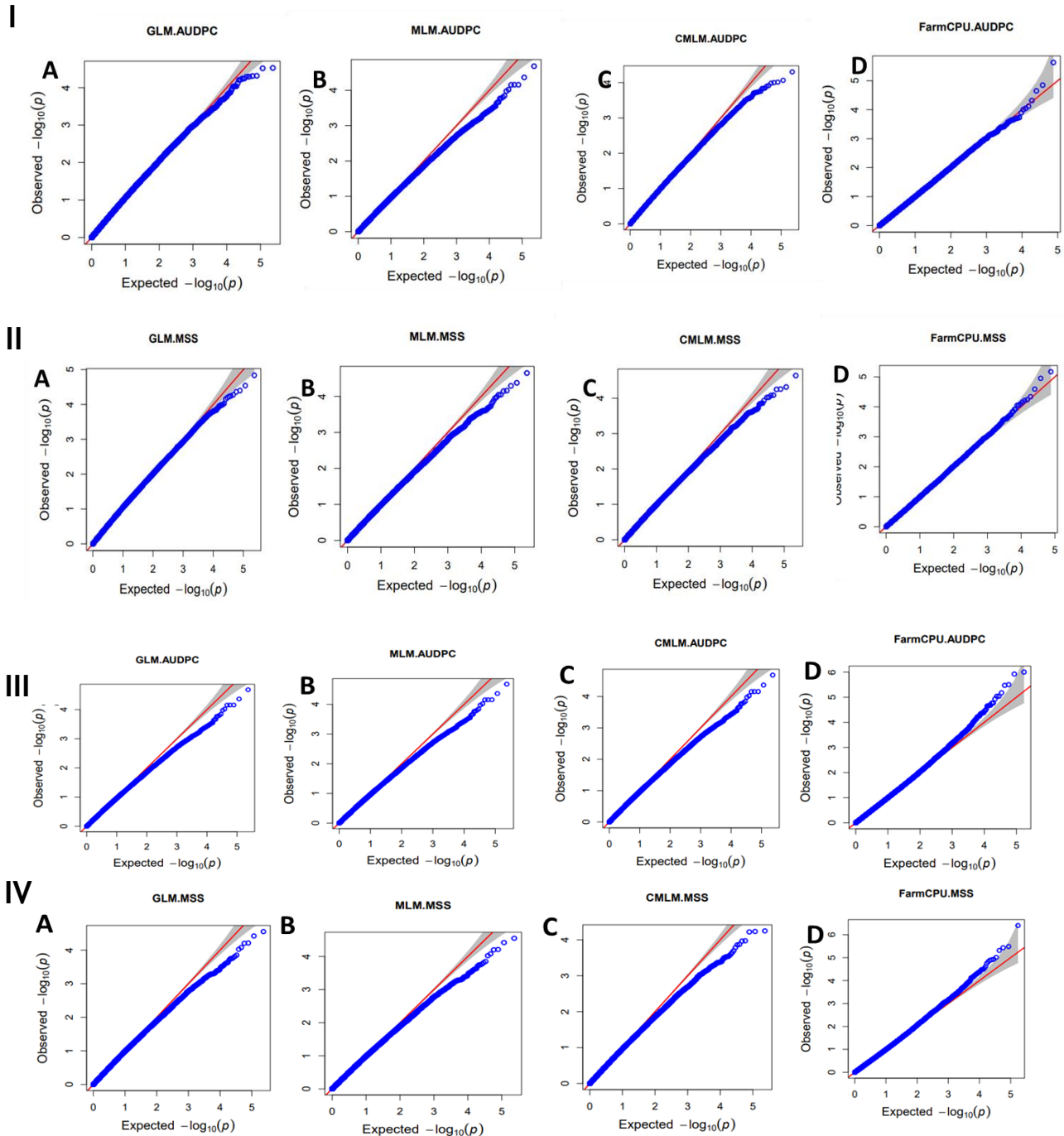


Figure 32 : Q-Q plots des analyses GWAS réalisées sur l'AUDPC (I, III) et MSS (II, IV) en stress combinés ([+Verticillium/+Sel], I et II), stress *Verticillium* seul ([+Verticillium/-Sel]) III et IV) avec les modèles GLM (A), MLM (B), CMLM (C) et FarmCPU (D) avec MAF=0.1. La matrice de parenté Kinship ainsi que la structure des populations utilisées sont

celles calculées automatiquement par le logiciel GAPIT. Chaque point représente pour un SNP la valeur observée de la *P-value* en fonction de sa valeur théorique selon une loi uniforme: plus les points suivent la bissectrice représentée en rouge et plus le modèle est performant.

Les Manhattan plots obtenus pour les phénotypes AUDPC et MSS dans les deux conditions de stress – stress ‘Verticillium’ seul [+Verticillium/-Sel] et stress ‘Verticillium’ et ‘sel’ combinés [+Verticillium/+Sel] - sont présentés **Figure 33 A-B**.

A l’exception de rares pics sur le chromosome 8 observés en condition saline pour l’AUDPC et le MSS et en condition non saline pour le MSS, la plupart des SNP au score élevé sont isolés sur les différents chromosomes. Le fait que l’on ne distingue ni pics ni massifs de SNP significatifs peut être dû au modèle FarmCPU utilisé, qui se caractérise par l’élimination de tous les SNP significatifs proches des SNP les plus fortement significatifs pour une même région génomique. Une autre hypothèse peut être la densité de génotypage.

Dans des conditions non salines, au total 14 SNP ont été trouvés comme étant significativement associés à la réponse à *V. alfalfae* par GWAS sur les deux paramètres de maladie, MSS et AUDPC, et ce, avec un seuil arbitraire de score ≥ 4 . Leur répartition sur le génome est la suivante : cinq sur le chromosome 8, trois sur le chromosome 6 et 7, deux sur le chromosome 2 et un sur le chromosome 3.

Quatorze SNP associés à la réponse aux stress ‘Verticillium’ et ‘sel’ combinés ont été identifiés par GWAS sur les phénotypes AUDPC et MSS. Ils sont situés sur les chromosomes 4 et 5 (4 SNP chacun), 8 (trois SNP), et 1, 3 et 7 (un SNP chacun).

Le SNP le plus significatif localisé sur le chromosome 6 (chr6 : 6360793) atteint un score de 6.4 et a été détecté avec le phénotype MSS en condition de stress simple (*Va* V31.2 seul). En condition de stress combinés le SNP le plus significatif est situé sur le chromosome 5 (chr5 : 35929254) avec un score de 5.6 pour le phénotype AUDPC.

Les résultats obtenus ne montrent que peu de SNP significatifs communs aux deux paramètres de maladie AUDPC et MSS pour une même condition (4/14 et 5/14 en conditions salines et non salines respectivement, **Figure 33**), alors que les profils des Manhattan plots obtenus avec les deux phénotypes sont ressemblants, notamment en conditions salines (**Figure 33 A**). Cela peut être expliqué par le fait que la méthode FarmCPU n’identifie que le SNP avec la *P-value* la plus significative pour chaque QTL. Ainsi, un même QTL détecté avec les deux paramètres ne sera pas forcément identifié par le même SNP.

Par ailleurs aucun des SNP significatifs n’est en commun entre les deux conditions salines et non salines et les profils des Manhattan plots sont très différents en fonction des deux conditions. Ceci confirme l’hypothèse selon laquelle la réponse des plantes aux stress biotique et abiotique combinés n’est pas simplement additive, mais montre une interaction et implique donc des contrôles génétiques différents.

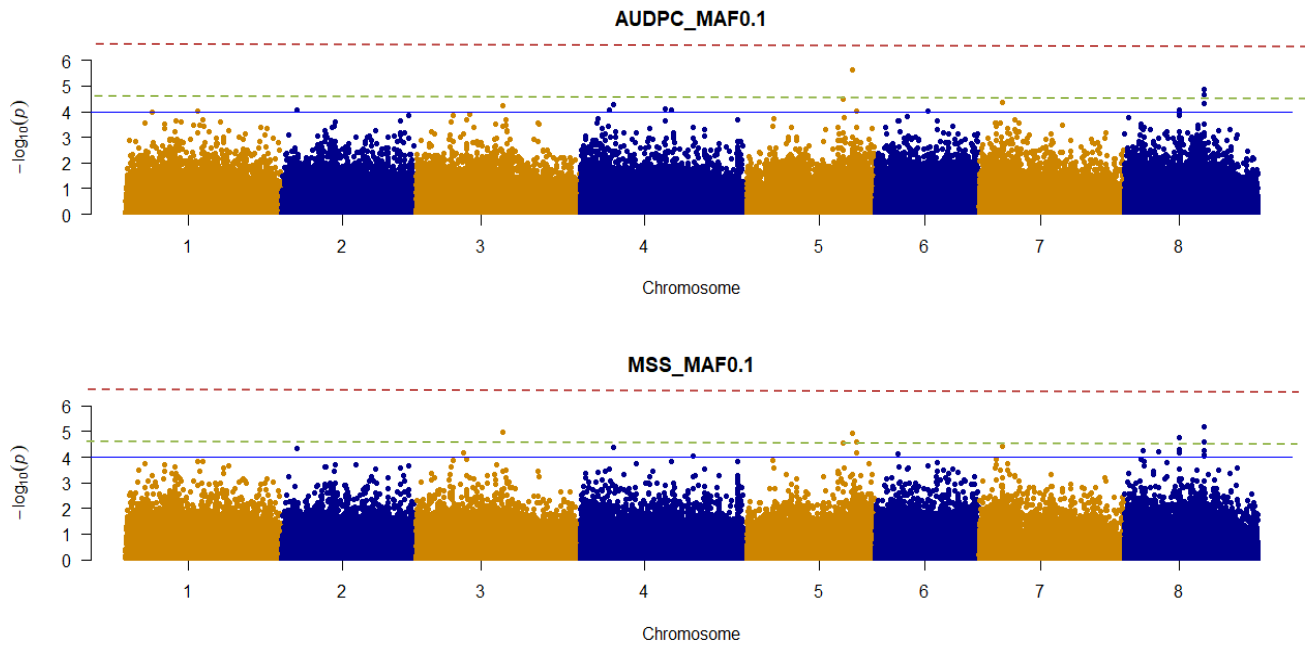
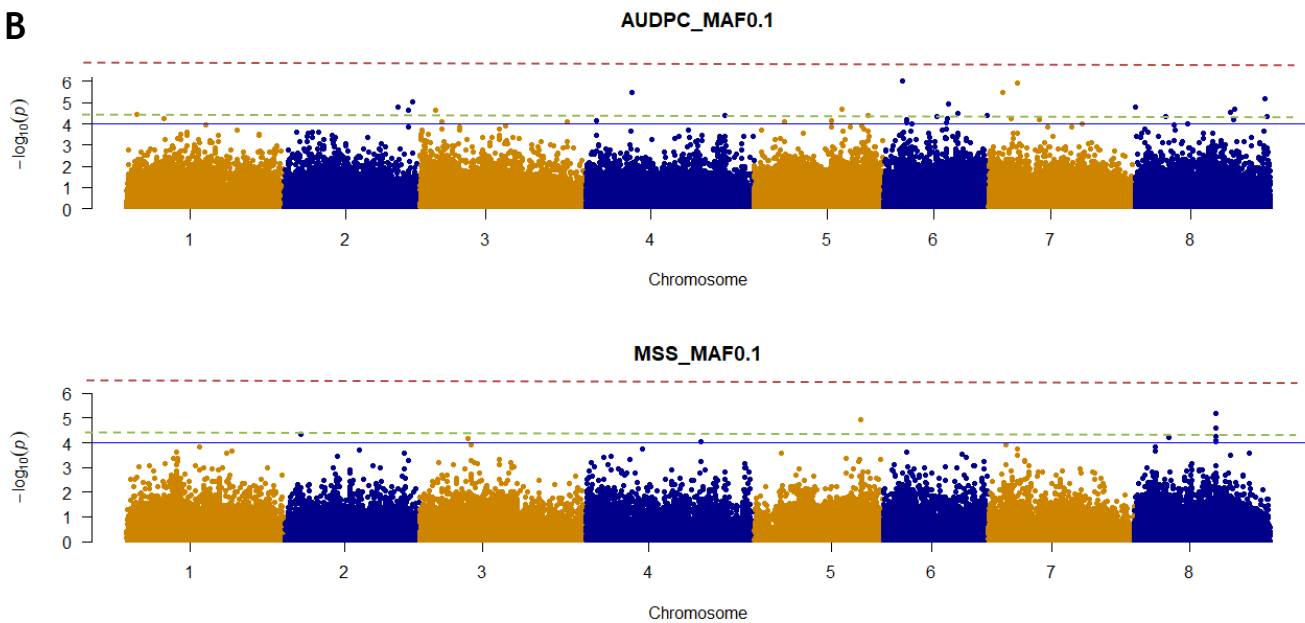
A**B**

Figure 33 : Manhattan plots obtenus pour les phénotypes AUDPC et MSS en stress [+Verticillium/+Sel] combinés (A) et Va V31.2 seul (B) selon le modèle FarmCPU avec un niveau de MAF (0.1). L'axe horizontal représente la longueur des chromosomes. Chaque point représente la probabilité que le SNP soit lié au phénotype étudié. La droite horizontale bleue marque le seuil arbitraire de 4, Les lignes rouge et verte en pointillé représentent les seuils de significativité après correction par Bonferroni et FDR respectivement.

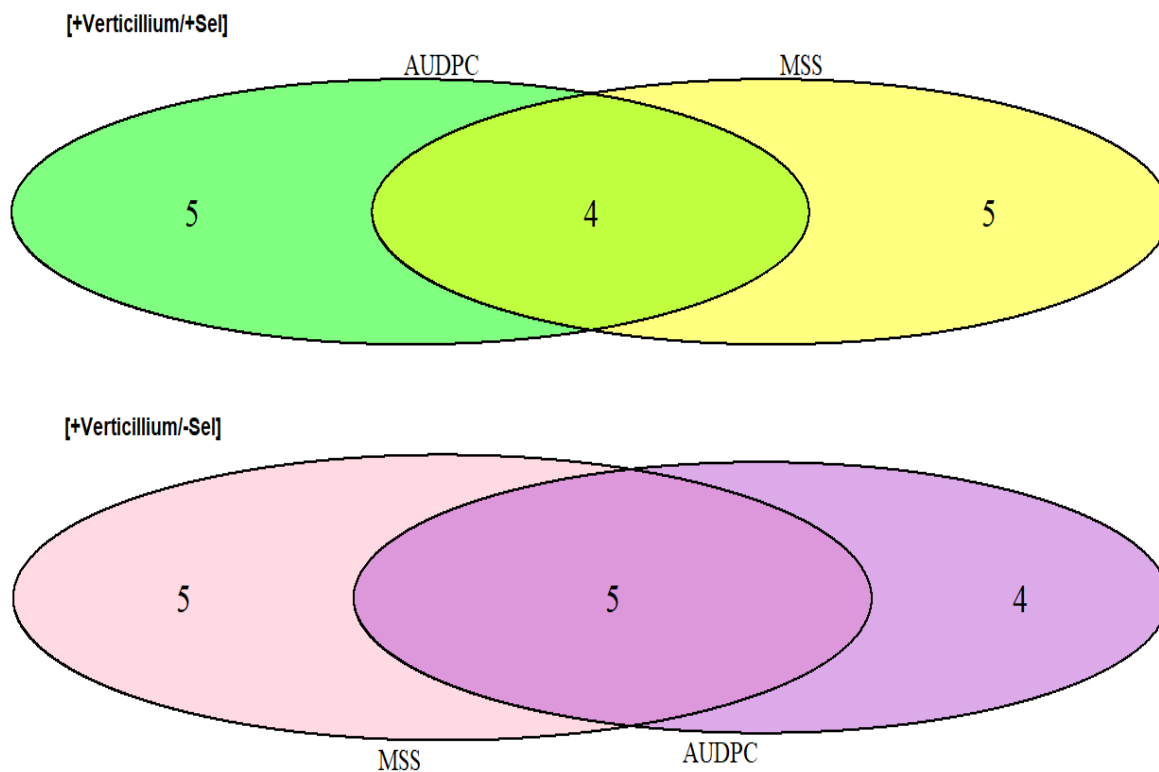


Figure 32 : Diagramme de Venn présentant le nombre de SNP significatifs à un seuil arbitraire de 4 pour les phénotypes AUDPC et MSS pour les deux conditions de stress [+Verticillium/-Sel] et [+Verticillium/+Sel].

Le **Tableau 16 (A-B)** récapitule, pour chaque phénotype pour les deux conditions de stress et par chromosome, les gènes candidats localisés dans une région de 10 kb en amont et en aval sur la base des données relatives au déséquilibre de liaison et aux taux de recombinaison décrites pour *M. truncatula* dans une étude précédente (Branca et al. 2011).

Nos résultats montrent que le sel combiné à *Va* V31.2 changent complètement l'architecture du contrôle génétique de la résistance au pathogène. Les QTL et gènes candidats associés détectés par GWAS en réponse à *Verticillium* seul sont différents de ceux obtenus en condition de stress abiotique et biotique combinés. Selon l'analyse GO (Gene Ontology) ces gènes remplissent un large éventail de fonctions biologiques, moléculaires et cellulaires (discutées dans le chapitre suivant).

Tableau 16 : Gènes candidats, identifiés par GWAS réalisées au sein de la population Soliman de *M. truncatula*, inoculée avec *V. alfalfae* Va V31.2 seul (A) ou combiné avec un stress salin (B).

