THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie, Intégrative, Diversité et Amélioration des Plantes

École doctorale GAIA-Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre et Eau

Unité de recherche UMR Plant Health Institute of Montpellier

En partenariat international avec l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal

Utilisation des espèces sauvages pour comprendre et améliorer la symbiose fixatrice d'azote chez l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.)au Sénégal

Présentée par Darius NZEPANG TCHOUTANG

Le 14 décembre 2023

Sous la direction de Dr. Sergio SVISTONOOFF
et Dr Saliou FALL

Devant le jury composé de

Mme Mame Ourèye SY, Professeure, Université Cheikh Anta Diop de Dakar (Sénégal)	Présidente du jury
M. Saliou NDIAYE, Professeur, Université de Thiès (Sénégal)	Rapporteur
Mme Alia DELLAGI, Professeure, Université de Paris-Saclay (France)	Rapporteure
Mme Meriem LAOUAR, Professeure, ENSA d'Alger (Algérie)	Rapporteure
M. Vincent VADEZ, Directeur de Recherche, IRD (France)	Examinateur
M. Sergio SVISTOONOFF, Directeur de Recherche, IRD (France)	Invité
M. Saliou FALL, Directeur de Recherche, ISRA (Sénégal)	Invité

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

En partenariat international avec l'Université de Montpellier

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTÉ DE L'ENVIRONNEMENT

FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2023 N° d'ordre : 202343

THÈSE DE DOCTORAT UNIQUE
Spécialité : Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes

Présentée par : Darius NZEPANG TCHOUTANG

Utilisation des espèces sauvages pour comprendre et améliorer la symbiose fixatrice d'azote chez l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.) au Sénégal

Soutenue le 14 décembre 2023 devant le jury composé de :

Présidente :	Mme Mame Ourèye SY	Professeure Titulaire	UCAD
Rapporteurs :	M. Saliou NDIAYE	Professeur Titulaire	U. de Thiès
	Mme Alia DELLAGI	Professeure Titulaire	U. Paris-Saclay
	Mme Meriem LAOUAR	Professeure Titulaire	ENSA d'Alger
Examinateur :	M. Vincent VADEZ	Directeur de Recherche	IRD
Directeur de thèse :	M. Saliou FALL	Directeur de Recherche	ISRA
Co-Directeur de thèse :	M. Sergio SVISTOONOFF	Directeur de Recherche	IRD

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En partenariat international avec l'Université de Cheikh Anta Diop de Dakar

École doctorale : GAIA-Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre et Eau

THÈSE DE DOCTORAT UNIQUE

Spécialité : Biologie, Intégrative, Diversité et Amélioration des Plantes

Nom et prénom : NZEPANG TCHOUTANG Darius

Titre de la thèse : Utilisation des espèces sauvages pour comprendre et améliorer la symbiose fixatrice d'azote chez l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.) au Sénégal.

Date et lieu de la soutenance : le 14 décembre 2023, UCAD, Dakar, Sénégal

Composition du Jury :

Présidente :	Mme Mame Ourèye SY	Professeure Titulaire	UCAD
Rapporteurs :	M. Saliou NDIAYE	Professeur Titulaire	U. de Thiès
	Mme Alia DELLAGI	Professeure Titulaire	U. Paris-Saclay
	Mme Meriem LAOUAR	Professeure Titulaire	ENSA d'Alger
Examinateur :	M. Vincent VADEZ	Directeur de Recherche	IRD
Directeur de thèse :	M. Sergio SVISTOONOFF	Directeur de Recherche	IRD
Co-Directeur de thèse :	M. Saliou FALL	Directeur de Recherche	ISRA

Résumé

L'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.) est la légumineuse à graines oléo-protéagineuses la plus cultivée au Sénégal. À travers l'établissement d'une symbiose fixatrice d'azote (SFA) avec les bactéries du sol appelées « *rhizobia* », elle est capable d'assurer ses besoins en azote, mais également de fournir de l'azote aux cultures céréalières associées ou subséquentes dans les agrosystèmes ruraux. L'optimisation de la SFA de l'arachide cultivée est d'un intérêt capital pour garantir la résilience de ces agrosystèmes. Cependant, la SFA n'est pas spécifiquement intégrée dans les programmes de sélection variétale de l'arachide cultivée au Sénégal, et les mécanismes génétiques impliqués dans ce processus symbiotique demeurent peu connus. L'objectif général de cette thèse est d'optimiser et de comprendre la SFA chez l'arachide cultivée au Sénégal, en utilisant une population de 83 lignées substitutions de segments chromosomiques (CSSL), issue d'un croisement interspécifique entre la variété cultivée Fleur11 et un tétraploïde synthétique AiAd (*Arachis ipaensis* × *Arachis duranensis*)$^{4\times}$. Dans cette étude, l'évaluation en conditions semi-contrôlées de l'efficacité symbiotique au sein de la population CSSL, inoculée avec la bactérie efficace *Bradyrhizobium vignae* ISRA400 native des sols du Sénégal, a permis de cartographier 04 QTL stables associés à la SFA sur les groupes de liaison (GL) A02, A03, A08, et B02. Les allèles sauvages à tous les QTL identifiés, ont entraîné une diminution considérable de l'efficacité symbiotique. En outre, les allèles sauvages aux QTL identifiés sur les GLs A02, A03 et B02, ont également été associés à une forte diminution des composantes du rendement sur des parcelles paysannes pauvres en azote. Ce qui suggère que les espèces sauvages utilisées pour cette population CSSL ne fournissent pas des allèles favorables à l'amélioration de SFA de l'arachide cultivée. Une analyse de l'effet des QTL identifiés en relation avec la diversité des souches de *Bradyrhizobium* nodulant l'arachide cultivée dans les sol sénégalais a mis en évidence des faibles efficacité symbiotiques pour l'ensemble des souches testées. Une analyse RNA-Seq nous a permis de comparer l'expression de gènes dans les nodules de Fleur11 et des CSSL 12CS_051 et 12CS_044. Pour la CSSL 12CS_051, cette analyse nous a permis d'identifier l'orthologue du gène *LjFEN1*/*Arahy.R43499*, qui pourrait être responsable des variations phénotypiques causées par le QTL sur le GL A02. Une cartographie fine du QTL a été effectuée avec la CSSL 12CS_044, mais les résultats obtenus indiquent que le QTL ne se trouve pas dans la région ciblée sur le GL B02. Nos travaux ont permis de générer de nouvelles connaissances utiles à l'intégration de la SFA dans l'amélioration variétale de l'arachide cultivée au Sénégal, et fournissent des outils pour mieux comprendre le processus symbiotique de l'arachide.

Mots clés : arachide, symbiose fixatrice d'azote, QTL, espèces sauvages, sélection variétale.

UNIVERSITY OF MONTPELLIER

In international partnership with the University of Cheikh Anta Diop of Dakar

DOCTORAL SCHOOL: GAIA-Biodiversity, Agriculture, Food, Environment, Land and Water

PhD THESIS

Speciality: Biology, Integrative, Diversity and Plant Breeding

Name and first name: NZEPANG TCHOUTANG Darius

Thesis title: Use wild species to understand and improve nitrogen-fixing symbiosis in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L;) in Senegal.