A

Chromosome	Locus	Trait	Score	Genes	Position	Annotation	Fonction	GO	Category
1	24418319	AUDPC	4.0	Medtr1g055240	chr1:24407768..24410288 (- strand)	FAR1 DNA-binding domain protein	Regulation of DNA-templated transcription	GO:0032583	Biological process
3	29404325	MSS	4.98	Medtr3g065200	chr3:29412981..29415191 (+ strand)	DUF674 family protein			
		AUDPC	4.2						
4	38486218	MSS	4.05	Medtr4g096750	chr4:38495564..38498957 (- strand)	Cytochrome b561-like protein			
	28816269	AUDPC	4.12	Medtr4g075410	chr4:28816138..28833613 (- strand)	MAP kinase kinase	Proteine Kinase activity	GO:0004672	Molecular fonction
		AUDPC	4.11	Medtr4g075340	chr4:28804235..28808054 (- strand)	Translocon-associated protein alpha subunit	Endoplasmic reticulum membrane	GO:0005789	Cellular component
	31159717	AUDPC	4.07	Medtr4g080320	chr4:31147393..31151502 (- strand)	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	Defense response	GO:0006952	Biological process
5	35929254	MSS	4.95	Medtr5g083230	chr5:35918641..35920156 (+ strand)	Lateral organ boundaries (LOB) domain protein			

		AUDPC	5.63						
	37156738	MSS	4.58	Medtr5g085940	chr5:37145574..37148686 (+ strand)	Transmembrane protein, putative			
	32797442	MSS	4.53	Medtr5g076850	chr5:32786597..32791723 (- strand)	NAC transcription factor- like protein	Regulation of DNA- templated transcription	GO:000 6355	Biological process
		AUDPC	4.49	Medtr5g076920	chr5:32806624..32813118 (- strand)	Autophagy protein Apg5	Autophagy	GO:000 6914	Biological process
7	7961775	MSS	4.42	Medtr7g024290	chr7:7969039..7971938 (- strand)	Seven in absentia family protein	Ubiquitin- dependent protein catabolic process	GO:000 6511	Biological process
		AUDPC	4.3						
8	27118040	MSS	4.59	Medtr8g064630	chr8:27125562..27134062 (- strand)	Carbonic anhydrase family protein	Carbon utilization	GO:001 5976	Biological process
		AUDPC	4.84						
		6441441	MSS	4.24	Medtr8g018730	chr8:6448981..6454397 (- strand)	Seed linoleate 9S- lipoxygenase	Linoleate 13S- lipoxygenase activity	GO:001 6165

	27316016	MSS	4.23	Medtr8g065750	chr8:27325626..27326165 (+ strand)	Hypothetical protein			
	27316035	MSS	4.05	Medtr8g065750	chr8:27325626..27326165 (+ strand)	Hypothetical protein			
	27118024	AUDPC	4.31	Medtr8g064630	chr8:27125562..27134062 (- strand)	Carbonic anhydrase family protein	Carbon utilization	GO:0015976	Biological process
	11598763	MSS	4.21	Medtr8g018730	chr8:6448981..6454397 (- strand)	Seed linoleate 9S-lipoxygenase	Linoleate 13S-lipoxygenase activity	GO:0016165	Molecular fonction
		MSS	4.21	Medtr8g031060	chr8:11587468..11589390 (- strand)	Mechanosensitive ion channel domain-like protein	Transmembrane transport	GO:0055085	Biological process

B

Chromosome	Locus	Trait	Score	Genes	Position	Annotation	Fonction	GO	Category
2	43137976	AUDPC	5.03	Medtr2g100370	chr2:43120015..43128433 (+ strand)	protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B	protein phosphatase regulator activity	GO:001 9888	Molecular Function
			4.93						
	43137978		5.03	Medtr2g100410	chr2:43146876..43150214 (+ strand)	60S ribosomal L28-like protein	ribosome	GO:000 5840	Cellular Component
			4.93						
3	5117306	MSS	4.94	gene_685	chr3:5106664..5109824 (+ strand)	RNA-directed DNA polymerase (Reverse transcriptase) [Medicago truncatula]			
6	6131991	MSS	4.43	Medtr6g016430	chr6:6121797..6125934 (- strand)	NBS-LRR disease resistance protein	defense response	GO:000 6952	Biological Process
			4.49						
	6360793		6.3	Medtr6g016650	chr6:6347139..6351581 (- strand)	proline dehydrogenase	proline dehydrogenas e activity	GO:000 4657	Molecular Function
			6.4						
			AUDPC						
	5.88								
21369092	MSS	6.31	Medtr6g016660	chr6:6367990..6370782 (+ strand)	DUF1262 family protein				
		6.40							

		AUDPC	6.00		chr6:21378274..21379479 (- strand)	F-box protein interaction domain protein			
			5.88						
			4.15						
7	4601816	MSS	5.36	Medtr7g015170	chr7:4590892..4594091 (- strand)	NLI interacting factor-like phosphatase	protein binding	GO:000 5515	Molecular Function
			5.43						
		AUDPC	5.50						
	9825536	MSS	4.61	Medtr7g028710	chr7:9834174..9835710 (+ strand)	WRKY family transcription factor	DNA-binding transcription factor activity	GO:000 3700	Molecular Function
		AUDPC	5.92						
			5.39						
	31389641	MSS	4.82	Medtr7g081735	chr7:31376420..31384349 (+ strand)	COP9 signalosome complex subunit-like protein	protein binding	GO:000 5515	Molecular Function
8	10361774	MSS	4.47	Medtr8g077890	chr8:33161160..33163766 (- strand)	polyol/monosaccharide transporter 1	transmembran e transporter activity	GO:002 2857	Molecular Function
		MSS	4.47	Medtr8g028030	chr8:10367089..10377430 (+ strand)	rRNA processing/ribosome biogenesis protein			
	43502981	AUDPC	5.17	Medtr8g103265	chr8:43490196..43493015 (- strand)	ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein			

	33151337	MSS	4.82	Medtr8g077890	chr8:33161160..3316376 6 (- strand)	polyol/monosaccharide transporter 1	transmembrane transporter activity	GO:0022857	Molecular Function
			4.88						
		AUDPC	4.11						
	43502981	AUDPC	5.17	Medtr8g103420	chr8:43512895..43519018 (+ strand)	like-COV protein			

Ce tableau répertorie, pour chaque chromosome (Chr), les gènes situés dans une région de 10 Kb de part et d'autre des SNP possédant un score supérieur à 4 pour chacun des traits étudiés (MSS et AUDPC). Le score de chacun des SNP correspond à $[-\log_{10}(P\text{-value})]$ et a été obtenu pour chacun des traits selon un modèle FarmCPU incluant la structure de la population et l'apparentement entre les accessions. Les gènes dont le nom et l'annotation sont en gras correspondent aux gènes détectés avec les deux traits dans la même condition. Les SNP significatifs sélectionnés ont été explorés à l'aide du site JBrowser et et l'annotation GO à l'aide du site Gene Ontology Resource.

3. DISCUSSION

3.1. L'effet du stress salin sur la réponse des plantes au pathogène dépend du génotype des accessions et de leur mécanisme de résistance.

L'analyse de la réponse à *Verticillium* au sein de la population Soliman de *M. truncatula* soumise ou non à un stress abiotique « la salinité » a permis de mettre en évidence une biodiversité de la réponse des différents génotypes de plante au pathogène dans le cas de stress simple ou combiné, avec une distribution continue au sein de la population incluant des accessions tolérantes, partiellement résistantes, et sensibles.

Les facteurs environnementaux de type abiotique tels que la température, la disponibilité en eau, l'humidité relative, la lumière et le rythme circadien influencent considérablement la défense des plantes et l'invasion des pathogènes (Garrett et al. 2006). Par exemple, une faible variation de la température peut affecter la croissance des plantes, mais aussi leur réaction aux parasites et aux agents pathogènes (Hua 2013). La réponse à une combinaison de stress abiotique et biotique est généralement dominée par le stress abiotique, au détriment de la résistance aux agents pathogènes (Chojak-Koźniewska et al. 2018).

La salinité peut affecter la résistance des plantes aux pathogènes de différentes manières, en fonction des accessions végétales, du pathogène, du scénario du stress salin (intensité du stress salin imposé) ainsi que de leurs interactions (Pandey et Senthil-Kumar 2019). Kissoudis et al. (2016) ont testé l'effet de différents niveaux de stress salin allant de léger à sévère (50, 100 et 150 mM NaCl) sur la résistance à l'oïdium et la performance globale de lignées de tomate avec des niveaux contrastés de résistance partielle. La résistance à l'oïdium a été affectée par le stress salin d'une manière dépendante du génotype et de l'intensité du stress. Une sensibilité accrue avec une sénescence accélérée semblable à la mort cellulaire a été observée sous un léger stress salin (50 mM) dans les lignées sensibles et partiellement résistantes. En revanche, un stress salin sévère (150 mM) a atténué les symptômes de la maladie. De manière générale, ces résultats mettent en évidence l'importance de la sévérité du stress et du type de résistance sur la performance de la plante sous la combinaison de stress abiotique et biotique. Les résultats de notre étude sur l'effet du sel sur la réponse à la verticilliose chez *M. truncatula* sont cohérents avec cette étude: tel que montré par l'analyse des paramètres phénotypiques d'AUDPC et de MSS, l'ajout d'un facteur de stress supplémentaire, la salinité, influe sur la cinétique d'évolution et la sévérité de la maladie, et ce différemment en fonction du génotype de la plante.

Il est intéressant de noter que, pour les plantes tolérantes à *Va* V31.2, l'ajout du sel augmente généralement leur résistance au stress biotique. Ceci est en accord avec les résultats d'Aver'yanov et al. (1993) où le stress thermique entraîne une accumulation de radicaux superoxydes et une résistance à la pyriculariose du riz.

Inversement pour les plantes sensibles, le traitement en sel influence négativement la résistance et augmente leur sensibilité au pathogène. Dans le même contexte, le stress salin augmente de manière significative la colonisation des pousses et des racines de porte-greffes de pistachier par *V. dahliae* (Saadatmand et al. 2008). En effet, tous les porte-greffes étaient sensibles à *V. dahliae*, mais les symptômes de la maladie sont apparus plus tôt chez le cultivar sensible au sel (Mohammadi et al. 2007). Par ailleurs, une combinaison du stress salin avec l'inoculation par *Fusarium oxysporum f. sp. cepae* (FOC) chez l'oignon a montré un effet plus radical du stress sur la sévérité de la maladie et la croissance de la plante par rapport au stress individuel (Shoaib et al. 2018). Enfin, Besri (1993) a montré que des hybrides de tomates résistants à la race 1 de *Verticillium dahliae* conservent leur résistance lorsqu'ils sont cultivés et irrigués avec des eaux non salées, par contre, leur résistance à la même race est rompue lorsqu'ils le sont avec des eaux salées. Cependant, lorsque du sel est ajouté au substrat et à l'eau d'irrigation, les cultivars de tomates résistants à la race 1 deviennent sensibles à cette race. En effet, l'augmentation de la salinité du milieu entraîne une croissance mycélienne accrue du champignon, ainsi qu'une multiplication des conidies et des microsclérotés.

Les plantules de tomate irriguées avec des eaux salées sont plus sensibles à l'agent pathogène que celles irriguées avec des eaux douces. Les hybrides résistants à la race I du parasite conservent leur résistance lorsqu'ils sont cultivés et irrigués avec des eaux non salées. Par contre, leur résistance à la même race est rompue lorsqu'ils sont avec des eaux salées.

Ainsi, dans certains cas, le sel peut favoriser la croissance et la sporulation du pathogène. Par exemple, une étude menée sur la réponse à la fusariose chez le pois chiche a montré que la salinité du sol favorise la croissance de *Fusarium sp.* et pousse l'agent pathogène à modifier son mode de vie pathogène vers l'état nécrotrophe en contournant l'état hémibiotrophique (Maharshi et al. 2021). Dans d'autres cas, le sel peut inhiber la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des spores de divers pathogènes de la pomme de terre : *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani var. coeruleum*, *Phytophthora erythroseptica*, *P. infestans*, *Verticillium albo-atrum* et *V. dahliae* (Mills et al, 2004). Dans notre cas, des études préalables ont prouvé que la concentration de sel utilisée (150mM) n'avait pas d'effet sur la croissance mycélienne ou la capacité de sporulation de la souche Va V31.2 de *V. alfalfae* (C. Ben, communication personnelle). D'autre part, le sel n'a pas affecté la colonisation des plantes par le champignon sur les douze accessions « checks », quel que soit le statut résistant ou sensible à Va V31.2 de ces lignées. Le sel agirait donc sur la régulation des voies de défense des plantes, et ce différemment en fonction de leurs mécanismes de résistance, et/ou sur la modulation de la virulence du pathogène (par exemple, sur la capacité à synthétiser une toxine) et non sur la fitness du champignon. Cependant, il pourrait être intéressant de réaliser un diagnostic de l'effet du sel sur la colonisation des plantes par le pathogène sur l'ensemble de la population. Nous pourrions envisager pour cela d'effectuer un dosage moléculaire du pathogène dans la plante en quantifiant l'ADN fongique dans les parties aériennes des plantes par PCR

quantitative en temps réel à différents temps après l'inoculation par le champignon en conditions salines ou non (par exemple au moment de l'apparition des premiers symptômes et en fin d'expériences ~ 4 semaines après l'inoculation) (Sbeiti et al. 2023). Cette technique a l'avantage d'être à la fois plus précise et sensible et à plus haut débit que l'approche microbiologique mais a l'inconvénient d'amplifier l'ADN du pathogène présent dans la plante que celui-ci soit vivant ou mort.

Enfin, dans notre étude, le sel a réduit les symptômes de la maladie chez certaines accessions sensibles par rapport à leurs réponses à *Va* V31.2 seul, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Kissoudis et al. (2016) chez la tomate où une diminution de la sensibilité à *Phytophthora* (agent causal du mildiou) est observée dans des conditions de stress sévère combiné entre la salinité et le mildiou.

Les réponses différentes des accessions Soliman à la verticilliose en fonction de l'ajout d'un facteur de stress supplémentaire (le sel) nous donne un indice sur l'existence d'une interaction entre les voies de défense en réponse aux deux stress biotique et abiotique: (i) l'activation précoce des voies de défense due au pré-traitement au sel semble aider les plantes les plus tolérantes à surmonter la maladie de la verticilliose ; (ii) au contraire, les plantes les plus sensibles à la verticilliose ne semblent pas bénéficier de cet effet de 'priming' (amorçage) des voies de défense par le pré-traitement au sel et la combinaison des deux stress accentue la sévérité de la maladie.

Nos résultats sur la biodiversité de la réponse phénotypique en réponse à deux stress combinés au sein de la population Soliman, qui démontrent clairement l'existence d'une interaction entre le génotype de la plante et les conditions d'inoculation par *Verticillium* en combinaison ou non avec le stress salin, nous ont incités à aller de l'avant en recherchant la base génétique de la réponse aux stress combinés en comparaison de celle contrôlant la réponse au stress biotique seul.

3.2. Un contrôle génétique différent de la réponse à la verticilliose en conditions saline et non-saline révélée par GWAS

3.2.1. Une architecture génétique de la réponse à la verticilliose très dissemblable en conditions saline et non-saline

Quelque soit le paramètre de maladie étudié (AUDPC ou MSS), les SNP montrant une association statistique significative avec la réponse à la verticilliose, et plus généralement les QTL de résistance, obtenus par l'analyse de GWAS réalisée sur la population Soliman de *M. truncatula* en condition de stress salin sont différents de ceux obtenus en condition de *V. alfalfae* seul. Ceci confirme notre hypothèse selon laquelle la réponse aux stress combinés n'est pas seulement additive mais dépend d'une interaction des deux voies de défense. Cela est en accord avec les résultats obtenus chez le maïs où le caractère d'uniformité de la hauteur des plantes dans les environnements de stress combinés 'sécheresse' et 'déficience en N' présente une architecture génétique différente de celle des traitements à stress unique (Buddhika Makumburage et

Stapleton 2011). Par ailleurs, les réponses phénotypiques et transcriptomiques de l'haricot au stress biotique et abiotique combiné : *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* et le stress hydrique sont différentes de celle obtenue lors de l'exposition aux stress individuels. Cette différence s'est manifestée par l'activation d'un réseau de gènes dont les catégories fonctionnelles les plus représentées sont liées au stress, à la signalisation, à la paroi cellulaire, au métabolisme hormonal et au métabolisme secondaire. Des gènes ont été activés à la fois dans les stress simples et combinés pour les deux accessions résistante et sensible. D'autres gènes différentiels exclusifs de l'accession résistante ont été exprimés dans le cas de stress combiné uniquement (Leitão et al. 2021).

Ben et al. (2013) ont révélé un QTL majeur contrôlant la résistance à *Va* V31.2 sur le chromosome 7, ce qui a été confirmé ultérieurement par une étude de GWAS menée sur le panel de diversité MtHAPMAP (Mazurier, 2018). Notre étude n'a pas montré de QTL en commun avec ces résultats. Cela suggère différents contrôles génétiques impliqués dans la réponse à *Verticillium* au sein de la population Soliman révélant des allèles rares ou inexistantes dans le panel de biodiversité du MtHAPMAP. Nos résultats soulignent l'importance de diversifier les ressources génétiques végétales étudiées pour analyser le contrôle génétique de traits agronomiques et écologiques d'intérêt. Du fait de la sélection naturelle, la population Soliman, originaire d'une plaine salée, a pu s'adapter à cette contrainte et sélectionner des allèles de gènes de rusticité permettant une meilleure tolérance à divers stress environnementaux abiotiques (telle que la salinité) mais également vis-à-vis des stress biotiques.

L'ensemble de ces résultats montrent la diversité des mécanismes génétiques de résistance de *M. truncatula* aux stress combinés. Ces mécanismes peuvent inclure des changements dans l'expression génétique, des modifications de la structure des protéines et des modifications de la composition chimique des cellules. De ce fait l'analyse de GWAS a révélé plusieurs gènes candidats impliqués dans la réponse au stress dû à la verticilliose seule ou combinée au stress salin sur les chromosomes 1, 3, 4, 5, 7 et 8 (**Tableau 16**).

3.2.2. Gènes candidats en réponse au stress 'Verticilliose' seul.

En réponse à *V. alfalfae* seul, plusieurs gènes candidats ayant un rôle dans la réponse au stress biotique ont été identifiés. Ils sont impliqués dans différentes fonctions et processus :

1) *Processus cellulaire* : le gène **Medtr2g100410** code pour une **60S ribosomal L28-like protein**. Non seulement les protéines ribosomales sont des protéines d'échafaudage nécessaires au maintien de l'intégrité structurelle des ribosomes matures, mais certaines participent également à des activités de régulation dans divers processus du cycle cellulaire, du développement et de la mort cellulaire (Lindström 2009). Une étude transcriptomique chez *Arabidopsis thaliana* a révélé une surexpression de cette protéine 48 h après inoculation en réponse à *Agrobacterium tumefaciens* (Ditt et al. 2006).

2) *Processus biologique* : le gène candidat **Medtr6g016430** code pour une **NBS-LRR (Nucleotide-**

Binding Site-Leucine-Rich Repeat) disease resistance protein. Ces protéines sont impliquées dans diverses fonctions, telles que les inhibiteurs de protéases qui agissent pour bloquer la nutrition du pathogène, le renforcement de la paroi cellulaire ou encore la régulation de l'homéostasie cellulaire (Gonzaga et al. 2022). Il a été signalé par Williamson et Kumar (2006) que des protéines avec des domaines typiques pour les protéines R intracellulaires (protéines NBS-LRR) et des facteurs de transcription WRKY étaient associées au système immunitaire d'*A. thaliana*.

3) *Processus moléculaire* : Le gène **Medtr2g100370** code pour une **protéine phosphatase**. Les protéines phosphatases sont considérées comme un composant essentiel contrôlant les réactions de défense dans diverses espèces végétales. Chez la tomate, les feuilles des plantes résistantes sont caractérisées par une accumulation des protéines phosphatases en réponse à *Alternaria alternaria* (Sadeghi et al. 2022). Des études génétiques, protéomiques et métabolomiques ont mis en évidence la nature universelle des protéines phosphatases en tant que régulateurs de la signalisation des récepteurs et des organites, de l'expression génétique, des voies métaboliques et de la mort cellulaire, processus biologiques qui ont un impact significatif sur l'immunité des plantes (Máthé et al. 2019).

Le gène **Medtr3g082770** code pour une **Nudix Family Hydrolase** (nucleoside diphosphates linked to some moiety X). Ces enzymes sont des intermédiaires métaboliques clés et des molécules de signalisation qui catalysent l'hydrolyse d'une variété de dérivés de nucléosides diphosphates sont souvent toxiques pour la cellule. Il a été proposé chez *A. thaliana* que les Nudix hydrolases jouent un rôle d'enzymes de nettoyage en se débarrassant des nucléosides diphosphates toxiques et excessifs et en maintenant ainsi une homéostasie cellulaire normale (Ogawa et al. 2005).

D'autres gènes candidats ont un rôle dans le transport membranaire, dans l'activité déshydrogénase de proline ainsi que dans les liaisons protéiques. Il s'agit des gènes **Medtr6g016650**, **Medtr7g015170**, **Medtr7g081735** et **Medtr8g077890** codant respectivement pour une **proline déshydrogénase**, une **NLI interacting factor-like phosphatase**, une **COP9** (Constitutive photomorphogenesis 9) **signalosome complex subunit-like protein** et une **polyol/monosaccharide transporter 1 protein**. Chez *Arabidopsis*, l'accumulation de la proline constitue une stratégie de défense contre le pathogène *Pseudomonas syringae* (Fabro et al. 2004). Quant aux transporteurs de polyols/monosaccharides, ils jouent un rôle dans le chargement et le déchargement des phloèmes (Dusotoit-Coucaud et al. 2010), ainsi que dans le métabolisme de certains champignons et les interactions plantes-pathogène (Solomon et al. 2007). En outre, le signalosome COP9, qui est un complexe multi-protéique qui régule les activités des culline-RING E3 ubiquitine ligases (CRL), joue un rôle crucial dans la réponse de défense des plantes contre les herbivores et les pathogènes (Hind et al. 2011). Les CRL ubiquitinisent les protéines afin de les cibler pour la dégradation protéasomique.

3.2.3. Gènes candidats en réponse aux deux stress combinés

Selon l'annotation fonctionnelle GO, les gènes impliqués dans les processus biologiques liés à la tolérance au stress abiotiques et biotiques sont prédominants sous des conditions de stress combinés [+Verticillium/+Sel] avec huit gènes candidats. Ainsi, parmi les gènes identifiés, certains codent pour des protéines dont le rôle dans les voies de défense ou de réponse aux stress est bien connu.

C'est par exemple le cas du gène **Medtr4g080320** codant pour une **TIR-NBS-LRR** (Toll/Interleukin1 receptor nucleotide-binding site leucine-rich repeat) **disease resistance protein** constituant un gène candidat putatif de la réponse spécifique au pathogène. Ces protéines sont spécifiquement reconnues par les produits des gènes de résistance des plantes aux maladies (R). Ils sont impliqués, directement ou indirectement, pour activer la résistance des plantes aux maladies, comme la réponse hypersensible (HR) et la résistance systémique acquise (SAR) (Künstler et al. 2016). Chez le coton, il a été démontré qu'une TIR-NBS-LRR protéine compte parmi les facteurs majeurs de résistance aux maladies (Shi et al. 2018), et le gène GhDSC1 s'est avéré être le médiateur de la résistance au flétrissement verticillien (T. G. Li et al. 2019). Chez *M. sativa*, l'inoculation par *V. alfalfae* provoque une sur-expression du gène MtVR130 l'homologue du MsVR38 (code pour TIR-NBS-LRR) chez des cultivars résistants (Lin et al. 2022).

Il en est de même pour les gènes **Medtr4g075410** et **Medtr8g018730** codant pour une **Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK)** et une **Seed linoleate 9S-lipoxygenase** protéine respectivement. Les MAP Kinases des plantes sont impliquées dans la signalisation des stress biotiques et abiotiques (Zhang et Klessig 1998, Kovtun et al. 2000). Il a été démontré que la suppression du gène AT1g73660 codant pour une MAPKKK interfère avec la résistance aux maladies et le développement des plantes chez le tabac (Jin et al. 2002). Les gènes MAPKKK sont induits par le sel chez *Arabidopsis* et régulent négativement la tolérance au sel *via* une phosphorylation spécifique (Gao and Xiang 2008). De même, il est reconnu que la lipoxygénase joue un rôle important dans le développement des plantes et dans la réaction aux stress biotiques et abiotiques (Santino et al. 2013). Chez la légumineuse modèle *M. truncatula*, une analyse transcriptomique des apex de racines traitées au sel a montré que la **linoleate 9S-lipoxygenase** est parmi les gènes clés surexprimés impliqués dans le métabolisme des oxylipines, qui sont des composés dérivés d'acides gras libres et dont le groupe le plus important est composé des jasmonates. L'acide jasmonique représente la plus importante molécule de signalisation, chez le génotype A17 tolérant au sel, dans des conditions de stress salin (Gruber et al. 2009).

Les gènes **Medtr1g055240** et **Medtr5g076850**, qui codent pour **FAR1 DNA-binding domain protein** et **NAC transcription factor-like protein** respectivement, jouent un rôle dans la régulation de la transcription liée à l'ADN (Regulation of DNA-templated transcription). Ces protéines sont impliquées dans la croissance, le développement et la tolérance au stress des plantes (Xie et Xiong 2008, Liu et al. 2019). FAR1 a un rôle régulateur de l'accumulation de ROS et dans la mort cellulaire induite par le stress oxydatif (Wang

et al. 2016). Chez *Arabidopsis*, trois gènes NAC, ANAC019, ANAC055, et ANAC072, ont été induits par la sécheresse, la salinité, et/ou les températures basses (Tran et al. 2004).

Le gène **Medtr5g076920** code pour une **Autophagy protein Apg5**, ayant un rôle de dégradation des constituants cytoplasmiques chez les eucaryotes (Yoshimoto et al. 2010). Elle est impliquée dans la croissance et le développement des plantes, ainsi que dans la réponse au stress biotique et abiotique. Chez *M. truncatula*, une analyse à l'échelle du génome des gènes liés à l'autophagie a mis en évidence leurs rôles dans le développement des graines et la réponse au stress abiotique 'sécheresse' (M. Yang et al. 2021).

Les protéines de la famille *Seven in absentia* sont impliquées dans divers stades de développement des plantes et dans plusieurs réponses au stress. L'analyse de GWAS a mis en évidence le gène candidat **Medtr7g024290** qui code pour une **Seven in absentia ubiquitin ligase**. Chez *Gossypium hirsutum*, cette protéine régule positivement la défense contre *V. dahliae* (Ren et al. 2021).

En outre, un gène candidat, **Medtr8g064630**, présentant des fonctions dans l'utilisation de carbone code pour une **Carbonic anhydrase (CAs) family protein**. Ce sont des protéines de liaison qui catalysent l'interconversion entre le CO₂ et le HCO³⁻, et qui constituent les composants essentiels des systèmes de détection et de concentration du CO₂ (DiMario et al. 2017). Plusieurs études ont rapporté l'implication des CAs dans la défense des plantes. Par exemple, l'infection d'*A. thaliana* par *P. syringae* entraîne la répression de l'expression des gènes CA1 et CA4 codant pour des carbonic anhydrases. Cela conduit à l'atténuation de la suppression médiée par CA des défenses dépendantes de l'acide salicylique et par conséquent à une résistance accrue à la maladie contre *P. syringae* (Zhou et al. 2020).

Le transport transmembranaire est un processus physiologique important dans la réponse au stress salin (Ahmed et al. 2013) et aux pathogènes (Wang et al. 2021). Le gène **Medtr4g075340** qui code pour la **Translocon-associated protein alpha subunit** joue un rôle au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). C'est une protéine essentielle dans l'intégration des signaux générés par le stress biotique et abiotique chez les plantes (Park et Park 2019). Les cellules végétales possèdent des systèmes membranaires étendus qui jouent un rôle central dans la réponse et l'adaptation aux changements environnementaux (Kosová et al. 2011). En réponse au stress salin, une augmentation d'expression de deux protéines associées à deux translocons a été enregistrée chez la betterave sucrière M14 (Li et al. 2015). Ces protéines ont la fonction de lier le calcium à la membrane du RE et de réguler ainsi la rétention des protéines résidentes du RE. Elles sont aussi impliquées dans le recyclage de l'appareil de translocation ou peuvent fonctionner comme un chaperon lié à la membrane facilitant le repliement des protéines transloquées (Sommer et al. 2013).

Les **canaux ioniques mécano-sensibles** représentent une grande famille de protéines transmembranaires qui existent dans tous les règnes de la vie (Li et al. 2020). Le gène candidat **Medtr8g031060** qui code pour cette protéine a été détecté en réponse aux stress combinés dans notre étude. Chez *Arabidopsis* cette famille

est représentée par 10 membres (Hamilton et al. 2015), avec des localisations cellulaires distinctes, ce qui les implique dans diverses fonctions physiologiques telles que l'homéostasie osmotique et la signalisation de l'intégrité de la paroi cellulaire (Veley et al. 2012). Le canal ionique mécano-sensible **MSL10** a été suggéré comme étant impliqué dans la voie de signalisation précoce déclenchée par une blessure et dans la synthèse de l'acide jasmonique, tout en étant capable de répondre aux stimuli osmotiques (Zou et al. 2016).

3.3. Modulation moléculaire de la réponse des plantes à des stress biotique et abiotique combinés.

Les processus de signalisation précoce en réponse aux stress combinés par rapport à des stress simples peuvent contribuer à recadrer les voies de signalisation et la capacité d'adaptation aux stress combinés (Bai et al. 2018). Ainsi, le déclenchement des voies de signalisation précoce dû au stress salin pourrait expliquer l'augmentation de la tolérance de certaines accessions vis-à-vis de *Va* V31.2 par rapport à leur réponse au pathogène seul.

En général, lorsque les plantes sont soumises à un stress salin, une surproduction rapide de ROS a lieu (Kohli et al. 2019). Les ROS participent aux processus de signalisation dans les compartiments sous-cellulaires et cellulaires en interagissant avec de nombreuses autres molécules de signalisation qui influencent un large éventail de réponses, tel que la MAPK et la phosphatase (Suzuki et Katano 2018). Ceci permet une activation précoce des voies de défenses contre le pathogène.

Les changements de flux ioniques sont également l'un des événements précoces lors de la reconnaissance des pathogènes pour activer les réponses de défense. Plusieurs canaux ioniques semblent fonctionner à la fois dans l'adaptation à la salinité, dans la signalisation précoce et la biosynthèse de l'acide jasmonique (Zou et al. 2016). Cette hormone participe à la défense des plantes contre les agents pathogènes (Wasternack et Hause 2013), tel que cela a été démontré pour le pathosystème *A. thaliana/Verticillium longisporum*, par exemple (Häffner et al. 2014 ; Johansson et al. 2006) et possiblement dans l'interaction *M. truncatula/V. alfalfae* (Toueni et al. 2016). L'ensemble de ces éléments bibliographiques confirme notre hypothèse de l'existence d'une interaction entre les deux voies de défense dans le cas de stress combinés.

Ainsi, les réponses variables des génotypes de plantes en ce qui concerne la sensibilité aux pathogènes sous des stress abiotiques comme la salinité pourraient être liées à des différences d'interactions entre les voies de signalisation hormonale sous-jacentes. L'interférence entre les différentes voies peut être plus cruciale pour le résultat sur le niveau de résistance/susceptibilité à un certain pathogène sous des stress combinés (Kissoudis et al. 2017). La diaphonie entre les voies de signalisation (acide abscissique, ABA, acide jasmonique, JA et éthylène, ET) a contribué à l'instabilité des résistances au mildiou chez la tomate sous stress salin. Une forte signalisation de l'ABA ou une détoxification accrue des ROS pourraient interférer négativement avec la signalisation de l'acide salicylique (SA) et la mort cellulaire (de Pinto et al. 2012).

Le rôle des phytohormones dans la modulation des voies de défense contre des stress combinés semblent dépendre du pathosystème étudié et du type et de l'intensité du stress abiotique appliqué. Ainsi, la résistance des plantes aux pathogènes peut être associée à l'expression accrue des gènes de défense induits par l'ET et le JA. Tel est le cas dans la réponse de *Nicotiana benthamiana* soumis à la sécheresse où la faible sensibilité à *Pseudomonas syringae* est associée à une plus grande expression des gènes de défense, PR5, et PDF1.2 induits par l'ET et le JA (Ramegowda et al. 2013). De la même manière, les gènes de signalisation de l'ET sont induits sous le stress combiné du nématode *Meloidogyne arenaria* et de la sécheresse chez *Arachis spp* (Mota et al. 2021). Cependant, la résistance aux agents pathogènes dans le cadre de stress combinés n'est pas nécessairement associée à une induction de gènes marqueurs de voies de signalisation. Chez la tomate soumise à la salinité ou la sécheresse combinée à l'infection par le mildiou, la surexpression du gène PR1 de SA a été associée à la sensibilité au mildiou (Sunarti et al. 2022).

L'analyse de l'expression de gènes marqueurs de défense par qRT-PCR dans les racines de *M. truncatula* en réponse à *Va* V31.2 dans le cas de stress simple ou combiné avec le sel a permis de mettre en évidence l'implication du gène LOX1 dans la réponse au stress combiné (C. Ben, communication personnelle). Dans des conditions de traitement au sel, son expression devient plus faible par rapport à celle des plantes non traitées par le sel chez le génotype résistant A17. Cela suggère qu'après l'ajout d'un stress salin, les plantes A17 changent leur voie de défense et l'expression de LOX1 diminue en conséquence. LOX1 est une lipooxygénase, un gène de défense conférant la résistance à *Xanthomonas campestris* chez *A. thaliana* (Hou et al. 2015). Les oxylipines, en tant que produit de la peroxydation des lipides, protègent la plante contre les agents infectieux par la voie de l'ABA (Vicente et al. 2012). Certains membres de cette famille participent à la réponse au stress abiotique, y compris le stress salin (Hou et al. 2015).

4. Conclusion

La réponse des accessions naturelles de la population Soliman de *M. truncatula* à *V. alfalfae* soumises ou non au stress abiotique salin est caractérisée par des interactions complexes entre deux organismes vivants - la plante et le pathogène - et par la dimension supplémentaire de l'adaptation au stress abiotique. De ce fait, le sel peut affecter la résistance des plantes aux pathogènes de différentes manières en fonction du génotype de la plante. S'il accroît généralement la sensibilité des accessions les plus sensibles, il peut aussi augmenter la tolérance chez les accessions résistantes et certaines accessions montrant une résistance partielle.

L'analyse de GWAS révèle différents contrôles génétiques de la réponse aux stress biotique et abiotique combinés par rapport au stress 'maladie' simple. Ainsi, la variation de la distribution phénotypique et de l'architecture génétique de la réponse à la verticilliose en conditions salines ou non au sein de la population tunisienne Soliman de *M. truncatula*, ainsi que la détection de SNP différents liés à la réponse au pathogène dans les deux conditions, confirment l'existence d'une interaction entre les voies de défense vis-à-vis des

deux facteurs de stress dans la réponse aux stress combinés.

Des études plus poussées telles que l'analyse de l'expression des gènes candidats obtenus par GWAS par qRT-PCR pourraient permettre d'obtenir des informations supplémentaires sur leur potentielle implication dans la régulation de la réponse aux deux stress étudiés. Le rôle des gènes candidats les plus prometteurs pourraient faire l'objet de validation expérimentale par l'analyse de mutants (si des lignées mutantes sont disponibles dans les collections de mutants de *M. truncatula*, <https://medicago-mutant.dasnr.okstate.edu/mutant/index.php>; <https://www.ibbr.cnr.it/ibbr/resources/medicago-truncatula-mutant-collections>) ou par des méthodes d'édition du génome. De telles méthodes ont déjà été utilisées avec succès pour la validation de gènes candidats chez *Medicago truncatula* (Naik et al. 2021; Lin et al. 2022) et les protocoles ont été optimisés pour la légumineuse modèle.

Enfin, une analyse du processus d'infection et de colonisation par le pathogène pourrait être menée par des études de microscopie dans le but de vérifier si la dynamique de l'invasion par le champignon diffère entre les plantes résistantes et sensibles et pour les plantes traitées au sel et non traitées.

Conclusion générale

Les légumineuses sont un élément important dans la production alimentaire mondiale. Elles sont reconnues pour leur qualité nutritionnelle et leurs impacts positifs sur la durabilité des écosystèmes. Cependant, dans un climat changeant, la durabilité de la production de légumineuses est vulnérable en raison des événements extrêmes de stress abiotiques et biotiques. Ces stress sont liés à des changements physiologiques, biochimiques et morphologiques qui empêchent le plein potentiel génétique et la productivité des cultures. De ce fait, comprendre l'adaptation des légumineuses et de leurs interactions avec les microorganismes du sol, symbiotiques ou pathogènes, vis-à-vis des différents défis environnementaux auxquels elles font face est essentiel. De plus, l'étude des différentes réponses physiologiques, génétiques et moléculaires à des stress abiotiques et biotiques individuels ou combinés dans des conditions de terrain est également d'une importance vitale permettant ainsi le développement des variétés de légumineuses plus résistantes au stress et plus résilientes.

Les stress abiotiques tel que la carence en phosphore chez les légumineuses entraînent un certain nombre de changements dans les plantes, y compris une réduction de la fixation de l'azote (N) et donc du rendement ce qui cause des pertes économiques d'une ampleur mondiale.

Notre premier objectif visait à étudier l'impact de la déficience en phosphore (P) sur la croissance, la nodulation ainsi que le rendement chez sept génotypes de pois chiche dans des conditions de terrain (Chapitre I). Cette étude a permis de mettre en évidence différents mécanismes adaptatifs en réponse à la déficience des sols en P pour maintenir l'efficacité physico-chimique requise de la plante à travers l'existence d'une variation génotypique au sein de cet ensemble de cultivars de pois chiche dans la

croissance et la nodulation, dans les principaux traits agronomiques liés au rendement, et dans l'absorption des nutriments N et P. Au contraire, la carence en P n'a pas d'impact sur la germination des grains. Au final, l'identification de génotypes présentant des métabolismes efficaces de P et de N et de bonnes performances dans les composantes du rendement dans des conditions aussi pauvres en P suggère leur utilité pour initier un programme de sélection visant à améliorer la tolérance au P dans une région de production donnée.

Dans les conditions de terrain, les plantes peuvent faire face à plusieurs possibilités de combinaisons de stress abiotiques et d'agents pathogènes, dont l'interaction peut produire des différences quantitatives des voies de réponse qui différencient la résistance ou la sensibilité, nécessitant ainsi un contrôle génétique précis. La réponse des plantes exposées simultanément à un stress abiotique et biotique se caractérise par des interactions complexes entre deux organismes vivants, la plante et le pathogène, et par la dimension supplémentaire de la réponse au stress abiotique. Le deuxième objectif de cette thèse visait à étudier le contrôle génétique de la résistance de 90 accessions naturelles de la population tunisienne de *M. truncatula* vis-à-vis de *V. alfalfae* soumises ou non à un stress salin (Chapitre II). Le stress salin modifie la réponse à la verticilliose au sein de ce panel d'accessions, suggérant l'existence d'une interaction entre les voies de défense en réponse aux deux stress biotique et abiotique. Toutefois l'effet observé du stress salin dépend du génotype de la plante : (i) de manière générale, pour les plantes tolérantes à *Va* V31.2, l'activation précoce des voies de défense due au pré-traitement au sel pourrait augmenter leur résistance à la verticilliose ; (ii) inversement, les accessions les plus sensibles à la verticilliose ne semblent pas bénéficier de cet effet de 'priming' (amorçage) des voies de défense par le pré-traitement au sel et la combinaison des deux stress accentue la sévérité de la maladie. Par ailleurs, par une analyse de GWAS, ce travail a mis en évidence une variation de l'architecture génétique de la réponse à la verticilliose en conditions saline et non-saline avec des QTL différents de ceux révélés par un autre panel de biodiversité MtHAPMAP. Ce résultat souligne l'importance d'examiner diverses ressources génétiques afin d'identifier des allèles rares et divers mécanismes génétiques d'adaptation aux contraintes environnementales.

Perspectives

Le développement d'approches de sélection basées sur le compromis entre les mécanismes de défense et d'adaptation des plantes aux contraintes environnementales, biotiques ou abiotiques, et un rendement élevé et constant dans des conditions de terrain est d'une grande importance.

Cette étude a mis en évidence que les réponses des plantes à un stress abiotique et/ou d'une infection par un pathogène dépendent fortement du génotype de la plante, ainsi que leurs interactions avec l'environnement. Une attention particulière doit être donnée à : i) l'effet des différents stades de

développement de la plante et l'intensité du stress abiotique sur le résultat de l'interaction, ii) l'implémentation d'une approche intégrative et multidimensionnelle par envirotypage permettant de mieux comprendre comment les facteurs abiotiques interagissent avec les facteurs biotiques dans des environnements particuliers. Cela ouvre la voie à une meilleure préservation de la santé des plantes.