Date and place of the defense: December 14th, 2023, UCAD, Dakar, Senegal

Jury composition:

President:	Mme Mame Ourèye SY	Full Professor	UCAD
Rapporteur:	M. Saliou NDIAYE	Full Professor	U. de Thiès
	Mme Alia DELLAGI	Full Professor	U. Paris-Saclay
	Mme Meriem LAOUAR	Full Professor	ENSA d'Alger
Examiner:	M. Vincent VADEZ	Research Director	IRD
Thesis Director:	M. Sergio SVISTOONOFF	Research Director	IRD
Co-Thesis Director:	M. Saliou FALL	Research Director	ISRA

Summary

Cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) is the most cultivated oil-protein seed legume in Senegal. Through the establishment of a nitrogen-fixing symbiosis (SFA) with soil bacteria called "*rhizobia*", it can meet its nitrogen needs, but also to provide nitrogen for associated or subsequent crops such as cereals in rural farming systems. Optimization of SFA in cultivated peanut is of key interest to ensure the resilience of these rural farming systems. However, SFA is not specifically integrated into breeding programs of peanut in Senegal, and the genetic mechanisms involved in this symbiotic process are still little known. The main objective of this thesis is to optimize and understand SFA of cultivated peanut in Senegal, using a population of 83 chromosome segment substitution lines (CSSL), derived from an interspecific cross between the cultivated Fleur11 variety and a tetraploid synthetic AiAd (*Arachis ipaensis* × *Arachis duranensis*)$^{4\times}$. In this study, the evaluation in semi-controlled conditions of the symbiotic efficiency within the CSSL population, inoculated with an effective *Bradyrhizobium vignae* strain ISRA400 native to Senegalese soils, allowed us to map consistently 04 QTL associated to SFA on the linkage groups (GL) A02, A03, A08, and B02. At all QTL, the wild alleles strongly decrease symbiotic efficiency. In addition, the wild alleles at the QTL on GLs A02, A03 and B02 were also associated with a strong reduction of agronomic traits on farmer's fields with low inputs systems. These results suggests that the wild species used for the development of this CSSL population do not provide new alleles favorable for the improvement of SFA in cultivated peanut. An analysis of the QTL effects in relation to the diversity of *Bradyrhizobium* strains able to form nodules with peanut cultivated in Senegalese soil revealed low symbiotic efficiency for all the strains tested. RNA-Seq analysis allowed us to compare gene expression during nodulation process between Fleur11 and CSSL 12CS_051 and 12CS_044. For CSSL12CS_051, this analysis allowed us to identify the ortholog of nodulation gene *LjFEN1*/*Arahy.R43499* gene, which could be responsible for the phenotypic variations caused by the QTL on GL A02. Fine mapping of the QTL was carried out with CSSL 12CS_044, but the results obtained indicate that the QTL is not found in the region targeted on GL B02. Our work has generated new knowledge useful for the integration of SFA in peanut breeding programs and provides tools to better understand peanut nodulation process.

Keys words: cultivated peanut, nitrogen-fixing symbiosis, QTL, wild species, plant breeding.

DÉDICACE

Je dédie ce travail :

À la gloire et la miséricorde du Seigneur tout puissant pour toutes les grâces reçues dans ma vie ;

À ma défunte grand-mère KOMBOU Marie. Je te garde à jamais dans mon cœur. Que ton âme repose en paix ;

À mes chers parents NCHUTANG NGONGANG Emmanuel et YOWA Yvette Denise, mes frères et sœurs Thierry, Brice, Roméo, Audrey, Leticia et Armel. Des mots ne sauraient exprimer toute l'amour que je vous porte ;

À ma tendre et merveilleuse moitié KEMAYOU KOMBOU Lausaire. Ma femme, je te suis infiniment reconnaissant pour ton amour et ton soutien inconditionnels, et pour avoir su gérer et supporter mes longues absences de ces dernières années ;

À tous mes proches

ET

Tous ceux que j'aime.

REMERCIEMENTS

La conception et la réalisation de cette thèse ont été rendues possibles grâce à une collaboration institutionnelle fructueuse entre le Centre d'Étude Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse (CERAAS, Thiès, Sénégal), l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) (Unité Mixte de Recherche PHIM, Montpellier, France) et le Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM, Dakar, Sénégal), dans le cadre du projet d'Optimisation des Rotations et Associations Céréales/Légumineuses (ORACLE), financé par la fondation AVRIL. Cette thèse a été effectuée en cotutelle au sein de l'École Doctorale des Sciences de la Vie de la Santé et de l'Environnement (ED-SEV) de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD, Sénégal), et l'École Doctorale des Sciences du vivant et de l'Environnement et les Sciences et Technologies (ED-GAIA) de l'Université de Montpelier (UM, France). Le programme de bourse régional de l'Office Allemand d'Échanges Universitaires (DAAD)/CERAAS, et le programme d'Allocations de Recherche pour une Thèse au Sud (ARTS) de l'IRD m'ont octroyé une bourse d'étude et financé mes mobilités entre les deux universités.

Mes remerciement vont à l'endroit du Laboratoire Mixte International sur l'Adaptation des Plantes et microorganismes associés aux Stress Environnementaux (LMI-LAPSE, Dakar, Sénégal), du LMI-Intensification Écologique des Sols cultivés en Afrique de l'Ouest (IESOL, Dakar, Sénégal), et le Centre d'Excellence Africain en Agriculture pour la Sécurité Alimentaire et Nutritionnelle (CEA-AGRISAN), pour leurs contributions scientifiques et/ou financières.

Ma profonde gratitude s'adresse également aux **membres du jury**, pour avoir accepté d'évaluer et d'améliorer la qualité scientifique de notre travail. Je remercie **Pr Mame Ourèye SY** pour avoir accepté de présider le jury et pour tous les efforts consentis à l'organisation de ma thèse ; **Pr Saliou Ndiaye**, **Pr Alia DELLAGI**, **Pr Meriem LAOUAR** pour leur participation au jury en qualité de rapporteurs, ainsi que pour l'intérêt et le temps consacrés à la lecture de notre manuscrit ; **Dr Vincent VADEZ** pour sa disponibilité et pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes encadreurs qui m'ont fait confiance depuis mon stage de fin d'études de Master 2 à l'UCAD. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes.

Mon Directeur de thèse à l'UM, **Dr Sergio Svistoonoff**. Sa capacité à susciter le questionnement scientifique critique chez l'étudiant est ce qui m'a le plus marqué en travaillant sous sa direction. Je n'oublierai jamais votre disponibilité et votre motivation quotidienne pour m'accompagner, m'orienter et m'encourager dans l'accomplissement de ce travail de recherche. Je vous suis reconnaissant pour toutes les opportunités scientifiques et nos nombreuses réflexions au cours desquelles, j'ai énormément appris. Un immense merci Sergio !

Mon Directeur de thèse à l'UCAD, **Dr Saliou Fall** qui est également Directeur du LCM, mon laboratoire d'accueil au Sénégal. Malgré vos nombreuses occupations, vous n'avez jamais manqué l'occasion de m'accorder votre attention et d'apporter des solutions aux différentes difficultés que je rencontrais. Votre simplicité, votre humilité et votre compréhension sont exemplaires. Vos suggestions et vos conseils m'ont été d'une aide très précieuse tout au long mon apprentissage. Je garderai toujours en mémoire la phrase « Darius soit focus ! ». Je vous remercie énormément.

Mon encadrant **Dr Daniel Fonceka** au CERAAS. Je vous dois mon parcours académique au Sénégal. Tout à commencer en Master 2, lorsque vous m'avez sélectionné parmi plusieurs candidats dans le cadre du programme de bourse DAAD/CERAAS, qui s'est par la suite poursuivit en doctorat. Je ne vous remercierai jamais assez pour ces opportunités, dont je manquais cruellement sous d'autres cieux. Votre contribution dans la conception et la réalisation de ce travail de thèse est inestimable, que ce soit au niveau de la mobilisation des ressources humaines ou financières. Votre clairvoyance scientifique a été comme une boussole et une réelle source d'inspiration, pour moi et bien d'autres de mes promotionnaires. Et j'espère avoir assimilé un peu de votre passion pour la génétique et l'amélioration de plantes. Merci infiniment Daniel !

Aux membres de mon comité de suivi de thèse, **Dr Antony Champion**, **Dr Benoît Lefebvre** et **Dr Robin Duponnois**, qui ont significativement contribué à l'amélioration de notre travail, à travers leurs nombreuses suggestions et orientations.

Aux anciens Directeurs du CERAAS, **Dr Ndiaga Cisse** et **Dr Ndjido Kane** pour leurs accueils au CERAAS, leurs encouragements et leurs conseils affectueux. À travers eux, je tiens aussi à remercier le personnel scientifique et administratif du CERAAS. Je pense particulièrement à **Mme Mariama Senghor** et **M. Mawa Sene**.