La combinaison d'une approche de sélection assistée par la génomique et d'une évaluation phénotypique approfondie des principales cibles de sélection peut être utilisée pour sélectionner des variétés de plantes plus appropriées pour les cultures dans des sols faibles en phosphore. Il serait intéressant de mener des études visant à identifier des gènes et des mécanismes qui sous-tendent l'acquisition et l'efficacité d'utilisation de P chez les pois chiche en recherchant les régions génomiques liées aux caractéristiques racinaires critiques pour l'acquisition de P, en tenant compte des propriétés d'absorption des micronutriments (par exemple, le zinc et le calcium), ainsi que des voies métaboliques impliquées dans l'acclimatation des nodules en cas de privation de Pi telle que l'activité de l'enzyme phosphatase acide.

Avec la pression du changement climatique, la compréhension de l'adaptation des interactions plante-pathogène dans des conditions de sécheresse et de stress salin est un défi (Nadeem et al. 2019 ; Haddoudi et al. 2021). Nous proposons de promouvoir l'identification des gènes contribuant à la résistance dans des conditions de stress combinés telles qu'elles se produisent sur le terrain en prenant en considération le stade de développement de la plante par un phénotypage à haut débit s'appuyant sur l'imagerie thermique (pour la transpiration) et l'imagerie de fluorescence (pour le suivi de la sévérité du stress et des maladies).

Enfin, la réussite du développement de variétés de légumineuses résistantes aux stress abiotiques/biotiques dépend non seulement de la disponibilité de bonnes sources de résistance mais aussi une bonne connaissance du contrôle génétique de la résistance. L'identification et la localisation des gènes contrôlant ces caractères peuvent être accomplies par des études de génétique d'association basées sur la variation naturelle existante, tel que nous l'avons développé dans cette thèse. Une analyse fonctionnelle utilisant des données transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques d'accessions montrant des réponses contrastées aux deux stress combinés pourraient venir compléter cette étude afin d'identifier les voies métaboliques majeures et potentiellement pointer des gènes candidats pouvant jouer des rôles clés dans les mécanismes de résistance. Comme l'objectif est d'améliorer et de stabiliser le rendement et la qualité des graines, des allèles favorables des gènes candidats pourront être recherchés et introgressés dans des fonds agronomiques performants.

Liste des références

- Abdelguerfi-Laouar, M., Hamdi, N., Bouzid, H., Zidouni, F., Laib, M., Bouzid, L., & Zine, Z. 2001. “les légumineuses alimentaires en algerie : situation, etat des ressources phytogenetiques et cas du pois chiche a bejaia.” Actes des “3èmes Journées Scientifiques de l’INRAA, Bejaia (September): 11–12.
- Abuqamar, Synan et al. 2009. “Crosstalk between Biotic and Abiotic Stress Responses in Tomato Is Mediated by the AIM1 Transcription Factor.” *Plant Journal* 58(2): 347–60.
- Adams, David J. 2004. “Fungal Cell Wall Chitinases and Glucanases.” *Microbiology* 150(7): 2029–35.
- Adams, Mark A. et al. 2018. “Crops, Nitrogen, Water: Are Legumes Friend, Foe, or Misunderstood Ally?” *Trends in Plant Science* 23(6): 539–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2018.02.009>.
- Adnane, Bargaz et al. 2015. “Physiological and Molecular Aspects of Tolerance to Environmental Constraints in Grain and Forage Legumes.” *International Journal of Molecular Sciences* 16(8): 18976–8.
- Afzal, Fakiha et al. 2015. “Nutrient Deficiencies under Stress in Legumes: An Overview.” *Legumes under Environmental Stress: Yield, Improvement and Adaptations*: 53–65.
- Agnihotri, Vasudha, and Smita Rana. 2021. 2 Horse Gram an Underutilized Legume: A Potential Source of Nutraceuticals.
- Ahmed, M. Z., Shimazaki, T., Gulzar, S., Kikuchi, A., Gul, B., Khan, M. A., Koyro, H. W., Huchzermeyer, B., & Watanabe, K. N. 2013. The influence of genes regulating transmembrane transport of Na⁺ on the salt resistance of *Aeluropus lagopoides*. *Functional Plant Biology*, 40(9), 860–871. <https://doi.org/10.1071/FP12346>
- Al-Farsi, Safaa Mohammed; Ahmad Nawaz; Saleem K. Nadaf; Abdullah M. Al-Sadi; Kadambot HM Siddique; Muhammad Farooq. 2020. “Effects , Tolerance Mechanisms and Management of Salt Stress in Lucerne (*Medicago Sativa*).” : 411–28.
- Ali, Sarafat. 2020. “Jasmonic Acid Signaling Pathway in Response to Abiotic Stresses in Plants.”
- Alkama Nora. 2010. Adaptation de La Symbiose Rhizobienne Chez Le Haricot à La Déficience En Phosphore : Détermination de La Réponse de La Plante En Terme d ’ Échanges Gazeux et de Flux Minéraux Échangés Avec La Rhizosphère. <http://dspace.ensa.dz:8080/xmlui/handle/123456789/1293>.
- Alkemade, J. A., Nazzicari, N., Messmer, M. M., Annicchiarico, P., Ferrari, B., Voegelé, R. T., ... & Hohmann, P. 2022. Genome-wide association study reveals white lupin candidate gene involved in anthracnose resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(3), 1011-1024.
- Alkharabsheh, Hiba M et al. 2021. “Field Crop Responses and Management Strategies to Mitigate Soil Salinity in Modern Agriculture : A Review.”
- Andreasson, Erik, and Brian Ellis. 2010. “Convergence and Specificity in the Arabidopsis MAPK Nexus.” *Trends in Plant Science* 15(2): 106–13.

- Antanaviciute, L. et al. 2015. "Mapping QTL Associated with *Verticillium Dahliae* Resistance in the Cultivated Strawberry (*Fragaria 3 Ananassa*)." *Horticulture Research* 2(February): 1–8.
- Antoniou, Chrystalla, Andreas Savvides, Anastasis Christou, and Vasileios Fotopoulos. 2016. "Unravelling Chemical Priming Machinery in Plants: The Role of Reactive Oxygen–Nitrogen–Sulfur Species in Abiotic Stress Tolerance Enhancement." *Current Opinion in Plant Biology* 33: 101–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.020>.
- Arif, Yamshi et al. 2020. "Salinity Induced Physiological and Biochemical Changes in Plants: An Omic Approach towards Salt Stress Tolerance." *Plant Physiology and Biochemistry* 156(August): 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.042>.
- Arraouadi, Soumaya et al. 2012. "QTL Mapping of Physiological Traits Associated with Salt Tolerance in *Medicago Truncatula* Recombinant Inbred Lines." *Genomics* 99(2): 118–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.11.005>.
- Asselbergh, Bob, Andrew Enow Achuo, Monica Höfte, and Frédérique Van Gijsegem. 2008. "Abscisic Acid Deficiency Leads to Rapid Activation of Tomato Defence Responses upon Infection with *Erwinia Chrysanthemi*." *Molecular Plant Pathology* 9(1): 11–24.
- Ates, S., D. Feindel, A. El Moneim, and J. Ryan. 2014. "Annual Forage Legumes in Dryland Agricultural Systems of the West Asia and North Africa Regions: Research Achievements and Future Perspective." *Grass and Forage Science* 69(1): 17–31.
- Aver'yanov, A. A., Lapikova, V. P., & Djawakhia, V. G. (1993). Active oxygen mediates heat-induced resistance of rice plant to blast disease. *Plant Science*, 92(1), 27–34. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90063-6](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90063-6)
- Aver'yanov, Andrey A., Vera P. Lapikova, and Vitaliy G. Djawakhia. 1993. "Active Oxygen Mediates Heat-Induced Resistance of Rice Plant to Blast Disease." *Plant Science* 92(1): 27–34.
- Avia, Komlan et al. 2013. "Genetic Variability and QTL Mapping of Freezing Tolerance and Related Traits in *Medicago Truncatula*." *Theoretical and Applied Genetics* 126(9): 2353–66.
- Badri, Mounawer, Fabien Chardon, Thierry Huguet, and Mohamed Elarbi Aouani. 2011. "Quantitative Trait Loci Associated with Drought Tolerance in the Model Legume *Medicago Truncatula*." *Euphytica* 181(3): 415–28.
- Bae, Hanhong et al. 2006. "Necrosis- and Ethylene-Inducing Peptide from *Fusarium Oxysporum* Induces a Complex Cascade of Transcripts Associated with Signal Transduction and Cell Death in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 141(3): 1056–67.
- Bai, Yuling et al. 2018. "Plant Behaviour under Combined Stress: Tomato Responses to Combined Salinity and Pathogen Stress." *Plant Journal* 93(4): 781–93.
- Bargaz, Adnane, Mainassara Zaman-allah, Mohamed Farissi, and Mohamed Lazali. 2015. "Physiological and Molecular Aspects of Tolerance to Environmental Constraints in Grain and Forage Legumes." : 18976–8.

- Beattie, Gwyn A. 2006. "Plant-Associated Bacteria: Survey, Molecular Phylogeny, Genomics and Recent Advances." *Plant-Associated Bacteria*: 1–56.
- Beck, D. P., J. Wery, M. C. Saxena, and A. Ayadi. 1991. "Dinitrogen Fixation and Nitrogen Balance in Cool-Season Food Legumes." *Agronomy Journal* 83(2): 334–41.
- Bello, Suleiman K. 2021. "An Overview of the Morphological, Genetic and Metabolic Mechanisms Regulating Phosphorus Efficiency Via Root Traits in Soybean." *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 21(2): 1013–29.
- Ben, C., Oshchepkova, P., 2022. Analysis of the Impact of Salinity on the Colonization of Different Natural Accessions of *Medicago truncatula* by the Soil-Borne Pathogenic Fungus *Verticillium alfalfae*. Personal communication. Skoltech .
- Ben, C., Toueni, M., Montanari, S., Tardin, M. C., Fervel, M., Negahi, A., ... & Gentzbittel, L. 2013. Natural diversity in the model legume *Medicago truncatula* allows identifying distinct genetic mechanisms conferring partial resistance to *Verticillium* wilt. *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 317-332.
- Ben Hdech, D., Aubry, C., Alibert, B., Beucher, D., Prospero, J. M., Limami, A. M., & Teulat, B. 2020. Exploring natural diversity of *Medicago truncatula* reveals physiotypes and loci associated with the response of seedling performance to nitrate supply. *Physiologia plantarum*, 170(2), 227-247. doi: 10.1111/ppl.13144.
- Ben Rejeb, Ines, Victoria Pastor, and Brigitte Mauch-Mani. 2014. "Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms." *Plants* 3(4): 458–75.
- Benedito, Vagner A. et al. 2008. "A Gene Expression Atlas of the Model Legume *Medicago Truncatula*." *Plant Journal* 55(3): 504–13.
- Benjamini Y., Hochberg Y. 1995 Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Stat Soc Ser B* 57(1):449–518
- Bent, A. F., and Mackey, D. 2007. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 399–436.
- Berens, Matthias L. et al. 2017. "Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense." *Annual Review of Phytopathology* 55(June): 401–25.
- Besri, M. (1993). Effects of salinity on plant diseases development. 67–74. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1860-6_8
- Bianchi, M. E. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*, 81(1), 1-5.
- Bibi, Noreen et al. 2017. "Role of Brassinosteroids in Alleviating Toxin-Induced Stress of *Verticillium Dahliae* on Cotton Callus Growth." : 12281–92.

- Bishop, C.D., and R.M. Cooper. 1983. "An Ultrastructural Study of Root Invasion in Three Vascular Wilt Diseases." *Physiological Plant Pathology* 22(1): 15-IN13. [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-4059\(83\)81034-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-4059(83)81034-0).
- Boller, T., & Felix, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology*, 60, 379-406.
- Bonhomme, M., Fariello, M. I., Navier, H., Hajri, A., Badis, Y., Miteul, H., ... & Pilet-Nayel, M. L. (2019). A local score approach improves GWAS resolution and detects minor QTL: application to *Medicago truncatula* quantitative disease resistance to multiple *Aphanomyces euteiches* isolates. *Heredity*, 123(4), 517-531.
- Bonhomme, M., Fariello, M. I., Navier, H., Hajri, A., Badis, Y., Miteul, H., ... & Pilet-Nayel, M. L. 2019. A local score approach improves GWAS resolution and detects minor QTL: application to *Medicago truncatula* quantitative disease resistance to multiple *Aphanomyces euteiches* isolates. *Heredity*, 123(4), 517-531.
- Bonhomme, Maxime et al. 2019. "A Local Score Approach Improves GWAS Resolution and Detects Minor QTL: Application to *Medicago Truncatula* Quantitative Disease Resistance to Multiple *Aphanomyces Euteiches* Isolates." *Heredity* 123(4): 517–31. <http://dx.doi.org/10.1038/s41437-019-0235-x>.
- Bowler, Chris, and Robert Fluhr. 2000. "The Role of Calcium and Activated Oxygens as Signals for Controlling Cross-Tolerance." *Trends in Plant Science* 5(6): 241–46.
- Bozzo, Gale G., Evelyn L. Dunn, and William C. Plaxton. 2006. "Differential Synthesis of Phosphate-Starvation Inducible Purple Acid Phosphatase Isozymes in Tomato (*Lycopersicon Esculentum*) Suspension Cells and Seedlings." *Plant, Cell and Environment* 29(2): 303–13.
- Brader, Günter et al. 2007. "The MAP Kinase Kinase MKK2 Affects Disease Resistance in Arabidopsis." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(5): 589–96.
- Brian C. F. and Gwyn A. B. 2008. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHII-2008-0226-01
- Buddhika Makumburage, G., & Stapleton, A. E. (2011). Phenotype uniformity in combined-stress environments has a different genetic architecture than in single-stress treatments. *Frontiers in Plant Science*, 2(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00012>
- Burén, Stefan, and Luis M. Rubio. 2018. "State of the Art in Eukaryotic Nitrogenase Engineering." *FEMS Microbiology Letters* 365(2): 1–9.
- Carrère, Sébastien et al. 2020. "LeGOO: An Expertized Knowledge Database for the Model Legume *Medicago Truncatula*." *Plant and Cell Physiology* 61(1): 203–11.
- Cartelier, K., Aimé, D., Ly Vu, J., Combes-Soia, L., Labas, V., Prospero, J. M., ... & Le Signor, C. 2021. Genetic determinants of seed protein plasticity in response to the environment in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 106(5), 1298-1311. Early Access. [ff10.1111/TPJ.15236](https://doi.org/10.1111/TPJ.15236). [ff10.1111/TPJ.15236](https://doi.org/10.1111/TPJ.15236). [ff10.1111/TPJ.15236](https://doi.org/10.1111/TPJ.15236). [ff10.1111/TPJ.15236](https://doi.org/10.1111/TPJ.15236).

- Celik, O., Atak, Ç., & Suludere, Z. 2014. Response of soybean plants to gamma radiation: Biochemical analyses and expression patterns of trichome development. *Plant Omics*, 7(5), 382-391.
- Challa, Surekha, and Nageswara R.R. Neelapu. 2018. Biochemical, Physiological and Molecular Avenues for Combating Abiotic Stress in Plants Genome-Wide Association Studies (GWAS) for Abiotic Stress Tolerance in Plants. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813066-7.00009-7>.
- Chandora, Rahul, Gayacharan, Neelam Shekhawat, and Nikhil Malhotra. 2020. 18 Chickpea: Crop Wild Relatives for Enhancing Genetic Gains Chickpea Genetic Resources: Collection, Conservation, Characterization, and Maintenance. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-818299-4.00003-8>.
- Chen Z, Ly Vu J, Ly Vu B, Buitink J, Leprince O and Verdier J (2021a) Genome-Wide Association Studies of Seed Performance Traits in Response to Heat Stress in *Medicago truncatula* Uncover MIEL1 as a Regulator of Seed Germination Plasticity. *Front. Plant Sci.* 12:673072. doi: 10.3389/fpls.2021.673072
- Chen, Jie-yin, Krishna V Subbarao, and Steven J Klosterman. 2020. “Hormone Signaling and Its Interplay With Development and Defense Responses in *Verticillium* -Plant Interactions.” 11(November).
- Chen, Xuexue et al. 2021. “Protein Kinases in Plant Responses to Drought, Salt, and Cold Stress.” *Journal of Integrative Plant Biology* 63(1): 53–78.
- Chen, Z., Lancon-Verdier, V., Le Signor, C., She, Y. M., Kang, Y., & Verdier, J. (2021b). Genome-wide association study identified candidate genes for seed size and seed composition improvement in *M. truncatula*. *Scientific reports*, 11(1), 4224.. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83581-7>
- Chojak-Koźniewska, J., Kuźniak, E., & Zimny, J. (2018). The effects of combined abiotic and pathogen stress in plants: Insights from salinity and *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans* interaction in cucumber. *Frontiers in Plant Science*, 871(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01691>
- Choudhury, Feroza K., Rosa M. Rivero, Eduardo Blumwald, and Ron Mittler. 2017. “Reactive Oxygen Species, Abiotic Stress and Stress Combination.” *Plant Journal* 90(5): 856–67.
- Christopoulou, Marilena et al. 2015. “Genome-Wide Architecture of Disease Resistance Genes in Lettuce.” *G3: Genes, Genomes, Genetics* 5(12): 2655–69.
- Chun, Hyun Jin et al. 2021. “Microtubule Dynamics Plays a Vital Role in Plant Adaptation and Tolerance to Salt Stress.”
- Cramer, Grant R et al. 2011. “Effects of Abiotic Stress on Plants: A Systems Biology Perspective.Pdf (Application/Pdf Object).” *BMC Plant Biology* 11(163): 1–14. <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2229-11-163.pdf>.
- Dahham, S. S., Tabana, Y. M., Iqbal, M. A., Ahamed, M. B., Ezzat, M. O., Majid, A. S., & Majid, A. M. 2015. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, 20(7), 11808-11829.
- Daliakopoulos, I. N. et al. 2016. “The Threat of Soil Salinity: A European Scale Review.” *Science of the Total Environment* 573: 727–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.177>.

- Dash, Sudhansu et al. 2016. “Legume Information System (LegumeInfo.Org): A Key Component of a Set of Federated Data Resources for the Legume Family.” *Nucleic Acids Research* 44(D1): D1181–88.
- DAZZO, Frank B. 2004. “Applications of Quantitative Microscopy in Studies of Plant Surface Microbiology.” *Plant surface microbiology*: 503–50.
- De Corato, Ugo. 2020. “Disease-Suppressive Compost Enhances Natural Soil Suppressiveness against Soil-Borne Plant Pathogens: A Critical Review.” *Rhizosphere* 13(November 2019): 100192.
- de Freitas, Paulo André Ferreira et al. 2019. “Salt Acclimation in Sorghum Plants by Exogenous Proline: Physiological and Biochemical Changes and Regulation of Proline Metabolism.” *Plant Cell Reports* 38(3): 403–16. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-019-02382-5>.
- de Pinto, M. C., Locato, V., & de Gara, L. (2012). Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, Cell and Environment*, 35(2), 234–244. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02387.x>
- Dias, P. M. B., Brunel-Muguet, S., Dürr, C., Huguet, T., Demilly, D., Wagner, M. H., & Teulat-Merah, B. 2011. QTL analysis of seed germination and pre-emergence growth at extreme temperatures in *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics*, 122, 429-444. doi: 10.1007/s00122-010-1458-7.
- DiMario, R. J., Clayton, H., Mukherjee, A., Ludwig, M., & Moroney, J. V. (2017). Plant Carbonic Anhydrases: Structures, Locations, Evolution, and Physiological Roles. *Molecular Plant*, 10(1), 30–46. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.09.001>
- Ditt, R. F., Kerr, K. F., De Figueiredo, P., Delrow, J., Comai, L., & Nester, E. W. (2006). The *Arabidopsis thaliana* transcriptome in response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(6), 665–681. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0665>
- Dixon, R. A., Harrison, M. J. & Lamb, C. J. 1994. Early events in the activation of plant defence responses. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 479–501. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.32.090194.002403>
- Djébalı, Naceur et al. 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.” *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(9): 1043–55.
- Djouider, Souad Insaf et al. 2022. “Contribution to Improving the Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) Efficiency in Low-Phosphorus Farming Systems: Assessment of the Relationships between the P and N Nutrition, Nodulation Capacity and Productivity Performance in P-Deficient Field Conditions.” *Agronomy* 12(12).
- Domenico, Stefania De et al. 2019. “Oxylipin Dynamics in *Medicago Truncatula* in Response to Salt.” : 198–208.
- Dreher, Kate, and Judy Callis. 2007. “Ubiquitin, Hormones and Biotic Stress in Plants.” *Annals of Botany* 99(5): 787–822.
- Drevon, Jean Jacques et al. 2015. “Phosphorus Use Efficiency for N₂ Fixation in the Rhizobial Symbiosis with Legumes.” *Biological Nitrogen Fixation* 1–2: 455–64.