Mes sincères remerciements vont à l'égard du **Dr Djamel Gully** « Coach », pour sa disponibilité, sa gentillesse et sa volonté à toujours partager son savoir. De mon initiation à la microscopie à l'analyse de transcriptome, j'ai bénéficié de son expertise, et j'ai assimilé énormément de connaissances, surtout « les petits secrets qu'on ne retrouve pas toujours dans les articles publiés ». Merci Coach !

J'adresse également mes sincères remerciements au **Dr Valérie Hocher**, pour son immense gentillesse, ses multiples encouragements et ses qualités humaines. Je vous remercie pour avoir facilité mon installation lors de mes séjours à Montpellier, et pour l'accompagnement quotidien, que ce soit au niveau scientifique ou administratif. Je souhaite aussi remercier **Dr Maïmouna Cissoko** « Adja », pour sa disponibilité et son assistance technique au laboratoire et sur le terrain dans la réalisation de nos activités. Merci Adja !

J'ai une pensée forte à l'égard mes compatriotes et aînés académiques. **Dr Joël-Romaric Nguepjop**, pour son aide dans les procédures administratives à l'UCAD et à l'Ambassade avant mon arrivée au Sénégal, mais aussi pour ses nombreux encouragements et suggestions au cours de la réalisation de ce travail. **Dr Arlette Zaïya-Zazou** « la madré », qui a énormément contribué dans la conception de ce projet de thèse.

Mes remerciements sont entiers pour tous les membres de « l'équipe arachide » du CERASS. **M. Maguette Seye** « Mouride ingénieur » et **M. Hodo-Abalo Tossim** « le Doyen » pour avoir réalisé tous les croisements nécessaires à la production du matériel végétal utilisé au cours de ce projet de thèse. **Mme Rachelle Yvette Djiboune**, qui a assuré toute la partie génotypage durant le développement des populations quasi-isogéniques. **Dr Aïssatou Sambou**, pour ses encouragements et ses conseils.

J'adresse également mes sincères remerciements aux membres de mes laboratoires d'accueil, pour avoir mis à ma disposition un cadre favorable pour la réalisation de mes travaux de thèse. À l'équipe BALI/UMR PHIM de Montpellier, je pense à **Dr Fabienne Cartieaux**, **Dr Hassen Gerbhi** et **Mme Nathalie Chabrillange**, pour la convivialité, les échanges constructifs durant les nombreuses réunions d'équipe, le soutien et l'assistance au laboratoire. Au Laboratoire

Commun de Microbiologie de Dakar, je pense à **M. Mathieu Ndingue Faye** « l'homme de Djilor Djidiack », pour m'avoir m'accompagné pendant des jours sur de terrain, malgré qu'il ne perçût pas de frais de mission. **M. Francis do Rego** et **Mme Marie-Claire Dasilva** pour la disponibilité et le soutien au quotidien. **M. Paul Tendeng** « Tonton Paul » l'indispensable, toujours disponible, compréhensif et prompt dans la recherche des solutions aux difficultés des étudiants. Merci spécial à Tonton Paul !

Ma reconnaissance va également à l'endroit du **Dr Cathy Clermont**, pour avoir facilité la conduite de nos essais de terrain en mettant à notre disposition sa base de données et son réseau d'agriculteurs du village Diohine.

Je remercie **Pr Emmanuel Youmbi** et **Pr Libert Brice Tonfack** de l'Université de Yaoundé I au Cameroun, qui m'ont permis grâce à leurs lettres de recommandations d'obtenir une bourse d'études au Sénégal, qui a ensuite abouti à cette thèse.

Je suis également reconnaissant à l'égard du **Dr Clémence Chantreuil** « la Mère Clem », qui n'a pas cessé de m'encourager et de me soutenir au quotidien. Je n'oublierai pas **Mme Nathalie Claudé** pour sa sympathie et les facilités administratives à Montpellier.

J'adresse aussi mes remerciements à **Dr Maria Carolina Barbosa** « Super Caro », **Dr Seijo Guillermo** et **Dr Fernando Ibanez**, pour l'accueil conviviale et les échanges scientifiques fructueux durant mon séjour en Argentine. Muchas gracias amigo !

À la **Famille Faye** du village Diohine, en particulier **Aïssatou Faye** « Mère Ayu, ma maman au Sénégal », un simple Merci ! ne saurait suffire pour témoigner toute ma reconnaissance, pour ta contribution dans la réalisation nos essais de terrain. De la traduction de mes échanges avec les agriculteurs au suivi régulier de nos essais, son aide est inestimable. En plus, elle cuisine le meilleur Thiéboudiène du Sénégal, il n'y a pas de débat. Je te suis infiniment reconnaissant Mère Ayu. À travers toi, j'aimerais aussi remercier les agriculteurs qui ont également contribué à la réalisation de ce projet de thèse. Je pense à **M. François Maronne** et les défunts **M. Abdoulaye Ndiaye** et **M. Ngor Faye** de regretté mémoire.

J'aimerais aussi remercier mes collègues et amis « les Thésards de ORACLE » **Diariatou Niang**, **Maryline Aza-Gnandji** et **Sophie Djiba**. Je garde de beaux souvenirs de nos discussions animées de bureau, mais aussi des anecdotes de nos missions de terrain. Merci aussi, aux « généticiens » **Dupérier Loko** et **Joseph Gomis**, **Dr Alyr Mounirou Hachim**, pour le partage du savoir et les nombreux moments de convivialité. Merci aussi, à **Elisabeth Dacosta**, qui m'a beaucoup aidé dans la mesure des caractères post-récolte. Merci aussi, à mes aînés académiques **Dr Christian Valentin Nadieline**, **Dr Mariama Ngom**, **Dr Nogaye Niang**, **Dr Aïda Ndiaye**, pour leurs encouragements et leurs conseils bien vaillants.

Aux Familles **Kamtse**, **Tiepma**, **Tchapdie, Kemta** et **Nana**. Merci pour vos nombreuses prières et vos encouragements qui m'ont accompagné durant toutes ces années d'études.

Je ne saurais oublier mes amis **Sylviane Mbogning**, **Eunice Tietchou**, **Germaine Wakem**, **Carine Weutie**, **Espoir Gaglo, Anselme Tchapdie**, **Ange N'goran Adjoua**. Merci à tous !

À mon ami, mon partenaire, mon frère, **Emmanuel Noumsi Foamouhoue**. Juste Merci bro ! De parler encore ou bien ? Quel parcours bro ! Dieu seul sait. Je te dis sortie cité U, 04 « mos » et une bouteille de foléré !

Je souhaite enfin exprimer ma profonde gratitude à toutes les personnes qui d'une manière ou d'une autre, m'ont encouragé, soutenu et accompagné à chaque étape de cette aventure intellectuelle et humaine.

LISTE DES ABREVIATIONS

AB-QTL	Advanced Backcross Analysis
ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Adénosine Désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine Diphosphate
ANOVA	Analysis of Variance
ARA	Activité Réductrice de l'Acétylène
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
CSSL	Chromosome Substitution Segment Line
DEGs	Differentially expressed genes
EDTA	Ethylene Diamine Tetra acetic Acid
FBA	Fixation Biologique d'Azote
GL	Groupe de Liaison
GO	Gene Ontology
MATAB	Mixed AlkylTrimethylAmmonium Bromide
NIL	Near Isogenic Line
NGS	Next generation Sequencing
NF	Nod Factors
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIB	Produit Intérieur Brut
QTL	Quantitative Trait Loci
RIL	Recombinant Inbred Line
SFA	Symbiose Fixatrice d'Azote
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Single Sequence Repeat
T3SS	Type III Secretion System ou système de sécrétion de type III
TSN	Tolérance Symbiotique aux Nitrates
TB	Total Biomass ou biomasse totale
TN	Teneur en azote total des fanes
SPAD	Soil Plant Analysis Development
SPIR	Spectroscopie Proche Infra Rouge
°C	Celcius
%Ndfa	Pourcentage d'azote fixé
$\delta^{15}N$	Abondance naturelle en azote isotopique
cM	centimorgan
M	millions
nm	nanomètre
µM	Micromolaire
µL	microlitre
pb	paire de base

LISTE DES ACRONYMES

ARTS	Allocations de Recherche pour une Thèse au Sud
CEA-AGRISAN	Centre d'Excellence Africain en Agriculture pour la Sécurité Alimentaire et Nutritionnelle
CERAAS	Centre d'Études Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse
CIRAD	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
DAAD	Office Allemand d'Échanges Universitaires
ED-GAIA	École Doctorale des Sciences du vivant et de l'Environnement et les Sciences et Technologies
ED-SEV	École Doctorale des Sciences de la Vie de la Santé et de l'Environnement
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
IITA	International Institute of Tropical Agriculture
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
ISRA	Institut Sénégalais de Recherches Agricoles
LCM	Laboratoire Commun de Microbiologie
LMI-IESOL	Laboratoire Mixte International Intensification Écologique des Sols cultivés en Afrique de l'Ouest
LMI-LAPSE	Laboratoire Mixte International sur l'Adaptation des Plantes et microorganismes associés aux Stress Environnementaux
ORACLE	Optimisation des Rotations et Associations Céréales/Légumineuses
PHIM	Plant Health Institute of Montpellier
UCAD	Université Cheikh Anta Diop de Dakar
UM	Université de Montpellier

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Arbre phylogénétique de la sous-famille des *Papilionoideae* 6
Figure 2. Relation entre les différentes sections du genre *Arachis.* 7
Figure 3. Description d'une plante d'arachide cultivée 9
Figure 4. Assimilation de l'azote gazeux en acides aminés (Gln, Asn). 17
Figure 5. Structure et interactions des métalloprotéines Fe et MoFe de la nitrogénase 18
Figure 6. Phylogénie des α, β, et γ protéobactéries basée sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S 22
Figure 7. Répartition phylogénétique de l'aptitude à noduler chez des angiospermes (Doyle, 2016). 24
Figure 8. Répartition taxonomique et interactions entre *rhizobia* et légumineuses. 26
Figure 9. Infection intra et intercellulaire chez les légumineuses. 29
Figure 10. Arbre phylogénétique des *rhizobia* associés à l'arachide cultivée au Sénégal, basé sur l'analyse des séquences de la région 16S-23S de l'ARNr. 32
Figure 11. Processus d'infection intercellulaire chez l'arachide (*Arachis hypogaea*). 33
Figure 12. Cinétique de la teneur en chlorophylle des feuilles au sein de la population CSSL 62
Figure 13. Comparaisons des associations génotype × teneur en chlorophylle entre Fleur11 et les CSSL dans l'environnement de 2017 64
Figure 14. Comparaisons des associations génotype × teneur en chlorophylle observées entre Fleur11 et les CSSL dans l'environnement de 2018 65
Figure 15. Comparaisons des associations génotype × biomasse totale observées entre Fleur11 et les CSSL dans l'environnement de 2017 66
Figure 16. Comparaisons des associations génotype × biomasse totale observées entre Fleur11 et les CSSL dans l'environnement de 2018 67
Figure 17. cartographie des QTL liés à la SFA chez l'arachide cultivée 73
Figure 18. Variation de la teneur en chlorophylle des feuilles entre Fleur11 et 05 CSSL à 35 jours après inoculation en conditions contrôlées 75
Figure 19. Variation de la biomasse totale entre Fleur11 et 05 CSSL 35 jours après inoculation en conditions contrôlées 76
Figure 20. Variation des traits de nodulation entre Fleur11 et 05 CSSL à 35 jours après inoculation en conditions contrôlées 78
Figure 21. Localisation du village Diohine sur la carte du Sénégal 92
Figure 22. Dispositif expérimental en alpha-lattice 94
Figure 23. Spectres bruts et quelques spectres transformés 96
Figure 24. Modèle (a) et coefficients (b) de régression sur la teneur en azote des fanes d'arachide 99
Figure 25. Plans factoriels montrant la superposition des échantillons utilisés pour la construction du modèle et les échantillons à prédire. 100
Figure 26. Relation statistique entre la teneur en azote total des fanes et l'abondance en azote ^{15}N des 296 échantillons analysés au laboratoire. 101
Figure 27. Répartition de la pluviométrie durant les campagnes agricoles de 2019, 2020 et 2021 à Diohine 102
Figure 28. Comparaisons des associations génotype ×pourcentage en azote fixé des fanes entre Fleur11 et les CSSL dans l'environnement de 2019 105

Figure 29. Comparaisons des associations génotype × teneur en azote total des fanes entre Fleur11 et les CSSL dans chaque environnement 106
Figure 30. Comparaisons des associations génotype × poids de gousses entre Fleur11 et les CSSL dans chaque environnement 107
Figure 31. Comparaisons des associations génotype × poids de fanes entre Fleur11 et les CSSL dans chaque environnement 108
Figure 32. Variation de l'activité de la nitrogénase en fonction de la souche de *Bradyrhizobium* sp. 124
Figure 33. Analyse en composantes principales 125
Figure 34. Variation de la teneur en chlorophylle des feuilles entre les CSSL et Fleur11 128
Figure 35. Variation de la biomasse totale entre les CSSL et Fleur11 129
Figure 36. Variation des traits de nodulation entre les CSSL et Fleur11 131
Figure 37. Schéma de sélection pour le développement des NIL 146
Figure 38. Variation de la teneur en chlorophylle des feuilles 148
Figure 39. Analyse de la qualité des séquences des échantillons 150
Figure 40. Dendrogramme basé sur une classification hiérarchique des gènes les plus variables. 152
Figure 41. Identification des gènes différentiellement exprimés chez tous les génotypes 153
Figure 42. Niveau de significativité ($p \leq 0.05$) de la différence d'expression des gènes (log2FoldChange $\leq$ -2 ou $\geq$ 2) entre les échantillons non inoculé et inoculé à 21 jours après inoculation 154
Figure 43. Termes GO les plus représentés parmi les DEGs identifiés durant le processus de nodulation chez Fleur11. 156
Figure 44. Heatmaps des gènes sous-exprimés (a) et surexprimés (b) chez Fleur11 et 12CS_051 157
Figure 45. Top 10 de termes GO des gènes sous-exprimés (a) et surexprimés (b) chez Fleur11, mais pas chez 12CS_051 158
Figure 46. Top 10 de termes GO des gènes sous-exprimés et surexprimés chez 12CS_051, mais pas chez Fleur11 159
Figure 47. Heatmaps des gènes sous-exprimés (a) et surexprimés (b) chez Fleur11 et 12CS_044 160
Figure 48. Top 10 de termes GO des gènes sous-exprimés (a) et surexprimés (b) chez Fleur11, mais pas chez 12CS_044 161
Figure 49. Top 10 de termes GO des gènes sous-exprimés (a) et surexprimés (b) chez 12CS_044, mais pas chez Fleur11 162
Figure 50. Heatmap des DEGs symbiotiques spécifiques sous-exprimés chez Fleur11 et 12CS_051 164
Figure 51. Heatmap des DEGs symbiotiques spécifiques surexprimés chez Fleur11 et 12CS_051 165
Figure 52. Heatmap des DEGs symbiotiques spécifiques sous-exprimés chez Fleur11 et 12CS_044 166
Figure 53. Heatmap des DEGs symbiotiques spécifiques surexprimés chez Fleur11 et 12CS_044 167
Figure 54. Profil d'expression et analyse fonctionnelle des DEGs identifiés dans le QTL sur le GL A02 de Fleur11 et 12CS_051 170
Figure 55. Profil d'expression et analyse fonctionnelle des DEGs identifiés dans le QTL sur le GL B02 de Fleur11 et 12CS_044 172

Figure 56. Variation de la teneur en chlorophylles des feuilles au sein de la population NIL 175
Figure 57. Associations génotype × phénotype des NIL ayant montré un phénotype stable dans les deux expérimentations 176