- Dupuy Y., Nougier P. 2005. “Les Microorganismes. Du Gène à La Biosphère.” Ellipses. France,: 212.
- Dusotoit-Coucaud, A., Porcheron, B., Brunel, N., Kongsawadworakul, P., Franchel, J., Viboonjun, U., Chrestin, H., Lemoine, R., & Sakr, S. (2010). Cloning and characterization of a new polyol transporter (HbPLT2) in *Hevea brasiliensis*. *Plant and Cell Physiology*, 51(11), 1878–1888. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq151>
- E.B. El Ghazali, Gamal. 2020. “Suaeda Vermiculata Forssk. Ex J.F. Gmel.: Structural Characteristics and Adaptations to Salinity and Drought: A Review.” *International Journal of Sciences* 9(02): 28–33.
- Effects in *Medicago truncatula* (R Balestrini, Ed.). *PLOS ONE* 11, e0150350.
- Epstein, B., Burghardt, L. T., Heath, K. D., Grillo, M. A., Kostanecki, A., Hämälä, T., ... & Tiffin, P. 2022. Combining GWAS and population genomic analyses to characterize coevolution in a legume-rhizobia symbiosis. *Molecular ecology*. doi: 10.1111/mec.16602.
- Fabro, G., Kovács, I., Pavet, V., Szabados, L., & Alvarez, M. E. (2004). Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(4), 343–350. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.4.343>
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2022 FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Statistics database (2022) <http://www.fao.org/faostat/en/#data> .
- Fartash A.H., Ben C., Mazurier M., Ebrahimi A., Ghalandar M., Gentzbittel L., Rickauer M. 2023 *Medicago truncatula* quantitative resistance to a new strain of *Verticillium alfalfae* from Iran revealed by a Genome-wide association study. *Frontiers in Plant Science*, in press
- FARTASH, Amir Hossein. 2022. “Recherche de Nouvelles Sources de Résistance à La Verticilliose Chez *Medicago*. (Doctoral dissertation Institut National Polytechnique de Toulouse).
- Fradin, Emilie F. et al. 2009. “Genetic Dissection of *Verticillium* Wilt Resistance Mediated by Tomato Ve1.” *Plant Physiology* 150(1): 320–32.
- Fradin, Emilie F., and Bart P.H.J. Thomma. 2006. “Physiology and Molecular Aspects of *Verticillium* Wilt Diseases Caused by *V. Dahliae* and *V. Albo-Atrum*.” *Molecular Plant Pathology* 7(2): 71–86.
- Friesen, Maren L. et al. 2014. “The Ecological Genomic Basis of Salinity Adaptation in Tunisian *Medicago Truncatula*.” *BMC Genomics* 15(1).
- Gaind, Sunita. 2017. “Phosphorus Mobilization Strategies of Grain Legumes : An Overview.” *Jam* 3(1): 1–15.
- Gao, L., & Xiang, C. Bin. (2008). The genetic locus At1g73660 encodes a putative MAPKKK and negatively regulates salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 67(1–2), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9306-8>

- Garrett, K. A., Dendy, S. P., Frank, E. E., Rouse, M. N., & Travers, S. E. (2006). Climate change effects on plant disease: Genomes to ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 489–509. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143420>
- Gechev, Tsanko S. et al. 2006. “Reactive Oxygen Species as Signals That Modulate Plant Stress Responses and Programmed Cell Death.” *BioEssays* 28(11): 1091–1101.
- GILLER, Ken E. Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems.
- Gong, Zhizhong. 2021. “Plant Abiotic Stress: New Insights into the Factors That Activate and Modulate Plant Responses.” *Journal of Integrative Plant Biology* 63(3): 429–30.
- Gonzaga, D., Paula, A., Mota, Z., Reis, I., Souza, M. De, Valle, M., Sousa, D., Eug, M., Franco, L., Mehta, A., & Grossi-de-s, M. F. (2022). NBS-LRR-WRKY genes and protease inhibitors (PIs) seem essential for cowpea resistance to root-knot nematode. *Journal of Proteomics*, 261(March). <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104575>
- Gorton, A. J., Heath, K. D., Pilet-Nayel, M. L., Baranger, A., & Stinchcombe, J. R. (2012). Mapping the genetic basis of symbiotic variation in legume-rhizobium interactions in *Medicago truncatula*. *G3: Genes| Genomes| Genetics*, 2(11), 1291-1303. doi: 10.1534/g3.112.003269.
- Goyal, Ravinder K., Autar K. Mattoo, and Maria Augusta Schmidt. 2021. “Rhizobial–Host Interactions and Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Crops Toward Agriculture Sustainability.” *Frontiers in Microbiology* 12(June): 1–14.
- Greco, Maria, Adriana Chiappetta, Leonardo Bruno, and Maria Beatrice Bitonti. 2012. “In *Posidonia Oceanica* Cadmium Induces Changes in DNA Methylation and Chromatin Patterning.” *Journal of Experimental Botany* 63(2): 695–709.
- Gruber, V., Blanchet, S., Diet, A., Zahaf, O., Boualem, A., Kakar, K., Alunni, B., Udvardi, M., Frugier, F., & Crespi, M. (2009). Identification of transcription factors involved in root apex responses to salt stress in *Medicago truncatula*. *Molecular Genetics and Genomics*, 281(1), 55–66. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0392-8>
- Gu, Mian, Aiqun Chen, Shubin Sun, and Guohua Xu. 2016. “Complex Regulation of Plant Phosphate Transporters and the Gap between Molecular Mechanisms and Practical Application: What Is Missing?” *Molecular Plant* 9(3): 396–416. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.012>.
- Guénard M, Gensollen V. 2006. Resistance to *Verticillium albo-atrum* in lucerne (*Medicago sativa* L.) to distinguish between varieties. *Euphytica* 153, 227–232
- Guest D, Brown J.1997. Plant defences against pathogens. *Plant Pathogens and Plant Diseases*, 263, 286.
- Guo, S. M., Kamphuis, L. G., Gao, L. L., Klingler, J. P., Lichtenzweig, J., Edwards, O., & Singh, K. B. 2012. Identification of distinct quantitative trait loci associated with defence against the closely related aphids *Acyrtosiphon pisum* and *A. kondoi* in *Medicago truncatula*. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3913-3922. doi: 10.1093/jxb/ers084.

- Gupta, Garima, Jitendra Panwar, Mohd Sayeed Akhtar, and Prabhat N. Jha. 2012. "Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria as Biofertilizer." In , 183–221. http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-5449-2_8.
- Haddoudi, I., Mhadhbi, H., Gargouri, M., Barhoumi, F., Romdhane, S. Ben, & Mrabet, M. (2021). Occurrence of fungal diseases in faba bean (*Vicia faba* L.) under salt and drought stress. *European Journal of Plant Pathology*, 159(2), 385–398. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02169-5>
- Häffner, E., Karlovsky, P., Splivallo, R., Traczewska, A., & Diederichsen, E. (2014). ERECTA, salicylic acid, abscisic acid, and jasmonic acid modulate quantitative disease resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Verticillium longisporum*. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-85>
- Haj-Amor, Zied et al. 2022. "Soil Salinity and Its Associated Effects on Soil Microorganisms, Greenhouse Gas Emissions, Crop Yield, Biodiversity and Desertification: A Review." *Science of The Total Environment* 843(April): 156946.
- Haling, Rebecca E et al. 2018. "Differences in Nutrient Foraging among *Trifolium Subterraneum* Cultivars Deliver Improved P-Acquisition Efficiency." : 539–54.
- Hamilton, E. S., Schlegel, A. M., & Haswell, E. S. (2015). United in diversity: Mechanosensitive ion channels in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 66(103), 113–137. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114700>
- Harold Henry Flor, 1947. « Inheritance of reaction to rust in flax », *Journal of Agricultural Research*, vol. 74, p. 241–262.
- Harvey, Ian C. 1982. "Assessment Keys for Some Crown and Root Diseases of Lucerne (*Medicago Sativa* L.)." *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 10(3): 317–22.
- Hayes, Ryan J. et al. 2011. "The Inheritance of Resistance to *Verticillium* Wilt Caused by Race 1 Isolates of *Verticillium Dahliae* in the Lettuce Cultivar La Brillante." *Theoretical and Applied Genetics* 123(4): 509–17.
- Helmke, S.M. Braum and P.A. 1995. "White Lupin Utilizes Soil Phosphorus That Is Unavailable to Soybean." : 95–100.
- Hind, S. R., Pulliam, S. E., Veronese, P., Shantharaj, D., Nazir, A., Jacobs, N. S., & Stratmann, J. W. (2011). The COP9 signalosome controls jasmonic acid synthesis and plant responses to herbivory and pathogens. *Plant Journal*, 65(3), 480–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04437.x>
- Hinsinger, Philippe, Claude Plassard, Caixian Tang, and Benoît Jaillard. 2003. "Origins of Root-Mediated PH Changes in the Rhizosphere and Their Responses to Environmental Constraints: A Review." *Plant and Soil* 248(1–2): 43–59.
- Hinsinger, Philippe. 2001. "Bioavailability of Soil Inorganic P in the Rhizosphere as Affected by Root-Induced Chemical Changes : A Review." : 173–95.
- Hohnjec, Natalija et al. 2005. "Overlaps in the Transcriptional Profiles of *Medicago Truncatula* Roots Inoculated with Two Different *Glomus* Fungi Provide Insights into the Genetic Program Activated during Arbuscular Mycorrhiza." *Plant Physiology* 137(4): 1283–1301.

- Hou, Y., Meng, K., Han, Y., Ban, Q., Wang, B., Suo, J., Lv, J., & Rao, J. (2015). The persimmon 9-lipoxygenase gene *DKLOX3* plays positive roles in both promoting senescence and enhancing tolerance to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 6(DEC), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01073>
- Howard, Ronald J. 1985. “Local and Long-Distance Spread of *Verticillium* Species Causing Wilt of Alfalfa.” *Canadian Journal of Plant Pathology* 7(2): 199–202.
- Hu, Q., Xiao, S., Wang, X., Ao, C., Zhang, X., & Zhu, L. 2021. GhWRKY1-like enhances cotton resistance to *Verticillium dahliae* via an increase in defense-induced lignification and S monolignol content. *Plant Science*, 305, 110833.
- Hua, J. (2013). Modulation of plant immunity by light, circadian rhythm, and temperature. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4), 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.06.017>
- Huang, Chun Y. et al. 2011. “Phosphate Utilization Efficiency Correlates with Expression of Low-Affinity Phosphate Transporters and Noncoding RNA, *IPS1*, in Barley.” *Plant Physiology* 156(3): 1217–29.
- Huang, H. C. 2003. “*Verticillium* Wilt of Alfalfa: Epidemiology and Control Strategies.” *Canadian Journal of Plant Pathology* 25(4): 328–38.
- Illmer, P., and F. Schinner. 1995. “Solubilization of Inorganic Calcium Phosphates-Solubilization Mechanisms.” *Soil Biology and Biochemistry* 27(3): 257–63.
- Inderbitzin, Patrik et al. 2011. “Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium* , with the Descriptions of Five New Species.” 6(12).
- Inderbitzin, Patrik, and Krishna V Subbarao. 2014. “*Verticillium* Systematics and Evolution : How Confusion Impedes *Verticillium* Wilt Management and How to Resolve It.” (62).
- Isayenkov, Stanislav V., and Frans J.M. Maathuis. 2019. “Plant Salinity Stress: Many Unanswered Questions Remain.” *Frontiers in Plant Science* 10(February).
- J. Atkinson, Nicky, and Peter E. Urwin. 2012. “The Interaction of Plant Biotic and Abiotic Stresses: From Genes to the Field.” *Journal of Experimental Botany* 63(2): 695–709.
- Jacques, C et al. 2021. “Drought Stress Memory at the Plant Cycle Level : A Review.”
- Jakse, Jernej et al. 2013. “Identification of Quantitative Trait Loci for Resistance to *Verticillium* Wilt and Yield Parameters in Hop (*Humulus Lupulus* L.)” *Theoretical and Applied Genetics* 126(6): 1431–43.
- Janati, Walid et al. 2021. “Will Phosphate Bio-Solubilization Stimulate Biological Nitrogen Fixation in Grain Legumes?” *Frontiers in Agronomy* 3(March).
- Jardinaud, Marie Françoise et al. 2016. “A Laser Dissection-RNAseq Analysis Highlights the Activation of Cytokinin Pathways by Nod Factors in the *Medicago truncatula* Root Epidermis.” *Plant Physiology* 171(3): 2256–76.

- Jensen, E. S., Peoples, M. B., Boddey, R. M., Gresshoff, P. M., Hauggaard-Nielsen, H., JR Alves, B., & Morrison, M. J. 2012. Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for sustainable development*, 32, 329-364.
- Jensen, Michael K. et al. 2008. "Transcriptional Regulation by an NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) Transcription Factor Attenuates ABA Signalling for Efficient Basal Defence towards *Blumeria Graminis* f. Sp. *Hordei* in *Arabidopsis*." *Plant Journal* 56(6): 867–80.
- Jezierny, D., Mosenthin, R., Bauer, E. 2010. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: a review. *Animal Feed Science and Technology* 157, 111–128. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.001>
- Jia, W., Y. Wang, S. Zhang, and J. Zhang. 2002. "Salt-Stress-Induced ABA Accumulation Is More Sensitively Triggered in Roots than in Shoots." *Journal of Experimental Botany* 53(378): 2201–6.
- Jin, H., Axtell, M. J., Dahlbeck, D., Ekwenna, O., Zhang, S., Staskawicz, B., & Baker, B. (2002). NPK1, and MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants. *Developmental Cell*, 3(2), 291–297. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00205-8](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00205-8)
- Jones, J. D., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Jouan, J. 2020. Valorisation économique et environnementale des complémentarités culture-élevage à travers la production locale de légumineuses: approche par modélisation de l'Ouest de la France (Doctoral dissertation, Agrocampus Ouest).
- Jukanti, A. K., P. M. Gaur, C. L.L. Gowda, and R. N. Chibbar. 2012. "Nutritional Quality and Health Benefits of Chickpea (*Cicer Arietinum* L.): A Review." *British Journal of Nutrition* 108(SUPPL. 1).
- Julier, Bernadette et al. 2007. "Identification of Quantitative Trait Loci Influencing Aerial Morphogenesis in the Model Legume *Medicago Truncatula*." *Theoretical and Applied Genetics* 114(8): 1391–1406.
- Kadri A, Julier B, Laouar M, Ben C, Badri M, Chedded J, Mouhouche B, Gentzbittel L, Abdelguerfi A. 2017 Genetic determinism of reproductive fitness traits under drought stress in the model legume *Medicago truncatula*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39:227, DOI 0.1007/s11738-017-2527-1
- Kaler, A. S., Gillman, J. D., Beissinger, T., & Purcell, L. C. (2020). Comparing Different Statistical Models and Multiple Testing Corrections for Association Mapping in Soybean and Maize. *Frontiers in Plant Science*, 10(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01794>
- Kalpesh , sardhara and Kavita Mehta, Available. 2018. "Effects of Abiotic and Biotic Stress on the Plant." 01(01): 5–9.
- Kamboj, Rajni, and Vikas Nanda. 2018. "Proximate Composition, Nutritional Profile and Health Benefits of Legumes – A Review." *Legume Research* 41(3): 325–32.
- Kamphuis, L. G., Lichtenzweig, J., Oliver, R. P., & Ellwood, S. R. 2008. Two alternative recessive quantitative trait loci influence resistance to spring black stem and leaf spot in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*, 8(1), 1-12. doi: 10.1186/1471-2229-8-30.

- Kamphuis, L. G., Lichtenzveig, J., Peng, K., Guo, S. M., Klingler, J. P., Siddique, K. H., ... & Singh, K. B. 2013. Characterization and genetic dissection of resistance to spotted alfalfa aphid (*Therioaphis trifolii*) in *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 64(16), 5157-5172. doi: 10.1093/jxb/ert305. PMC3830491.
- Kamphuis, Lars G., Lingling Gao, and Karam B. Singh. 2012. "Identification and Characterization of Resistance to Cowpea Aphid (*Aphis Craccivora* Koch) in *Medicago Truncatula*." *BMC Plant Biology* 12.
- Kang, Y., Sakiroglu, M., Krom, N., Stanton-Geddes, J., Wang, M., Lee, Y. C., ... & Udvardi, M. (2015). Genome-wide association of drought-related and biomass traits with HapMap SNPs in *Medicago truncatula*. *Plant, Cell & Environment*, 38(10), 1997-2011. doi: 10.1111/pce.12520.
- Kang, Y., Torres-Jerez, I., An, Z., Greve, V., Huhman, D., Krom, N., ... & Udvardi, M. 2019. Genome-wide association analysis of salinity responsive traits in *Medicago truncatula*. *Plant, Cell & Environment*, 42(5), 1513-1531. doi: 10.1111/pce.13508.
- Kang, Yun et al. 2015. "Genome-Wide Association of Drought-Related and Biomass Traits with HapMap SNPs in *Medicago Truncatula*." *Plant Cell and Environment* 38(10): 1997–2011.
- Kang, Yun; Torres-Jerez, Ivone ;An, Zewei ; Greve, Veronica; Huhman, David; Krom, Nicholas; Cui, Yuehua; Udvardi, Michael. 2019. "Genome-Wide Association Analysis of Salinity Responsive Traits in *Medicago Truncatula*." *Plant Cell and Environment* 42(5): 1513–31.
- Kantar, F. et al. 2010. "Efficient Biological Nitrogen Fixation Under Warming Climates." In *Climate Change and Management of Cool Season Grain Legume Crops*, Dordrecht: Springer Netherlands, 283–306. http://link.springer.com/10.1007/978-90-481-3709-1_15.
- Kawchuk, Lawrence M. et al. 2001. "Tomato Ve Disease Resistance Genes Encode Cell Surface-like Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(11): 6511–15.
- Khan, Mohammad Saghir et al. 2010. "Plant Growth Promotion by Phosphate Solubilizing Fungi - Current Perspective." *Archives of Agronomy and Soil Science* 56(1): 73–98.
- Kissoudis, C., Seifi, A., Yan, Z., Islam, A. T. M. T., van der Schoot, H., van de Wiel, C. C. M., Visser, R. G. F., van der Linden, C. G., & Bai, Y. (2017). Ethylene and abscisic acid signaling pathways differentially influence tomato resistance to combined powdery mildew and salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 7(January), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02009>
- Kissoudis, C., Sunarti, S., Van De Wiel, C., Visser, R. G. F., Van Der Linden, C. G., & Bai, Y. (2016). Responses to combined abiotic and biotic stress in tomato are governed by stress intensity and resistance mechanism. *Journal of Experimental Botany*, 67(17), 5119–5132. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw285>
- Kissoudis, Christos et al. 2016. "Responses to Combined Abiotic and Biotic Stress in Tomato Are Governed by Stress Intensity and Resistance Mechanism." *Journal of Experimental Botany* 67(17): 5119–32.
- Kohli, Pawandeep Singh et al. 2020. "Genome-Wide Association Study for Phosphate Deficiency Responsive Root Hair Elongation in Chickpea." *Functional and Integrative Genomics* 20(6): 775–86.