LISTES DES PLANCHES

Planche 1. Variations morphologiques de la symbiose légumineuse-*rhizobia* 21
Planche 2. Morphologie des nodules chez les légumineuses 30
Planche 3. Anatomie nodulaire des légumineuses. 31
Planche 4. Coupes longitudinales des nodules Fleur11 et de 05 CSSL 35 jours après inoculation avec *B. vignae* ISRA400 80
Planche 5. Coupes longitudinales des nodules de Fleur11 inoculées avec 03 souches de *Bradyrhizobium* sp. associées à l'arachide cultivée au Sénégal..... 132
Planche 6. Observations microscopiques confocales des cellules de nodules de 03 CSSL inoculées avec les souches de *Bradyrhizobium* sp. ISRA400 et ISRA432 133
Planche 7. Coupes longitudinales des nodules de 12CS_114 inoculée avec *Bradyrhizobium* sp. ISRA463. 134
Planche 8. Comparaison de la cinétique de nodulation et des caractéristiques cytologiques des nodules entre la variété Fleur11 et 02 CSSL inoculées avec *Bradyrhizobium vignae* ISRA400. 149
Planche 9. Variations phénotypiques de la réponse à l'inoculation au sein de la population NIL 174

LISTES DES TABLEAUX

Tableau I : Classification des sous espèces d'*A. hypogaea* (Bertioli et al., 2011 modifié) 8
Tableau II. Variabilité des caractères associés à la symbiose fixatrice d'azote chez l'arachide 45
Tableau III. QTL associés aux caractères de symbiose fixatrice d'azote chez les principales légumineuses cultivées 48
Tableau IV : Statistiques descriptives et héritabilité au sens large dans les expérimentations 2017 et 2018 pour les caractères liés à la SFA : teneur en chlorophylle et biomasse totale 62
Tableau V : Associations génotype × phénotype significatives identifiées dans tous les traitements dans l'environnement de 2017 68
Tableau VI : Associations génotype × phénotype significatives identifiées dans tous les traitements dans l'environnement de 2018 69
Tableau VII : Récapitulatif des associations génotype × phénotype significatives et des QTL identifiés pour le traitement inoculé dans les environnements de 2017 et 2018 71
Tableau VIII : Relations entre les caractères associés à la SFA 77
Tableau IX : Identification des orthologues des gènes symbiotiques situés dans les QTL 81
Tableau X : Caractéristiques de la validation croisée des modèles prédictifs 99
Tableau XI : Statistiques descriptives et héritabilité au sens large pour les caractères associés à la SFA et les composantes du rendement au sein de la population CSSL 102
Tableau XII : Corrélations entre les trais associés à la SFA et les composantes du rendement 103
Tableau XIII : Récapitulatif des associations génotype × caractère significatives et des QTL identifiés pour les caractères de SFA et les composantes du rendement 110
Tableau XIV : Relation entre les caractères liés à la symbiose fixatrice d'azote 123
Tableau XV : Tableau récapitulatif des statistiques du séquençage et de l'alignement..... 151
Tableau XVI : Identification des orthologues de gènes symbiotiques présents dans les régions ciblées sur les groupes de liaison A02 et B02 168

TABLE DES MATIERES

Résumé i
Summary ii
DÉDICACE iii
REMERCIEMENTS iv
LISTE DES ABREVIATIONS vii
LISTE DES ACRONYMES viii
LISTE DES FIGURES ix
LISTES DES PLANCHES xii
LISTES DES TABLEAUX xiii

INTRODUCTION GÉNÉRALE 2

CHAPITRE 1: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 5
I. Généralités sur l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.) 6
I.1. Systématique du genre *Arachis* 6
I.2. Description botanique et mode de reproduction 7
I.3. Histoire de la domestication : origine, diversification et diffusion 9
I.4. Importance économique, alimentaire et agroécologique 10
I.5. Principales contraintes de production de l'arachide 12
I.6. Amélioration variétale de l'arachide 13
I.6.1. Diversité génétique et méthodes de sélection 13
I.5.2. Approche AB-QTL et outils génomiques 15
II. Fixation biologique de l'azote : description et rôle 16
II.1. Processus biologique important pour le vivant 16
II.2. Nitrogénase 17
II.3. Microorganismes diazotrophes 19
III. Symbiose fixatrice d'azote 19
III.1. Symbiose légumineuse-*rhizobia* : les deux partenaires 21
III.1.1. Diversité des *rhizobia* 21
III.1.2. Diversité des *Fabaceae* et capacité à noduler 22
III.1.3. Compatibilité d'hôte 25
III.1.4. Mise en place de la symbiose légumineuse-*rhizobia* 27
III.1.4.1. Reconnaissance entre les deux partenaires 27
III.1.4.2. Infection et organogénèse nodulaire 27
III.5. Symbiose fixatrice d'azote chez l'arachide 31
III.5.1. *Rhizobia* associés à l'arachide 31
III.5.2. Processus d'infection et de formation du nodule chez l'arachide 32
III.6. Méthodes de quantification de la symbiose fixatrice d'azote 34
III.7. Impacts des stress abiotiques sur la symbiose fixatrice d'azote 36
III.7.1. Température 36
III.7.2. pH du sol 37
III.7.3. Salinité 37

III.7.4. Stress hydrique 38
III.7.5. Fertilité du sol 38
IV. Méthodes d'optimisation de la symbiose fixatrice d'azote 39
IV.1. Sélection sur le symbiote bactérien et technologie d'inoculation 39
IV.2. Amélioration variétale : sélection de variétés performantes 40
IV.2.1. Stratégies pour améliorer la performance symbiotique 40
IV.2.1.1. Sélection de la tolérance symbiotique aux nitrates 40
IV.2.1.2. Induction de l'hypernodulation 41
IV.2.1.3. Optimisation de la compatibilité légumineuse-*rhizobia* 42
IV.2.1.4. Techniques moléculaires : sélection assistée par marqueurs et SFA 43
V. Impact de la domestication et de la sélection variétale sur la symbiose fixatrice d'azote 52

CHAPITRE 2 : CARTOGRAPHIE DE QTL ASSOCIÉS AUX CARACTÈRES DE SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE CHEZ L'ARACHIDE CULTIVÉE (*Arachis hypogaea* L.) EN UTILISANT UNE POPULATION DE CROISEMENTS INTERSPECIFIQUES 54
Résumé 55
I. Introduction 55
II. Matériel et méthodes 58
II.1. Matériel végétal 58
II.2. Phénotypage de la population CSSL pour les caractères liés à la SFA 58
II.3. Analyses statistiques et cartographie de QTL 59
II.4. Analyses cytologiques des nodules 60
III. Résultats 61
III.1. Variations phénotypiques des caractères liés à la SFA au sein de la population CSSL en conditions semi-contrôlées 61
III.2. Cartographie de QTL 62
III.2.1. Significativité des associations génotype × phénotype 62
III.2.1.1. Teneur en chlorophylle 63
III.2.1.2. Biomasse totale 63
III.2.2. Cartographie de QTL 70
III.3. Validation des QTL en conditions contrôlées 74
III.3.1. Analyse détaillée de la réponse à l'inoculation avec *B. vignae* ISRA400 74
IV. Discussion 82
IV.1. Variabilité des caractères liés à la SFA et cartographie des QTL 82
IV.2. Effet QTL sur les caractères de nodulation 84
IV.3. Espèces sauvages, domestication et SFA 85
V. Conclusion 86

CHAPITRE 3 : CARTOGRAPHIE DE QTL ASSOCIÉS AUX CARACTÈRES LIÉS À LA SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE ET AUX COMPOSANTES DU RENDEMENT CHEZ L'ARACHIDE CULTIVÉE (*Arachis hypogaea* L.), À PARTIR D'UNE POPULATION DE CROISEMENTS INTERSPECIFIQUE EVALUÉE EN CHAMPS PAYSANS 88

Résumé 89
I. Introduction 90
II. Matériel et méthodes 91
II.1. Site d'étude 91
II.2. Matériel végétal 92
II.2. Mise en place de l'expérimentation 93
II.3. Phénotypage de la population CSSL 94
II.3.1. Acquisition et analyse des données spectrales 95
II.4. Analyses statistiques et cartographie de QTL 98
III. Résultats 98
III.1. Développement du modèle régression sur la teneur en azote des fanes d'arachide 98
III.2. Variations des caractères associés à la SFA et des composantes du rendement 101
III.3. Significativité des associations génotype × phénotype 103
III.3.1. Caractères associés à la SFA : pourcentage en azote fixé et teneur en azote total . 103
III.3.2. Composantes du rendement : poids de gousses et poids de fanes 104
III.4. Cartographie de QTL 109
III.4.1. Caractères associés à la SFA 109
III.4.2. Composantes du rendement 109
IV. Discussion 111
IV.1. SPIR et prédiction de la teneur en azote total des fanes 111
IV.2. Relation entre les caractères associés à la SFA et les composantes du rendement 112
IV.3. Variabilité et cartographie de QTL des caractères associés à la SFA et des composantes du rendement 113
V. Conclusion 115
CHAPITRE 4 : ÉTUDE DE LA SPÉCIFICITÉ CSSL-*Bradyrhizobium* 117
Résumé 118
I. Introduction 118
II. Matériel et méthodes 120
II.1. Matériel végétal et souches bactériennes 120
II.2. Conditions expérimentales et phénotypage 121
II.3. Analyses cytologiques 121
II.4. Analyses statistiques 122
III. Résultats 122
III.1. Analyse de la réponse à l'inoculation 122
III.1.1. Effet de la souche bactérienne sur l'efficacité symbiotique 122
III.1.2. Effet du génotype de la plante sur l'efficacité symbiotique 126
III.1.3. Analyse comparative de l'infection et de la colonisation des nodules 132
IV. Discussion 134
IV.1. Spécificité symbiotique de la variété Fleur11 134
IV.2. Spécificité symbiotique des CSSL 135
IV.3. Description de gènes candidats pouvant expliquer les phénotypes de quelques lignées 136
V. Conclusion 137

CHAPITRE 5 : ANALYSE DU TRANSCRIPTOME ET CARTOGRAPHIE FINE DE DEUX RÉGIONS D'INTROGRESSION DE SEGMENTS CHROMOSOMIQUES D'ORIGINE SAUVAGE, IMPLIQUÉES DANS LA SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE CHEZ L'ARACHIDE CULTIVÉE (*Arachis hypogaea* L.) 138
Résumé 139
I. Introduction 140
II.1. Analyse du transcriptome (RNA-Seq) 141
II.1.1. Matériel végétal et conditions expérimentales 141
II.1.2. Observations et analyses cytologiques 142
II.1.3. Extraction d'ARNs, construction des banques d'ADNc et séquençage 143
II.1.4. Analyses bio-informatiques : Prétraitement, alignement et assemblage des séquences 143
II.1.5. Identification et analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés 144
II.1.6. Analyse de l'expression des orthologues de gènes symbiotiques 144
II.2. Cartographie fine de QTL à partir des lignées quasi-isogéniques 145
II.2.1. Matériel végétal 145
II.2.2. Extraction de l'ADN et génotypage 146
II.2.3. Phénotypage, analyses statistiques et cartographie fine du QTL 147
III. Résultats 148
III.1. Analyses RNA-Seq 148
III.1.1. Variabilité de la réponse à l'inoculation entre les lignées et Fleur11 148
III.1.2. Statistiques du séquençage des ARNm et de leur alignement 150
III.1.3. Identification des gènes différentiellement exprimés (DEGs) 152
III.1.4. Analyse fonctionnelle des transcriptomes 155
III.1.4.1. Description fonctionnelle du transcriptome de Fleur11 155
III.1.4.2. Comparaisons des transcriptomes de Fleur11 et des lignées 156
III.1.4.3. Analyse de l'expression des orthologues de gènes symbiotiques 162
III.1.5. Analyse de l'expression des gènes contenus dans les régions ciblées 168
III.1.5.1. Analyse des DEGs identifiés dans le QTL localisé sur le GL A02 169
III.1.5.2. Analyse des DEGs identifiés dans le QTL localisé sur le GL B02 171
III.2. Variation de la réponse à l'inoculation des NIL et cartographie fine de QTL 172
IV. Discussion 177
IV.1. Analyse des profils transcriptomiques durant le processus de nodulation chez Fleur11 et les lignées 177
IV.2. Analyse des DEGs dans les régions ciblées 179
IV.3. Analyse de la cartographie fine de QTL 180
V. Conclusion 182

CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE 184
I. Identification des QTL associés aux caractères de SFA et contribution des allèles sauvages 185
II. Comment quantifier la SFA en conditions naturelles ? 188

III. Les fragments de chromosomes sauvages affectent la compatibilité de l'arachide cultivée avec les *rhizobia* 189
IV. Les fragments de chromosomes sauvages affectent l'expression des gènes durant le processus de nodulation chez l'arachide cultivée 190

CONCLUSION GÉNÉRALE 193
LIMITES DE L'ÉTUDE ET PERSPECTIVES 194
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 197
ANNEXES 225
Annexe 1 : Évaluation de la précision de mesure de l'abondance en azote isotopique ^{15}N et de la teneur en azote total des fanes d'arachide 225
Annexe 2 : Analyse de variance de l'effet souche sur des caractères associés à la symbiose fixatrice d'azote chez chaque génotype. 225
Annexe 3 : Analyse de similarité des effecteurs du système de sécrétion de type III chez les Bradyrhizobium associés à l'arachide cultivée au Sénégal. 228
Annexe 5 : Ségrégation mendélienne du gène *Fix* indiquant les proportions génotypiques .. 228
Annexe 6 : Résultats du test de khi deux sur les proportions phénotypiques 229
Annexe 7 : Variation de la teneur en chlorophylle et du nombre de nodules en fonction de la souche de *Bradyrhizobium* sp. 230
Annexe 8 : Diffusions scientifiques 231

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Contexte et objectifs de la thèse

La démographie en Afrique subsaharienne devrait doubler d'ici 2050, et nécessiter un accroissement considérable des rendements des cultures (Cleland & Machiyama, 2017). Cependant, la productivité agricole a augmenté beaucoup plus lentement en Afrique subsaharienne que dans d'autres régions du monde (Giller *et al.,* 2021), et les rendements de cultures ne rapportent qu'environ 20% de ce qui pourrait être obtenu (Sanchez, 2002; van Ittersum *et al.,* 2016). L'une des principales causes de ces pertes importantes de rendements est liée à la faible fertilité des sols en raison de l'érosion, du lessivage et d'une utilisation insuffisante des intrants agricoles (engrais azotés et phosphatés) (Elrys *et al.*, 2019). Par exemple, l'apport moyen en engrais inorganiques azotés dans les terres cultivées en Afrique est passée 2.16 à 16.31 kg/ha respectivement entre en 1961 et 2020, tandis qu'en Asie, on enregistre une augmentation 4.67 à 111.76 kg/ha dans la même période (Ritchie *et al.*, 2022). En Afrique subsaharienne, l'agriculture constitue le socle du système alimentaire des ménages ruraux (FAO, 2020), et un levier essentiel à l'atteinte des objectifs de développement durable 1 (zéro pauvreté) et 2 (zéro faim) (United Nations, 2015). Pourtant, la majorité de ces ménages vivent en dessous du seuil de pauvreté (Harris & Orr, 2014; Harris, 2019), et ne disposent pas de ressources financières suffisantes pour l'achat et l'application d'engrais inorganiques dans leurs exploitations agricoles. Dans ce contexte, les légumineuses à graines pourraient jouer un rôle important dans le développement d'une agriculture durable.