- Kohli, S. K., Khanna, K., Bhardwaj, R., Abd Allah, E. F., Ahmad, P., & Corpas, F. J. (2019). Assessment of subcellular ROS and NO metabolism in higher plants: Multifunctional signaling molecules. *Antioxidants*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/antiox8120641>
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T., & Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74(8), 1301–1322. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.006>
- Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., & Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2940–2945. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.6.2940>
- Krishnakumar, Vivek et al. 2015. “MTGD: The Medicago Truncatula Genome Database.” *Plant and Cell Physiology* 56(1): e1.
- Kumar, Sandeep, Ram Swaroop Meena, and Gulab Singh Yadav. 2018. “Legumes for Soil Health and Sustainable Management.” *Legumes for Soil Health and Sustainable Management* (July).
- Kunej, U., Mikulič-Petkovšek, M., Radišek, S., & Štajner, N. 2020. Changes in the phenolic compounds of hop (*Humulus lupulus* L.) Induced by infection with *Verticillium nonalfalfae*, the causal agent of hop *Verticillium* wilt. *Plants*, 9(7), 841.
- Künstler, A., Bacsó, R., Gullner, G., Hafez, Y. M., & Király, L. (2016). Staying alive - is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 93, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.01.003>
- Küster, H. 2013. “*Medicago Truncatula*.” *Brenner’s Encyclopedia of Genetics: Second Edition* 14(5): 335–37.
- Küster, H., Hohnjec, N., Krajinski, F., El Yahyaoui, F., Manthey, K., Gouzy, J., ... & Becker, A. 2004. Construction and validation of cDNA-based Mt6k-RIT macro-and microarrays to explore root endosymbioses in the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Biotechnology*, 108(2), 95-113.. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.11.011.
- Lagunes Espinoza, Luz del Carmen, Thierry Huguet, and Bernadette Julier. 2012. “Multi-Population QTL Detection for Aerial Morphogenetic Traits in the Model Legume *Medicago Truncatula*.” *Theoretical and Applied Genetics* 124(4): 739–54.
- Laloi, Christophe, Klaus Apel, and Antoine Danon. 2004. “Reactive Oxygen Signalling: The Latest News.” *Current Opinion in Plant Biology* 7(3): 323–28.
- Lazali, M, S Brahim, C Benadis, and J J Drevon. 2020. “Stratégies et Mécanismes d ’ Adaptation Des Légumineuses à La Faible Disponibilité Des Sols En Phosphore.” : 294–300.
- Le Signor, C., Aimé, D., Bordat, A., Belghazi, M., Labas, V., Gouzy, J., ... & Gallardo, K. 2017. Genome-wide association studies with proteomics data reveal genes important for synthesis, transport and packaging of globulins in legume seeds. *New Phytologist*, 214(4), 1597-1613. doi: 10.1111/nph.14500.

- Leitão, S. T., Santos, C., Araújo, S. de S., Rubiales, D., & Vaz Patto, M. C. (2021). Shared and tailored common bean transcriptomic responses to combined fusarium wilt and water deficit. *Horticulture Research*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00583-2>
- Li, Fang et al. 2022. “Transcriptome Analysis Revealed the Molecular Response Mechanism of High-Resistant and Low-Resistant Alfalfa Varieties to Verticillium Wilt.” *Frontiers in Plant Science* 13(June).
- Li, H., Pan, Y., Zhang, Y., Wu, C., Ma, C., Yu, B., Zhu, N., Koh, J., & Chen, S. (2015). Salt stress response of membrane proteome of sugar beet monosomic addition line M14. *Journal of Proteomics*, 127, 18–33. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.025>
- Li, T. G., Wang, B. L., Yin, C. M., Zhang, D. D., Wang, D., Song, J., Zhou, L., Kong, Z. Q., Klosterman, S. J., Li, J. J., Adamu, S., Liu, T. L., Subbarao, K. V., Chen, J. Y., & Dai, X. F. (2019). The *Gossypium hirsutum* TIR-NBS-LRR gene GhDSC1 mediates resistance against Verticillium wilt. *Molecular Plant Pathology*, 20(6), 857–876. <https://doi.org/10.1111/mpp.12797>
- Li, X., Zheng, H., Wu, W., Liu, H., Wang, J., Jia, Y., Li, J., Yang, L., Lei, L., Zou, D., & Zhao, H. (2020). QTL Mapping and Candidate Gene Analysis for Alkali Tolerance in Japonica Rice at the bud Stage Based on Linkage Mapping and Genome-Wide Association Study. *Rice*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12284-020-00412-5>
- Li, Y., Hu, Y., Wang, J., Liu, X., Zhang, W., & Sun, L. (2020). Structural Insights into a Plant Mechanosensitive Ion Channel MSL1. *Cell Reports*, 30(13), 4518-4527.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.026>
- Li, Yawen et al. 2020. “Structural Insights into a Plant Mechanosensitive Ion Channel MSL1.” *Cell Reports* 30(13): 4518-4527.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.026>.
- Lian, Na, Xinwei Wang, Yanping Jing, and Jinxing Lin. 2021. “Regulation of Cytoskeleton-Associated Protein Activities: Linking Cellular Signals to Plant Cytoskeletal Function.” *Journal of Integrative Plant Biology* 63(1): 241–50.
- Lin, S., Niu, Y., Augusto Medina, C., & Yu, L. X. (2022). Two linked resistance genes function divergently in defence against Verticillium Wilt in Alfalfa. *Plant Biotechnology Journal*, 20(4), 619–621. <https://doi.org/10.1111/pbi.13779>
- Lindström, Kristina, and Seyed Abdollah Mousavi. 2020. “Effectiveness of Nitrogen Fixation in Rhizobia.” *Microbial Biotechnology* 13(5): 1314–35.
- Lindström, M. S. (2009). Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 167–170. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.083>
- Liu, Chunlin et al. 2008. “Antagonism between Acibenzolar-S-Methyl-Induced Systemic Acquired Resistance and Jasmonic Acid-Induced Systemic Acquired Susceptibility to Colletotrichum Orbiculare Infection in Cucumber.” *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72(4–6): 141–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmp.2008.08.001>.

- Liu, Henry et al. 1998. "Cloning and Characterization of Two Phosphate Transporters from *Medicago truncatula* Roots : Regulation in Response to Phosphate and to Colonization by Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi." 11(1): 14–22.
- Liu, Peng et al. 2022. "A Combination of a Genome-Wide Association Study and a Transcriptome Analysis Reveals CircRNAs as New Regulators Involved in the Response to Salt Stress in Maize." *International Journal of Molecular Sciences* 23(17).
- Liu, X., Huang, M., Fan, B., Buckler, E. S., & Zhang, Z. (2016). Iterative Usage of Fixed and Random Effect Models for Powerful and Efficient Genome- Wide Association Studies. *Mlm*, 1–24. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-100>
- Liu, Y., Wei, H., Ma, M., Li, Q., Kong, D., Sun, J., Ma, X., Wang, B., Chen, C., Xie, Y., & Wang, H. (2019). *Arabidopsis* FHY3 and FAR1 Regulate the Balance between Growth and Defense Responses under Shade Conditions. *The Plant Cell*, 31(9), 2089–2106. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00991>
- Lynch, Jonathan P, and Stephen E Beebe. 1995. "Adaptation of Beans (*Phaseolus Vulgaris* L .) to Low Phosphorus Availability." 30(6): 1165–71.
- Ma, Xiaomin, Yuan Liu, Weijun Shen, and Yakov Kuzyakov. 2021. "Phosphatase Activity and Acidification in Lupine and Maize Rhizosphere Depend on Phosphorus Availability and Root Properties: Coupling Zymography with Planar Optodes." *Applied Soil Ecology* 167(April): 104029. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104029>.
- Macho, A. P., & Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular cell*, 54(2), 263-272.
- Madrid, E., Barilli, E., Gil, J., Huguet, T., Gentzbittel, L., & Rubiales, D. 2014. Detection of partial resistance quantitative trait loci against *Didymella pinodes* in *Medicago truncatula*. *Molecular breeding*, 33, 589-599. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9976-z>
- Maharshi, A., Rashid, M. M., Teli, B., Yadav, S. K., Singh, D. P., & Sarma, B. K. (2021). Salt stress alters pathogenic behaviour of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and contributes to severity in chickpea wilt incidence. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 113(September 2020), 101602. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101602>
- Mahawer, S. K., Arya, S., Kabdal, T., Kumar, R., Prakash, O., Chitara, M. K., & Koli, P. 2022. Plant defense systems: mechanism of self-protection by plants against pathogens. *Plant Protection: From Chemicals to Biologicals*, 115.
- Manchanda, G, and N Garg. 2011. "Alleviation of Salt-Induced Ionic , Osmotic and Oxidative Stresses in *Cajanus* *Cajan* Nodules by AM Inoculation." 3504.
- Margheim, J. F., Baltensperger, D. D., Wilson, R. G., Lyon, D. J., Hein, G. L., Harveson, R. M., ... & Hansen, B. J. (2004). EC04-183 Chickpea Production in the High Plains.
- Marusig, Daniel, and Sergio Tombesi. 2020. "Abscisic Acid Mediates Drought and Salt Stress Responses in *Vitis Vinifera*—a Review." *International Journal of Molecular Sciences* 21(22): 1–16.

- Máthé, C., Garda, T., Freytag, C., & Hamvas, M. M. (2019). The role of serine-threonine protein phosphatase pp2a in plant oxidative stress signaling—facts and hypotheses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20123028>
- Mathew, Betty T. et al. 2020. “Halotolerant Marine Rhizosphere-Competent Actinobacteria Promote *Salicornia Bigelovii* Growth and Seed Production Using Seawater Irrigation.” *Frontiers in Microbiology* 11(April).
- Mazurier, M. (2018). Biodiversité et adaptation au pathogène racinaire *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula*. Importance de la micro-évolution (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier (Toulouse 3)).
- McDonald, Bruce A., and Celeste Linde. 2002. “Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential, and Durable Resistance.” *Annual Review of Phytopathology* 40: 349–79.
- Merga, Bulti, and Jema Haji. 2019. “Economic Importance of Chickpea: Production, Value, and World Trade.” *Cogent Food and Agriculture* 5(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1615718>.
- Mert, M. et al. 2005. “Inheritance of Resistance to *Verticillium* Wilt (*Verticillium Dahliae*) in Cotton (*Gossypium Hirsutum* L.)” *Plant Breeding* 124(1): 102–4.
- Michno, J. M., Liu, J., Jeffers, J. R., Stupar, R. M., & Myers, C. L. 2020. Identification of nodulation-related genes in *Medicago truncatula* using genome-wide association studies and co-expression networks. *Plant Direct*, 4(5), e00220. doi: 10.1002/pld3.220.
- Mills, A. A. S., Platt, H. W., & Hurta, R. A. R. (2004). Effect of salt compounds on mycelial growth, sporulation and spore germination of various potato pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 34(3), 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.05.022>
- Mittler, Ron. 2006. “Abiotic Stress, the Field Environment and Stress Combination.” *Trends in Plant Science* 11(1): 15–19.
- Miura, Kenji, and Yasuomi Tada. 2014. “Regulation of Water, Salinity, and Cold Stress Responses by Salicylic Acid.” *Frontiers in Plant Science* 5(JAN): 1–12.
- Mohammadi, A. H., Banihashemi, Z., & Maftoun, M. (2007). Interaction between salinity stress and *verticillium* wilt disease in three pistachio rootstocks in a calcareous soil. *Journal of Plant Nutrition*, 30(2), 241–252. <https://doi.org/10.1080/01904160601118000>
- MOL, L., K. SCHOLTE, and J. VOS. 1995. “Effects of Crop Rotation and Removal of Crop Debris on the Soil Population of Two Isolates of *Verticillium Dahliae*.” *Plant Pathology* 44(6): 1070–74.
- Molinéro-Demilly V, Montegano B, Julier B, Giroult C, Baudouin P, Chosson JF, Bayle B, Noël D,
- Moreau, Delphine et al. 2012. “Using a Physiological Framework for Improving the Detection of Quantitative Trait Loci Related to Nitrogen Nutrition in *Medicago Truncatula*.” *Theoretical and Applied Genetics* 124(4): 755–68.

- Morere-Le Paven, M. C., Viau, L., Hamon, A., Vandecasteele, C., Pellizzaro, A., Bourdin, C., ... & Limami, A. M. 2011. Characterization of a dual-affinity nitrate transporter MtNRT1.3 in the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5595-5605. doi: 10.1093/jxb/err243.
- Moriuchi KS, Friesen ML, Cordeiro MA, Badri M, Vu WT, Main BJ, Aouani ME, Nuzhdin SV, Strauss
- Mota, A. P. Z., Brasileiro, A. C. M., Vidigal, B., Oliveira, T. N., da Cunha Quintana Martins, A., Saraiva, M. A. de P., de Araújo, A. C. G., Togawa, R. C., Grossi-de-Sá, M. F., & Guimaraes, P. M. (2021). Defining the combined stress response in wild *Arachis*. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90607-7>
- Mousavi-Derazmahalleh, Mahsa et al. 2019. “Adapting Legume Crops to Climate Change Using Genomic Approaches.” *Plant Cell and Environment* 42(1): 6–19.
- Mudge, Stephen R., Anne L. Rae, Eugene Diatloff, and Frank W. Smith. 2002. “Expression Analysis Suggests Novel Roles for Members of the Pht1 Family of Phosphate Transporters in Arabidopsis.” *Plant Journal* 31(3): 341–53.
- Munns, Rana, and Mark Tester. 2008. “Mechanisms of Salinity Tolerance.”
- Munns, Rana. 2002. “Comparative Physiology of Salt and Water Stress.” *Plant, Cell and Environment* 25(2): 239–50.
- Munns, Rana. 2005. “Genes and Salt Tolerance: Bringing Them Together.” *New Phytologist* 167(3): 645–63.
- Nadeem, M., Li, J., Yahya, M., Wang, M., Ali, A., Cheng, A., Wang, X., & Ma, C. (2019). Grain Legumes and Fear of Salt Stress: Focus on Mechanisms and Management Strategies. <https://doi.org/10.3390/ijms20040799>
- Nakagami, Hirofumi, Andrea Pitzschke, and Heribert Hirt. 2005. “Emerging MAP Kinase Pathways in Plant Stress Signalling.” *Trends in Plant Science* 10(7): 339–46.
- Namvar, Ali, and Raouf Seyed Sharifi. 2011. “Phenological and Morphological Response of Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) to Symbiotic and Mineral Nitrogen Fertilization.” 98(2): 121–30.
- Navada, Sharada et al. 2020. “Biofilms Remember: Osmotic Stress Priming as a Microbial Management Strategy for Improving Salinity Acclimation in Nitrifying Biofilms.” *Water Research* 176: 1–9.
- Negahi, A. et al. 2014. “Quantitative Trait Loci Associated with Resistance to a Potato Isolate of *Verticillium Albo-Atrum* in *Medicago Truncatula*.” *Plant Pathology* 63(2): 308–15.
- Nussaume L, Kanno S, Javot H, Marin E, Pochon N, Ayadi A, Nakanishi TM, Marie-Thibaud C .2011 Phosphate import in plants: focus on the PHT1 transporters. *Front Plant Sci* 2. doi:10.3389/fpls.2011.00083
- offspring germination in response to salinity stress and the seed transcriptome of *Medicago*

- Ogawa, T., Ueda, Y., Yoshimura, K., & Shigeoka, S. (2005). Comprehensive analysis of cytosolic nudix hydrolases in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 25277–25283. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503536200>
- Oke, Valerie, and Sharon R. Long. 1999. “Bacteroid Formation in the Rhizobium-Legume Symbiosis.” *Current Opinion in Microbiology* 2(6): 641–46.
- Ozyazici, Mehmet Arif, and Semih Acikbas. 2021. “The Benefits of Legumes for Agriculture Sustainability.” (September).
- Paape, T., Heiniger, B., Santo Domingo, M., Clear, M. R., Lucas, M. M., & Pueyo, J. J. (2022). Genome-wide association study reveals complex genetic architecture of cadmium and mercury accumulation and tolerance traits in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 3211. doi: 10.3389/fpls.2021.806949
- Pan, Ting et al. 2021. “Non-Stomatal Limitation of Photosynthesis by Soil Salinity.” *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 51(8): 791–825. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1735231>.
- Pandey, P., & Senthil-Kumar, M. (2019). Plant-pathogen interaction in the presence of abiotic stress: What do we know about plant responses? *Plant Physiology Reports*, 24(4), 541–549. <https://doi.org/10.1007/s40502-019-00483-7>
- Pandey, Prachi, Venkategowda Ramegowda, and Muthappa Senthil-Kumar. 2015. “Shared and Unique Responses of Plants to Multiple Individual Stresses and Stress Combinations: Physiological and Molecular Mechanisms.” *Frontiers in Plant Science* 6(September): 1–14.
- Pang, Jiayin et al. 2022. “Root Diameter Decreases and Rhizosheath Carboxylates and Acid Phosphatases Increase in Chickpea during Plant Development.” *Plant and Soil* 476(1–2): 219–38. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05579-y>.
- Pang, Jiayin, Megan H. Ryan, Hans Lambers, and Kadambot HM Siddique. 2018. “Phosphorus Acquisition and Utilisation in Crop Legumes under Global Change.” *Current Opinion in Plant Biology* 45: 248–54. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.05.012>.
- Park, C. J., & Park, J. M. (2019). Endoplasmic reticulum plays a critical role in integrating signals generated by both biotic and abiotic stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10(April). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00399>
- Park, Hee Jin, Woe-yeon Kim, and Dae-jin Yun. 2016. “A New Insight of Salt Stress Signaling in Plant.” 39(6): 447–59.
- Pierre, Jean Baptiste et al. 2008. “Detection of QTLs for Flowering Date in Three Mapping Populations of the Model Legume Species *Medicago Truncatula*.” *Theoretical and Applied Genetics* 117(4): 609–20.
- Pirasteh-Anosheh, Hadi, Gholamhassan Ranjbar, Hassan Pakniyat, and Yahya Emam. 2015. “Physiological Mechanisms of Salt Stress Tolerance in Plants: An Overview.” *Plant-Environment Interaction: Responses and Approaches to Mitigate Stress* (January): 141–60.
- Plaxton, William C., and Hue T. Tran. 2011. “Metabolic Adaptations of Phosphate-Starved Plants.” *Plant Physiology* 156(3): 1006–15.