Les légumineuses à graines constituent juste après les céréales, la principale source de protéines pour l'alimentation humaine et animale (Dwivedi *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2022). Grâce à leur aptitude à établir une association symbiotique avec des bactéries fixatrices d'azote du sol appelées « *rhizobia* », les légumineuses ont la particularité de se développer et de produire sur des sols pauvres en azote (Udvardi & Poole, 2013). Cette association symbiotique appelée symbiose fixatrice d'azote (SFA), constitue la principale source d'azote dans la plupart des exploitations agricoles paysannes à faibles apports en intrants (Brooker *et al.*, 2015). Elle permet aux légumineuses d'améliorer la fertilité du sol, de favoriser la séquestration du carbone dans le sol, et de contribuer à la réduction des émissions de gaz à effet de serre en limitant les apports en engrais azotés dans les agrosystèmes (Stagnari *et al.*, 2017). L'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.) est la deuxième légumineuse à graines la plus productive au monde, et la première légumineuse produite au Sénégal. Elle est capable d'assurer 55 à 68% de ses besoins en azote à travers le SFA (Hardarson, 1993; Herridge *et al.*, 2008). Au Sénégal, l'arachide joue un rôle clé dans les agrosystèmes paysans, en fournissant aux cultures céréalières (mil ou

sorgho) subséquentes, une quantité importante d'azote indispensable pour leur productivité (Diagana & Kelly, 1996). En outre, les fanes d'arachide sont très utilisées dans l'alimentation du bétail. Par conséquent, l'optimisation de la SFA chez l'arachide cultivée serait d'un intérêt majeur pour le développement d'une agriculture durable au Sénégal.

Pour optimiser la SFA des légumineuses à graines, les efforts de la recherche ont été axés pendant plusieurs années sur la sélection des *rhizobia* efficaces et le développement de la technologie de l'inoculation. Tandis que, la sélection des génotypes de légumineuses à fort potentiel symbiotique a été très peu considérée. La SFA est un caractère difficile à cibler dans les programmes de sélection variétale des légumineuses, en raison de sa nature polygénique, de sa forte dépendance aux conditions environnementales, et de sa quantification laborieuse en champ (Dwivedi *et al.*, 2015). En outre, les associations plantes-microorganismes bénéfiques du sol comme d'autres caractères qui impliquent la partie souterraine de la plante, ont été très souvent négligées durant le processus de domestication et de sélection des variétés modernes (Denison, 2015; Pérez-Jaramillo *et al.*, 2016). Les pratiques agricoles modernes auraient altéré, les associations plantes-microorganismes bénéfiques du sol (Liu *et al.*, 2020; Porter & Sachs, 2020). Chez les légumineuses, l'utilisation des concentrations élevées d'engrais inorganiques azotés durant la sélection des variétés à haut rendement, aurait réduit leur capacité à tirer des bénéfiques conséquents de la SFA (Weese *et al.*, 2015). En effet, les bénéfices nets issus de la SFA sont plus élevés chez les espèces sauvages et les variétés traditionnelles par rapport aux variétés modernes (Provorov & Tikhonovich, 2003; Kiers *et al.*, 2007; Porter & Sachs, 2020). Ce qui suggère que les espèces sauvages pourraient être utilisées pour améliorer le potentiel symbiotique des variétés cultivées.

Les aspects génétiques de la SFA ont été largement étudiés en amélioration variétale chez les légumineuses à graines telles que le soja (*Glycine max*) et le haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) (Santos *et al.*, 2013; Ramaekers *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2014; Kamfwa *et al.*, 2015; Muñoz *et al.*, 2016; Diaz *et al.*, 2017; Kamfwa *et al.*, 2019). En revanche, chez l'arachide cultivée, peu d'études ont ciblé spécifiquement la SFA en amélioration variétale, et les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus symbiotique sont encore peu connus. De plus, aucune étude à notre connaissance n'a exploré la contribution des espèces sauvages à l'amélioration de la SFA de l'arachide cultivée. Les outils de génomique (marqueurs moléculaires, carte génétique, etc.) développés au début du 21ème siècle, ont permis d'exploiter la diversité génétique des espèces sauvages apparentées à l'arachide cultivée, à travers le développement de populations de croisements interspécifiques (Fávero *et al.*, 2006; Fonceka *et al.*, 2009; Mallikarjuna *et al.*, 2011; Fonceka *et al.*, 2012a; Nguepjop, 2016). Ces populations

ont été utilisées en amélioration variétale chez l'arachide cultivée, pour identifier les régions génomiques/QTL (quantitative trait loci) et sélectionner les allèles sauvages favorables associés à de nombreux caractères d'intérêt agronomique tels que le rendement et ses composantes, la tolérance à la sécheresse, la résistance aux maladies ou la qualité de l'huile des graines (Burow *et al.*, 1996; Fonceka *et al.*, 2012a; Burow *et al.*, 2014a; Khera *et al.*, 2019; Tossim *et al.*, 2020; Gimode *et al.*, 2020, 2023). L'objectif général de ce travail de thèse est d'optimiser et de comprendre la symbiose fixatrice d'azote chez l'arachide cultivée au Sénégal, en utilisant une population de croisements interspécifiques. Plus spécifiquement, cet objectif général a été décliné en 03 axes principaux (i) identifier les QTL associés aux caractères liés à la SFA et évaluer la contribution des allèles d'origine sauvage, (ii) Analyser les effets des QTL identifiés sur la spécificité symbiotique, (iii) et combiner l'analyse de transcriptome et la cartographie fine de QTL afin d'identifier des gènes candidats impliqués dans la SFA.

Présentation de la thèse

Ce manuscrit de thèse s'articule autour de 06 chapitres. Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique. Il présente l'état des connaissances sur la biologie de l'arachide cultivée, les contraintes liées à sa culture, sa relation avec les espèces sauvages apparentées, et son amélioration variétale. Il aborde également les bases moléculaires de la SFA chez les légumineuses et les méthodes d'optimisation de la SFA.

Le second chapitre qui a fait l'objet d'une publication parue dans la revue scientifique Genes MDPI, porte sur la cartographie des QTL associés aux caractères liés à la SFA chez l'arachide cultivée en conditions semi-contrôlées. Il présente également la contribution des allèles d'origine sauvage sur la performance symbiotique de l'arachide cultivée.

Le troisième chapitre présente la cartographie des QTL associés aux caractères liés à la SFA et aux composantes du rendement chez l'arachide cultivée en champ paysan au Sénégal.

Le quatrième chapitre s'intéresse aux effets des QTL identifiés sur la spécificité symbiotique avec une diversité de *rhizobia* natifs des sols du Sénégal.

Le cinquième chapitre présente la combinaison d'une analyse de transcriptomes et de la cartographie fine de deux QTL associés aux caractères de SFA, dans l'optique d'identifier des gènes candidats impliqués dans la SFA chez l'arachide cultivée.

Enfin le sixième chapitre est une discussion générale des principaux résultats obtenus au cours de cette thèse. Il conduit à une conclusion générale, les limites inhérentes à notre étude et les perspectives de recherche en termes d'étude de l'impact de l'adaptation et de la sélection variétale sur la SFA de l'arachide cultivée, et une caractérisation détaillée des mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans une incompatibilité de fixation chez l'arachide.

CHAPITRE 1: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea L.*)

I.1. Systématique du genre *Arachis*

Les *Fabaceae* ou *Leguminoseae* constituent une large famille de plantes comprenant 06 sous-familles : *Papilionoideae*, *Caesalpinioideae*, *Dialioideae*, *Duparquetioideae*, *Detarioideae*, *Cercidoideae* (Azani *et al.*, 2017). Les *Papilionoideae* constituent la sous-famille la plus économiquement importante, car elle regroupe quasiment toutes les *Fabaceae* cultivées. Elle peut être subdivisée en 04 principaux clades (Figure 1), qui auraient divergé il y a plusieurs millions d'années (Wojciechowski *et al.*, 2004; Bertioli *et al.*, 2009, 2011) :

- Les Phaseoloïdes qui regroupent des espèces telles que le haricot commun (*Phaseolus vulgaris*), le niébé (*Vigna unguiculata*), le soja (*Glycine max*) ;
- Les Galegoïdes où l'on retrouve le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens culnaris*) ;
- Les Dalbergioïdes dont l'arachide (*Arachis hypogaea*) est la principale espèce cultivée ;
- Les Genistoïdes où l'on retrouve les lupins (*Lupinus* sp.).