- Polash Mohammed Arif Sadik, Sakil Md Arif, and Hossain Md Alamgir. 2019. "Plants Responses and Their Physiological and Biochemical Defense Mechanisms against Salinity: A Review." *Tropical Plant Research* 6(2): 250–74.
- Polash, M. A. S., Sakil, M. A., & Hossain, M. A. 2019. Plants responses and their physiological and biochemical defense mechanisms against salinity: A review. *Trop. Plant Res*, 6, 250-274.
- Postma, Johannes Auke et al. 2014. "The Optimal Lateral Root Branching Density for Maize Depends on Nitrogen and Phosphorus." 166(October): 590–602.
- Praharaj, S. & Maitra, S. 2020. "Importance of Legumes in Agricultural Production System: An Overview." *Agro Economist* 72(November 2020): 69–71.
- Prasch, Christian M., and Uwe Sonnewald. 2015. "Signaling Events in Plants: Stress Factors in Combination Change the Picture." *Environmental and Experimental Botany* 114: 4–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.020>.
- Pratt, James et al. 2009. "Phosphate (Pi) Starvation Effect on the Cytosolic Pi Concentration and Pi Exchanges across the Tonoplast in Plant Cells: An in Vivo 31P-Nuclear Magnetic Resonance Study Using Methylphosphonate as a Pi Analog." *Plant Physiology* 151(3): 1646–57.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Rosenberg, N. A., & Donnelly, P. (2000). Association Mapping in Structured Populations. 170–181.
- Proadhan, M Asaduzzaman, Patrick M Finnegan, and Hans Lambers. 2019. "How Does Evolution in Phosphorus-Impoverished Landscapes Impact Plant Nitrogen and Sulfur Assimilation ?" *Trends in Plant Science* 24(1): 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.004>.
- Rahman, G. K. M. Mustafizur et al. 2020. Carbon and Nitrogen Cycling in Soil Biochar and Organic Amendments for Sustainable Soil Carbon and Soil Health.
- Ramegowda, V., Senthil-Kumar, M., Ishiga, Y., Kaundal, A., Udayakumar, M., & Mysore, K. S. (2013). Drought stress acclimation imparts tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Pseudomonas syringae* in *Nicotiana benthamiana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9497–9513. <https://doi.org/10.3390/ijms14059497>
- Ramegowda, Venkategowda, and Muthappa Senthil-Kumar. 2015. "The Interactive Effects of Simultaneous Biotic and Abiotic Stresses on Plants: Mechanistic Understanding from Drought and Pathogen Combination." *Journal of Plant Physiology* 176: 47–54.
- Ramu, Vemanna S. et al. 2016. "Transcriptome Analysis of Sunflower Genotypes with Contrasting Oxidative Stress Tolerance Reveals Individual-And Combined-Biotic and Abiotic Stress Tolerance Mechanisms." *PLoS ONE* 11(6): 1–19.
- Rasmussen, Simon et al. 2013. "Transcriptome Responses to Combinations of Stresses in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 161(4): 1783–94.

- Rausch, Christine, and Æ Marcel Bucher. 2002. "Molecular Mechanisms of Phosphate Transport in Plants." : 23–37.
- Raymond, Nelly S. et al. 2021. "Phosphate-Solubilising Microorganisms for Improved Crop Productivity: A Critical Assessment." *New Phytologist* 229(3): 1268–77.
- Ren, Z., Liu, W., Wang, X., Chen, M., Zhao, J., Zhang, F., Feng, H., Liu, J., Yang, D., Ma, X., & Li, W. (2021). SEVEN IN ABSENTIA Ubiquitin Ligases Positively Regulate Defense Against *Verticillium dahliae* in *Gossypium hirsutum*. *Frontiers in Plant Science*, 12(October), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.760520>
- Robert-Seilaniantz, Alexandre, Lionel Navarro, Rajendra Bari, and Jonathan DG Jones. 2007. "Pathological Hormone Imbalances." *Current Opinion in Plant Biology* 10(4): 372–79.
- Roux, Brice et al. 2014. "An Integrated Analysis of Plant and Bacterial Gene Expression in Symbiotic Root Nodules Using Laser-Capture Microdissection Coupled to RNA Sequencing." *Plant Journal* 77(6): 817–37.
- Saadatmand, A. R., Banihashemi, Z., Sepaskhah, A. R., & Maftoun, M. (2008). Soil Salinity and Water Stress and Their Effect on Susceptibility to *Verticillium* Wilt Disease, Ion Composition and Growth of Pistachio. *Journal of Phytopathology*, 156(5), 287–292. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01360.x>
- Saadatmand, A. R., Z. Banihashemi, A. R. Sepaskhah, and M. Maftoun. 2008. "Soil Salinity and Water Stress and Their Effect on Susceptibility to *Verticillium* Wilt Disease, Ion Composition and Growth of Pistachio." *Journal of Phytopathology* 156(5): 287–92. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0434.2007.01360.x>.
- Sadeghi, B., Mirzaei, S., & Fatehi, F. (2022). Scientia Horticulturae The proteomic analysis of the resistance responses in tomato during interaction with *Alternaria alternate*. *Scientia Horticulturae*, 304(April), 111295. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111295>
- Šamajová, Olga et al. 2013. "Improvement of Stress Tolerance in Plants by Genetic Manipulation of Mitogen-Activated Protein Kinases." *Biotechnology Advances* 31(1): 118–28.
- Sankaran, Renuka P., Thierry Huguet, and Michael A. Grusak. 2009. "Identification of QTL Affecting Seed Mineral Concentrations and Content in the Model Legume *Medicago truncatula*." *Theoretical and Applied Genetics* 119(2): 241–53.
- Santhanam, Parthasarathy et al. 2013. "Evidence for Functional Diversification Within a Fungal NEP1-Like Protein Family." 26(3): 278–86.
- Santino, A., Taurino, M., De Domenico, S., Bonsegna, S., Poltronieri, P., Pastor, V., & Flors, V. (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Reports*, 32(7), 1085–1098. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1441-2>
- Sato, Shusei et al. 2008. "Genome Structure of the Legume, *Lotus Japonicus*." *DNA Research* 15(4): 227–39.
- Sbeiti, A. A. L., Mazurier, M., Ben, C., Rickauer, M., & Gentzbittel, L. (2023). Temperature increase modifies susceptibility to *Verticillium* wilt in *Medicago* spp and may contribute to the emergence of more

- aggressive pathogenic strains. *Frontiers in Plant Science*, 14(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1109154>
- Scheelbeek, Pauline F.D. et al. 2018. “Effect of Environmental Changes on Vegetable and Legume Yields and Nutritional Quality.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(26): 6804–9.
- Schwember, Andrés R., Joachim Schulze, Alejandro del Pozo, and Ricardo A Cabeza. 2019. “Regulation of Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Root Nodules.” *Plants* 8(9): 333. <https://doi.org/10.3390/plants8090333>.
- Sharma, S., & Sharma, R. (2020). Chickpea economy in India. In *Chickpea: Crop Wild Relatives for Enhancing Genetic Gains* (pp. 225-250). Academic Press.
- Sharma, Seema B., Riyaz Z. Sayyed, Mrugesh H. Trivedi, and Thivakaran A. Gobi. 2013. “Phosphate Solubilizing Microbes: Sustainable Approach for Managing Phosphorus Deficiency in Agricultural Soils.” *SpringerPlus* 2(1): 1–14.
- Shi, J., Zhang, M., Zhai, W., Meng, J., Gao, H., Zhang, W., Han, R., & Qi, F. (2018). Genome-wide analysis of nucleotide binding site-leucine-rich repeats (NBS-LRR) disease resistance genes in *Gossypium hirsutum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 104, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.07.007>
- Shi, Shangli, Lili Nan, and Kevin F. Smith. 2017. “The Current Status, Problems, and Prospects of Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) Breeding in China.” *Agronomy* 7(1): 1–11.
- Shiferaw B, Bantilan MCS, Gupta SC and Shetty SVR. 2004. “Research Spillover Benefits and Experiences in Interregional Technology Transfer: An Assessment and Synthesis.” *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*. 21(1): 1–9. <http://journal.um-surabaya.ac.id/index.php/JKM/article/view/2203>.
- Singh, P., Rajput, R. S., Ram, R. M., & Singh, H. B. 2019. A deeper insight into the symbiotic mechanism of *Rhizobium* spp. from the perspective of secondary metabolism. *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and Applications*, 265-291.
- Shoaib, A., Meraj, S., Nafisa, Khan, K. A., & Javaid, M. A. 2018. Influence of salinity and *Fusarium oxysporum* as the stress factors on morpho-physiological and yield attributes in onion. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(6), 1093–1101. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0570-z>
- Short, Dylan P G et al. 2015. “Dynamics of *Verticillium* Species *Microsclerotia* in Field Soils in Response to Fumigation , Cropping Patterns , and Flooding.” (1): 638–45.
- Simko, I. et al. 2004. “Linkage Disequilibrium Mapping of a *Verticillium Dahliae* Resistance Quantitative Trait Locus in Tetraploid Potato (*Solanum Tuberosum*) through a Candidate Gene Approach.” *Theoretical and Applied Genetics* 108(2): 217–24.

- Simpson, Richard J. et al. 2015. "Management of Soil Phosphorus Fertility Determines the Phosphorus Budget of a Temperate Grazing System and Is the Key to Improving Phosphorus Efficiency." *Agriculture, Ecosystems and Environment* 212: 263–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2015.06.026>.
- Smit, Franchoan, and I A N A Dubery. 1997. "CELL WALL R E I N F O R C E M E N T IN COTTON H Y P O C O T Y L S IN." 44(5): 811–15.
- Sofo, Adriano, Antonio Scopa, Maria Nuzzaci, and Antonella Vitti. 2015. "Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses." *International Journal of Molecular Sciences* 16(6): 13561–78.
- Solomon, P. S., Waters, O. D. C., & Oliver, R. P. (2007). Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends in Microbiology*, 15(6), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.04.002>
- Sommer, N., Junne, T., Kalies, K. U., Spiess, M., & Hartmann, E. (2013). TRAP assists membrane protein topogenesis at the mammalian ER membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3104–3111. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.08.018>
- Spoel, Steven H., and Xinnian Dong. 2008. "Making Sense of Hormone Crosstalk during Plant Immune Responses." *Cell Host and Microbe* 3(6): 348–51.
- Stagnari, Fabio, Albino Maggio, Angelica Galieni, and Michele Pisante. 2017. "Multiple Benefits of Legumes for Agriculture Sustainability: An Overview." *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4(1): 1–14.
- Stanton-Geddes J, Paape T, Epstein B, Briskine R, Yoder J, Mudge J, et al. 2013 Candidate Genes and Genetic Architecture of Symbiotic and Agronomic Traits Revealed by Whole-Genome, Sequence-Based Association Genetics in *Medicago truncatula*. *PLoS ONE* 8(5): e65688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065688>
- Suleman, P., A. Al-Musallam, and C. A. Menezes. 2001. "The Effect of Solute Potential and Water Stress on Black Scorch Caused by *Chalara Paradoxa* and *Chalara Radicicola* on Date Palms." *Plant Disease* 85(1): 80–83.
- Sulieman, S., & Tran, L. S. P. 2017. Legume Nitrogen Fixation in Soils with Low Phosphorus Availability Legume Nitrogen Fixation in Soils with Low Phosphorus Availability.
- Sun, Caixia, Xiaoxiao Gao, Jianqi Fu, and Jiahao Zhou. 2015. "Metabolic Response of Maize (*Zea Mays* L .) Plants to Combined Drought and Salt Stress." : 99–117.
- 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
- Sunarti, S., Kissoudis, C., Van Der Hoek, Y., Van Der Schoot, H., Visser, R. G. F., Van Der Linden, C. G., Van De Wiel, C., & Bai, Y. (2022). Drought Stress Interacts With Powdery Mildew Infection in Tomato. *Frontiers in Plant Science*, 13(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.845379>
- Sunita Kataria ;Sandeep Kumar Verma. 2018. "Salinity Responses and Tolerance in Plants." In *Springer, Cham*, , 1–39.

- Suzuki, N., & Katano, K. (2018). Coordination between ROS regulatory systems and other pathways under heat stress and pathogen attack. *Frontiers in Plant Science*, 9(April), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00490>
- Svistoonoff, Sergio et al. 2003. “Cg12 Expression Is Specifically Linked to Infection of Root Hairs and Cortical Cells during *Casuarina Glauca* and *Allocauarina Verticillata* Actinorhizal Nodule Development.” *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(7): 600–607.
- Swarnalakshmi, Karivaradharajan et al. 2020. “Significance of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Grain Legumes: Growth Promotion and Crop Production.” *Plants* 9(11): 1–25.
- Swarupa V, Ravishankar K, Rekha A 2013. Characterization of tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp., cubense infection in banana using suppression subtractive hybridization and gene expression analysis. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 83: 1-7.
- Swarupa V, Ravishankar K, Rekha A 2014. Plant defense response against *Fusarium oxysporum* and strategies to develop tolerant genotypes in banana. *PLANTA*, 239(4): 735-751.
- SY, von Wettberg EJB. 2016. Salinity Adaptation and the Contribution of Parental Environmental
- Taiz, L., and Zeiger, E. 2006. Secondary metabolites and plant defense. *Plant Physiol.* 4, 315–344.
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). PAMP s and DAMP s: signal Os that spur autophagy and immunity. *Immunological reviews*, 249(1), 158-175.
- Tang, Haibao et al. 2014. “An Improved Genome Release (Version Mt4.0) for the Model Legume *Medicago Truncatula*.” *BMC Genomics* 15(1): 1–14.
- Tang, Y., Zhang, Z., Lei, Y., Hu, G., Liu, J., Hao, M., ... & Wu, J. 2019. Cotton WATs modulate SA biosynthesis and local lignin deposition participating in plant resistance against *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 526.
- Tarik Mitran, Ram Swaroop Meena, Rattan Lal, Jayanta Layek, Sandeep Kumar, and Rahul Datta. 2018. “Role of Soil Phosphorus on Legume Production.”
- Tena, Wondwosen, Endalkachew Wolde-meskel, and Fran Walley. 2016. “Response of Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) to Inoculation with Native and Exotic Mesorhizobium Strains in Southern Ethiopia.” 15(35): 1920–29.
- Terefework, Zewdu. 2002. Diversity and Phylogeny of Rhizobium Galegae , and Reflections on Molecular Evolution of Rhizobium-Legume Symbiosis . Zewdu Terefework.
- Teshome, Demissew Tesfaye, Godfrey Elijah Zharare, and Sanushka Naidoo. 2020. “The Threat of the Combined Effect of Biotic and Abiotic Stress Factors in Forestry Under a Changing Climate.” *Frontiers in Plant Science* 11(November).
- Tewari, Sakshi, Vijay Pooniya, and Shilpi Sharma. 2020. “Next Generation Bioformulation Prepared by Amalgamating Bradyrhizobium, Cell Free Culture Supernatant, and Exopolysaccharides Enhances the

- Indigenous Rhizospheric Rhizobial Population, Nodulation, and Productivity of Pigeon Pea.” *Applied Soil Ecology* 147(September 2019): 103363. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103363>.
- Timpson, Nicholas J. et al. 2018. “Genetic Architecture: The Shape of the Genetic Contribution to Human Traits and Disease.” *Nature Reviews Genetics* 19(2): 110–24. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2017.101>.
- Toker, C., Berger, J., Eker, T., Sari, D., Sari, H., Gokturk, R. S., ... & von Wettberg, E. J. (2021). *Cicer turcicum*: A new *Cicer* species and its potential to improve chickpea. *Frontiers in Plant Science*, 12, 662891.
- Ton, Jurriaan, and Gabor Jakab. 2007. “Dissecting the b -Aminobutyric Acid – Induced Priming Phenomenon in *Arabidopsis*.” 17(March 2005): 987–99.
- Ton, Jurriaan, Victor Flors, and Brigitte Mauch-Mani. 2009. “The Multifaceted Role of ABA in Disease Resistance.” *Trends in Plant Science* 14(6): 310–17.
- Tool, P. I. (2022). *User Manual for Genomic Association and Prediction Integrated Tool. Version 3*.
- Toueni, M., Ben, C., Le Ru, A., Gentzbittel, L., & 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. *Frontiers in Plant Science*, 7(September2016), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01431>
- Toueni, Maoulida. 2014. “Etude de l’interaction Entre *Verticillium Alfarfae* et *Medicago Truncatula*. (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier (Toulouse 3))
- Toueni, Maoulida. 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.” *Frontiers in Plant Science* 7(September2016): 1–20.
- Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, 16(9), 2481–2498. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022699>
- Tripathi, Deepika, Mithilesh Singh, and Shashi Pandey-Rai. 2022. “Crosstalk of Nanoparticles and Phytohormones Regulate Plant Growth and Metabolism under Abiotic and Biotic Stress.” *Plant Stress* 6(April): 100107. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100107>.
- truncatula*. *BMC Evolutionary Biology* 15.
- Valentine, Alex J., Aleyasia Kleinert, and Vagner A. Benedito. 2017. “Adaptive Strategies for Nitrogen Metabolism in Phosphate Deficient Legume Nodules.” *Plant Science* 256: 46–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.12.010>.
- Vance, Carroll P, Carroll P Vance, Claudia Uhde-stone, and Deborah L Allan. 2003. “Phosphorus Acquisition and Use : Critical Adaptations by Plants for Securing a Nonrenewable Resource.” : 423–47.
- Vandecasteele, C., TEULAT-MERAH, B. É. A. T. R. I. C. E., MORÈRE-LE PAVEN, M. C., Leprince, O., LY VU, B. E. N. O. I. T., Viau, L., ... & Buitink, J. (2011). Quantitative trait loci analysis reveals a

- correlation between the ratio of sucrose/raffinose family oligosaccharides and seed vigour in *Medicago truncatula*. *Plant, Cell & Environment*, 34(9), 1473-1487.doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02346.x. .
- Vandemark, George J., Richard C. Larsen, and Teresa J. Hughes. 2006. "Heritability of Resistance to Verticillium Wilt in Alfalfa." *Plant Disease* 90(3): 314–18.
- Varshney, Rajeev K. et al. 2013. "Draft Genome Sequence of Chickpea (*Cicer Arietinum*) Provides a Resource for Trait Improvement." *Nature Biotechnology* 31(3): 240–46.
- Veley, K. M., Marshburn, S., Clure, C. E., & Haswell, E. S. (2012). Mechanosensitive channels protect plastids from hypoosmotic stress during normal plant growth. *Current Biology*, 22(5), 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.027>
- Vengavasi, Krishnapriya, and Renu Pandey. 2016. "Root Acidification , a Rapid Method of Screening Soybean Genotypes for Low-Phosphorus Stress." 76(2): 213–16.
- Vicente, J., Cascón, T., Vicedo, B., García-Agustín, P., Hamberg, M., & Castresana, C. (2012). Role of 9-lipoxygenase and α -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense. *Molecular Plant*, 5(4), 914–928. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr105>
- Vu WT, Chang PL, Moriuchi KS, Friesen ML. 2015. Genetic variation of transgenerational plasticity of
- Wang, B L et al. 2006. "Citrate Exudation from White Lupin Induced by Phosphorus Deficiency Differs from That Induced by Aluminum."
- Wang, Changshu et al. 2019. "Five-Year Experimental Study on Effectiveness and Sustainability of a Dry Drainage System for Controlling Soil Salinity." *Water (Switzerland)* 11(1): 15–17.
- Wang, Che, Li Jun Zhang, and Rui Dong Huang. 2011. "Cytoskeleton and Plant Salt Stress Tolerance." *Plant Signaling and Behavior* 6(1): 1–4.
- Wang, J., & Zhang, Z. (2021). GAPIT Version 3: boosting power and accuracy for genomic association and prediction. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 19(4), 629-640.
- Wang, Mingyi et al. 2013. "LegumeGRN: A Gene Regulatory Network Prediction Server for Functional and Comparative Studies." *PLoS ONE* 8(7).
- Wang, W., Tang, W., Ma, T., Niu, D., Jin, J. B., Wang, H., & Lin, R. (2016). A pair of light signaling factors FHY3 and FAR1 regulates plant immunity by modulating chlorophyll biosynthesis. 58(1). <https://doi.org/10.1111/jipb.12369>
- Wang, Y., Mostafa, S., Zeng, W., & Jin, B. (2021). Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168568>
- Wang, Ying et al. 2021. "Regulation and Function of Defense-Related Callose Deposition in Plants." *International Journal of Molecular Sciences* 22(5): 1–15.

- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111(6), 1021–1058. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Wen, Zhihui et al. 2019. “Tradeoffs among Root Morphology , Exudation and Mycorrhizal Symbioses for Phosphorus-Acquisition Strategies of 16 Crop Species.”
- White, James, Jurgen Prell, Euan K. James, and Philip Poole. 2007. “Nutrient Sharing between Symbionts.” *Plant Physiology* 144(2): 604–14.
- Williamson, V. M., & Kumar, A. (2006). Nematode resistance in plants : the battle underground. 22(7). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.05.003>
- Wu, Aijiao et al. 2021. “Root Morphology and Rhizosphere Acid Phosphatase Activity in Legume and Graminoid Species Respond Differently to Low Phosphorus Supply.” *Rhizosphere* 19(April): 100391. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100391>.
- Xie, W., & Xiong, Æ. L. (2008). Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. 547–563. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0386-6>
- Xu, Lei et al. 2019. “Identification of Vacuolar Phosphate Efflux Transporters in Land Plants.” *Nature Plants* 5(1): 84–94. <http://dx.doi.org/10.1038/s41477-018-0334-3>.
- Yadeta, Koste A, P Bart, H J Thomma, and Dale Ronald Walters. 2013. “The Xylem as Battleground for Plant Hosts and Vascular Wilt Pathogens.” 4(April): 1–12.
- Yang, Chang et al. 2008. “QTLs Mapping for Verticillium Wilt Resistance at Seedling and Maturity Stages in *Gossypium Barbadosense* L.” *Plant Science* 174(3): 290–98.
- Yang, M., Wang, L., Chen, C., Guo, X., Lin, C., Huang, W., & Chen, L. (2021). Genome-wide analysis of autophagy-related genes in *Medicago truncatula* highlights their roles in seed development and response to drought stress. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02239-6>
- Yang, Yingxue et al. 2022. “Identifying Candidate Genes and Patterns of Heat-Stress Response in Rice Using a Genome-Wide Association Study and Transcriptome Analyses.” *Crop Journal* 10(6): 1633–43. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2022.02.011>.
- Yang, Yongqing Guo, Yan. 2018b. “Unraveling Salt Stress Signaling in Plants.” *Journal of Integrative Plant Biology* 60(9): 796–804.
- Yang, Yongqing, and Yan Guo. 2018a. “Elucidating the Molecular Mechanisms Mediating Plant Salt-Stress Responses.” *New Phytologist* 217(2): 523–39.
- Yasuda, Michiko et al. 2008. “Antagonistic Interaction between Systemic Acquired Resistance and the Abscisic Acid-Mediated Abiotic Stress Response in *Arabidopsis*.” *Plant Cell* 20(6): 1678–92.

- Ye, Jiamin, Wenhua Zhang, and Yan Guo. 2013. "Arabidopsis SOS3 Plays an Important Role in Salt Tolerance by Mediating Calcium-Dependent Microfilament Reorganization." *Plant Cell Reports* 32(1): 139–48.
- Yegrem, Lamesgen. 2021. "Hindawi International Journal of Food Science." *Hindawi International Journal of Food Science* 2021: 1–10.
- Yoshimoto, K., Takano, Y., & Sakai, Y. (2010). Autophagy in plants and phytopathogens. *FEBS Letters*, 584(7), 1350–1358. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.007>
- Young, Nevin D. et al. 2011. "The Medicago Genome Provides Insight into the Evolution of Rhizobial Symbioses." *Nature* 480(7378): 520–24.
- Youssef, C., Aubry, C., Montrichard, F., Beucher, D., Juchaux, M., Ben, C., ... & Teulat, B. 2016. Cell length instead of cell number becomes the predominant factor contributing to hypocotyl length genotypic differences under abiotic stress in *Medicago truncatula*. *Physiologia plantarum*, 156(1), 108-124.[doi: 10.1111/ppl.12379](https://doi.org/10.1111/ppl.12379).
- Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W. H., Bi, I. V., Yamasaki, M., Doebley, J. F., McMullen, M. D., Gaut, B. S., Nielsen, D. M., Holland, J. B., Kresovich, S., & Buckler, E. S. (2006). A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, 38(2), 203–208. <https://doi.org/10.1038/ng1702>
- Yu, Long Xi et al. 2016. "Genotyping-by-Sequencing-Based Genome-Wide Association Studies on Verticillium Wilt Resistance in Autotetraploid Alfalfa (*Medicago Sativa* L.)." *Molecular Plant Pathology* 18(2): 187–94.
- Yu, Long-xi et al. 2020. "Construction of High-Density Linkage Maps and Identification of Quantitative Trait Loci Associated with Verticillium Wilt Resistance in Autotetraploid Alfalfa (*Medicago Sativa* L.)." (May): 1439–44.
- Yu, Zipeng et al. 2020. "How Plant Hormones Mediate Salt Stress Responses." *Trends in Plant Science* 25(11): 1117–30. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.06.008>.
- Zahran, Hamdi Hussein. 1999. "Rhizobium -Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate ." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(4): 968–89.
- Zhang, S., & Klessig, D. F. (1998). Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), 7433–7438. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7433>
- ZHANG, Wen wen, Chong WANG, Rui XUE, and Li jie WANG. 2019. "Effects of Salinity on the Soil Microbial Community and Soil Fertility." *Journal of Integrative Agriculture* 18(6): 1360–68. [http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62077-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62077-5).

- Zhang, Z., Ersoz, E., Lai, C. Q., Todhunter, R. J., Tiwari, H. K., Gore, M. A., Bradbury, P. J., Yu, J., Arnett, D. K., Ordovas, J. M., & Buckler, E. S. (2010a). Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 42(4), 355–360. <https://doi.org/10.1038/ng.546>
- Zhang, Z., Ersoz, E., Lai, C., Todhunter, R. J., Tiwari, H. K., Gore, M. A., Bradbury, P. J., Yu, J., Arnett, D. K., Ordovas, J. M., & Buckler, E. S. (2010b). association studies. 42(4), 355–360. <https://doi.org/10.1038/ng.546>.Mixed
- Zhao, Chunzhao et al. 2020. “Mechanisms of Plant Responses and Adaptation to Soil Salinity.” *The Innovation* 1(1): 100017. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2020.100017>.
- Zhou, Xianrong et al. 2022. “Reactive Oxygen , Nitrogen , Carbonyl and Sulfur Species and Their Roles in Plant Abiotic Stress Responses and Tolerance.” *Journal of Plant Growth Regulation* 41(1): 119–42. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10294-y>.
- Zhou, Y., Vroegop-Vos, I. A., Van Dijken, A. J. H., Van der Does, D., Zipfel, C., Pieterse, C. M. J., & Van Wees, S. C. M. (2020). Carbonic anhydrases CA1 and CA4 function in atmospheric CO₂-modulated disease resistance. *Planta*, 251(4), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03370-w>
- Zhou, Yue, Zijun Yang, Guangqin Guo, and Yan Guo. 2010. “Microfilament Dynamics Is Required for Root Growth under Alkaline Stress in Arabidopsis.” *Journal of Integrative Plant Biology* 52(11): 952–58.
- Zhu, Jian Kang. 2002. “Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants.” *Annual Review of Plant Biology* 53: 247–73.
- Zhu, X., Li, S., Cooper, R. S., & Elston, R. C. (2008). ARTICLE A Unified Association Analysis Approach for Family and Unrelated Samples Correcting for Stratification. February, 352–365. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.10.009>.
- Zine-Zikara F., Bouzid L. et Yekkour A. 2015. “Le Pois Chiche En Algérie : Situation, Potentialités et Perspectives.” *Recherche Agronomique* 27: 35–47.
- Zou, Y., Chintamanani, S., He, P., Fukushige, H., Yu, L., Shao, M., Zhu, L., Hildebrand, D. F., Tang, X., & Zhou, J. M. (2016). A gain-of-function mutation in Msl10 triggers cell death and wound-induced hyperaccumulation of jasmonic acid in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(6), 600–609. <https://doi.org/10.1111/jipb.12427>

Annexes

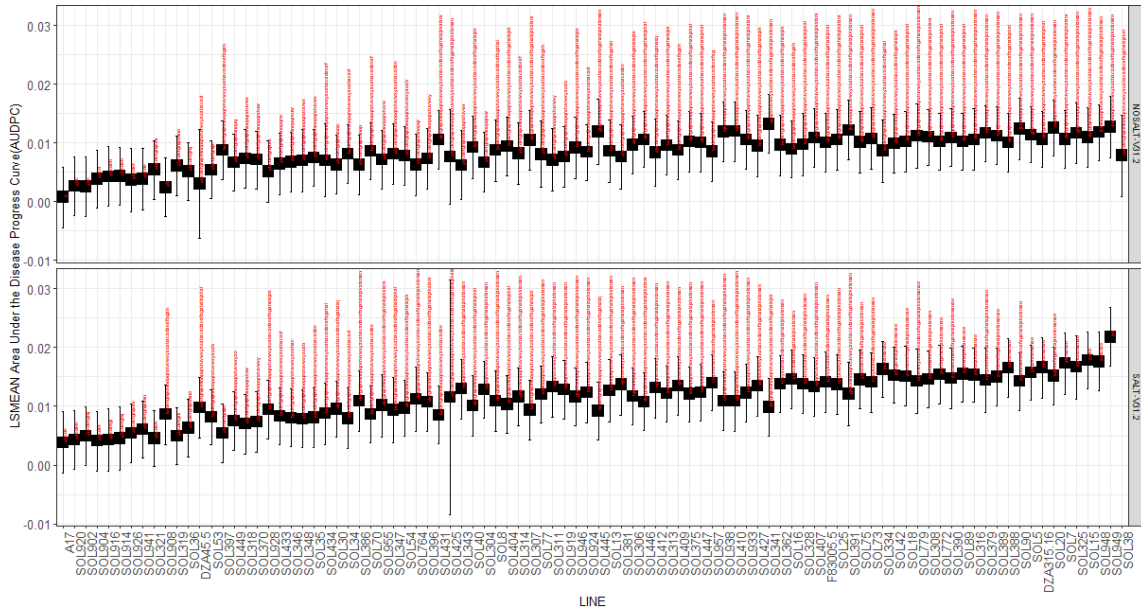
Tableaux supplémentaires

Tableau supplémentaire 1 : Caractéristiques agronomiques des 7 géotypes de pois chiche.

Géotypes	Caractéristiques
ILC 3279	Port haut, tolérante à l'antracnose et au flétrissement, petit grain
FLIP 90-13C	Port érigé, tolérante à l'antracnose et au flétrissement, grain moyen
FLIP 84-92C	Port semi-érigé, tolérante à l'antracnose et au flétrissement, grain moyen
FLIP 01-29C	Port semi-érigé, sensible à l'antracnose et tolérante au flétrissement, grain moyen
GHAB4	Port semi-érigé, sensible à l'antracnose et au flétrissement, petit grain
GHAB5	Port érigé, sensible à l'antracnose et tolérante au flétrissement, petit grain
FLIP 97-677C	Port érigé, tolérante à l'antracnose et sensible au flétrissement, grain moyen

Figures supplémentaires

A



B

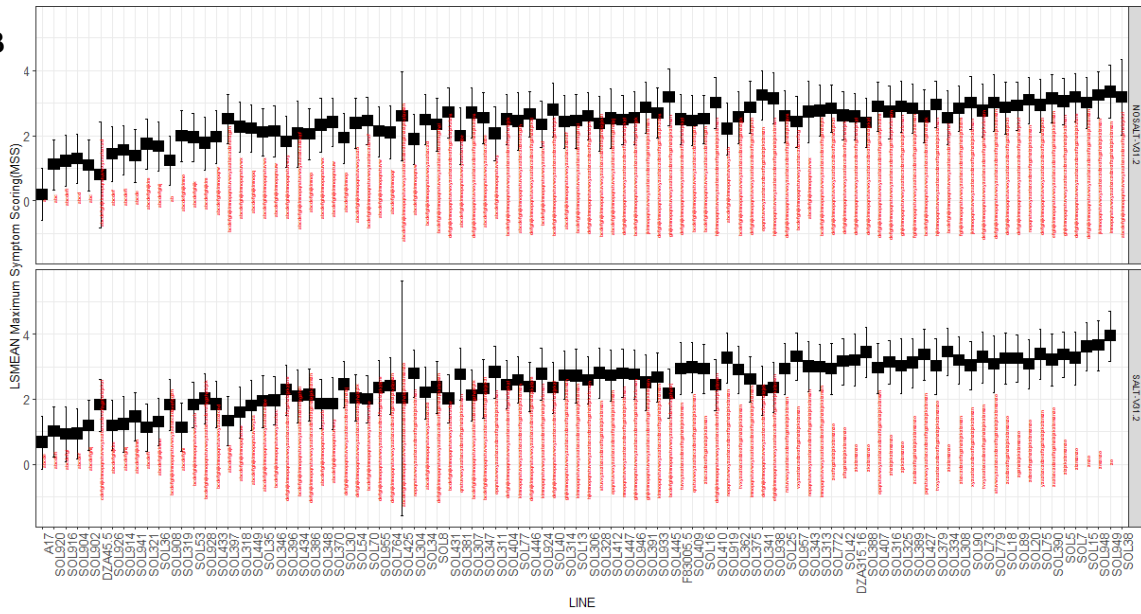


Figure Supplémentaire 1 : Test Tukey pour les comparaisons d'AUDPC (A) et MSS (B) en condition sel/non sel pour les 94 accessions

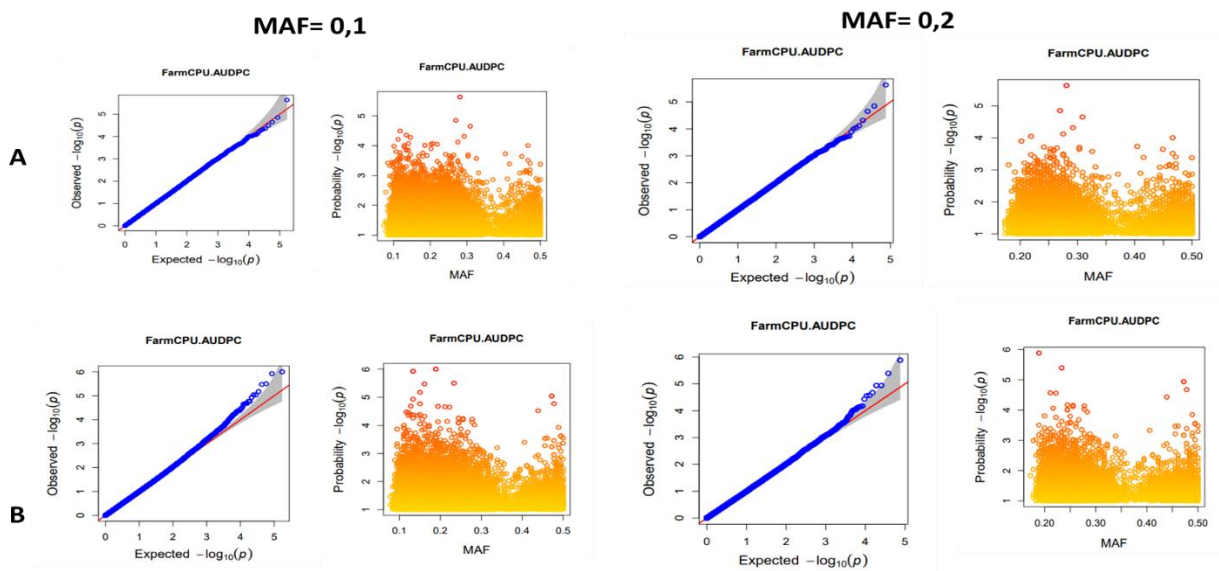


Figure Supplémentaire 2 : QQ-plot et Le Heat map des estimations de la proportion de la variance phénotypique en fonction de la fréquence de l'allèle mineur (MAF) du modèle FarmCPU pour le phénotype AUDPC avec des niveaux de fréquence de l'allèle mineur (MAF, Minor Allel Frequency) différents (0.1 et 0.2) pour les deux conditions de stress A : [+Verticillium/+Sel] et B : [+Verticillium/-Sel]

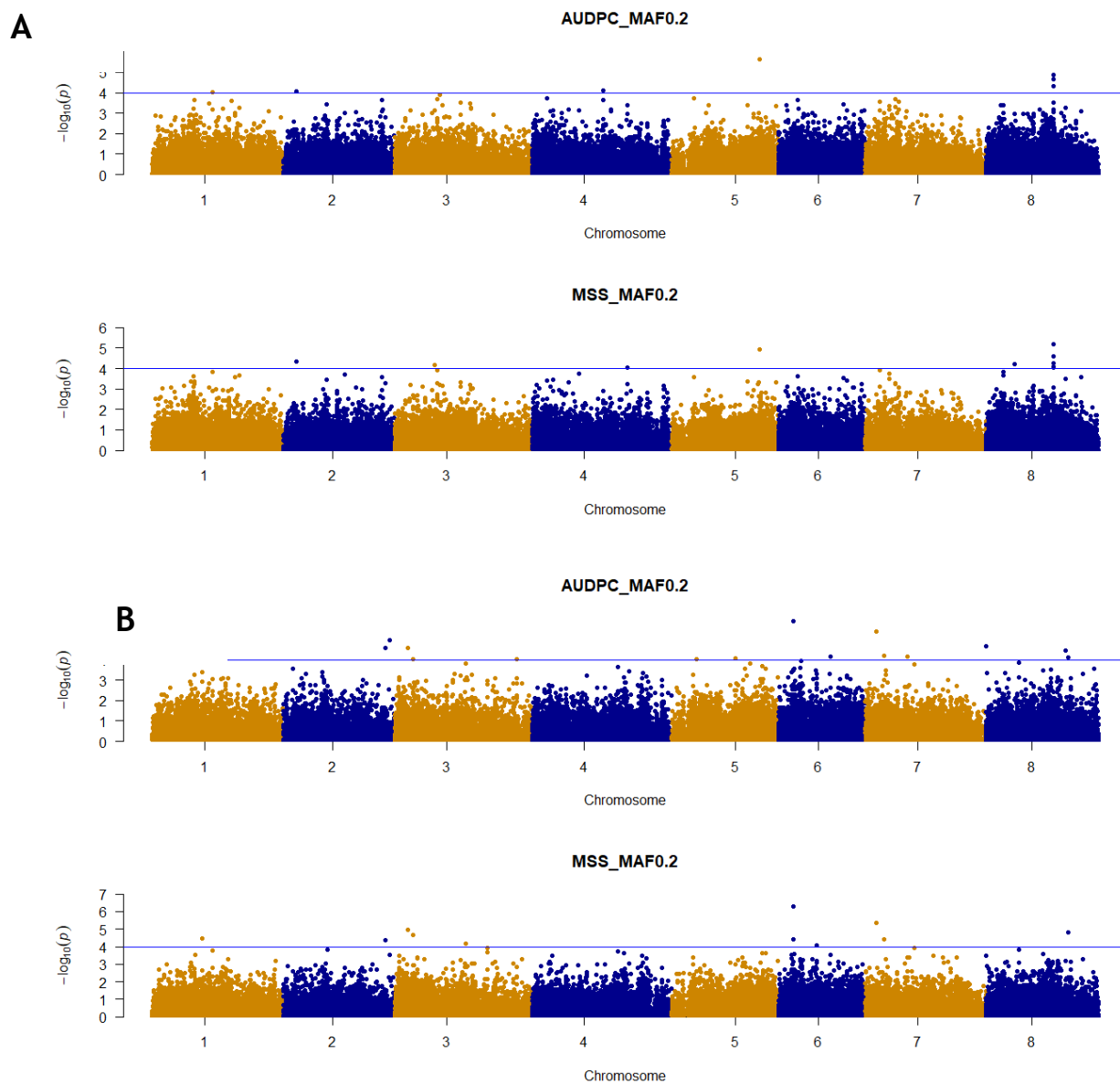


Figure Supplémentaire 3 : Manhattan plots obtenus pour les phénotypes AUDPC et MSS en stress *Va* V31.2+Sel combinés (A) et *Va* V31.2 seul (B) selon le modèle FarmCPU avec un niveau de MAF de 0.2.