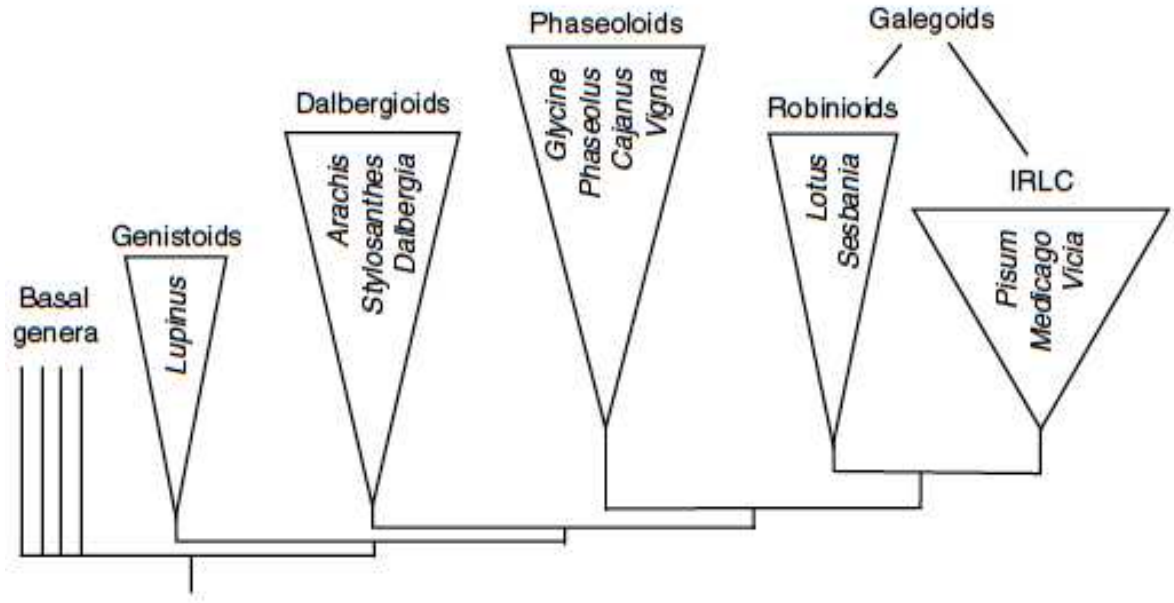


Figure 1. Arbre phylogénétique de la sous-famille des *Papilionoideae*
Les triangles indiquent les principaux clades et les deux sous-clades des Galegoïdes (Robinioïdes et IRLC : invert repeat-lacking clade). (Wojciechowski *et al.*, 2004) modifiée par Bertioli *et al.* (2009).

Le genre *Arachis* comprend ~83 espèces décrites (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005, 2017; Seijo *et al.*, 2021). Il est divisé en 9 sections taxonomiques (*Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trierectoides* et *Triseminatae*) sur la base de la compatibilité de croisement, la distribution géographique, et des caractéristiques morphologiques et cytologiques (Figure 2) (Krapovickas & Gregory, 1994). La partie souterraine de la plante incluant les fruits, les structures rhizomateuses, le système racinaire et l'hypocotyle est la plus discriminante entre les espèces (Krapovickas & Gregory, 1994). La section *Arachis* comprend 32 espèces qui peuvent être regroupées suivant le type de génome (A, B, D, F, G, K ou R), le nombre de chromosomes de base (x=9, 10) et le niveau de ploïdie (2x, 4x) (Smartt *et al.*, 1978; Stalker *et al.*, 1991; Robledo *et al.*, 2009; Robledo & Seijo, 2010; Silvestri *et al.*, 2015; Ortiz *et al.*, 2017).

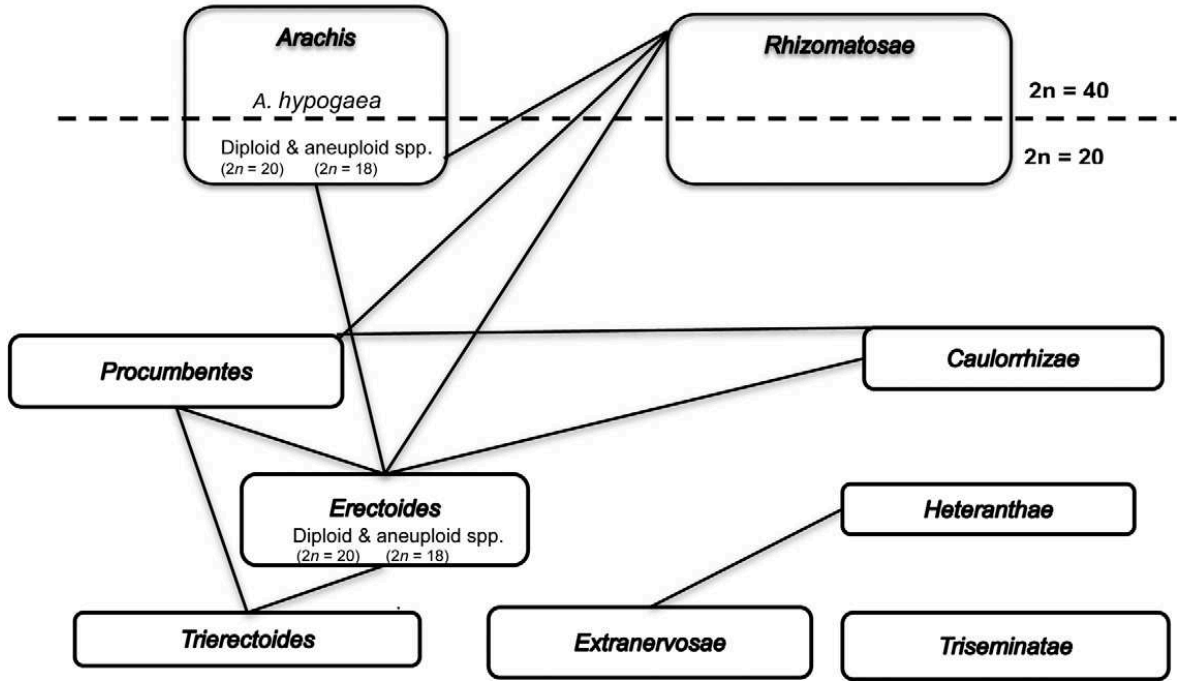


Figure 2. Relation entre les différentes sections du genre *Arachis*.
Les traits indiquent les compatibilités de croisements (Stalker, 2017)

I.2. Description botanique et mode de reproduction

L'arachide cultivée (*A. hypogaea*) est l'espèce la plus économiquement importante du genre *Arachis*. Elle est une herbacée annuelle allotétraploïde (2n=4x=40, AABB), dont le génome est de 2,54 à 2,7 millions (M) de paires de bases (Bertioli *et al.*, 2016, 2019; Zhuang *et al.*, 2019).

Selon le port de la plante et le mode d'arrangement des fleurs sur la tige principale, l'arachide cultivée regroupe deux sous espèces : ssp. *hypogaea* et ssp. *fastigiata*, comprenant chacune des variétés botaniques et des types commerciaux (Tableau 1).

Tableau I : Classification des sous espèces d'*A. hypogaea* (Bertioli *et al.*, 2011 modifié)

Sous-espèce	Variété botanique	Type commercial
hypogaea	*hypogaea*	Virginia Runner
	hirsuta	Peruvian Runner
fastigiata	*fastigiata*	Valencia
	vulgaris	Spanish
	peruviana	
	aequatoriana	

L'arachide cultivée est une plante essentiellement autogame à fleurs cléistogames, dont le taux d'allogamie varie de 1 à 10 % selon les zones et les périodes d'activités des insectes pollinisateurs (Nigam *et al.*, 1983; Nigam, 2014). Les caractéristiques d'une plante d'arachide sont présentées ci-dessous (Figure 3). La tige est érigée ou rampante et mesure entre 12 et 65 cm de long. Les feuilles sont tétrafoliolées et munies de stipules engainantes à leur base. La floraison débute 17 à 35 jours après le semis, suivant le cultivar et les conditions environnementales (Janila *et al.*, 2013). Une humidité relative du sol de 40% et des températures comprises entre 22 et 33°C sont généralement favorables à la floraison (Nigam, 2014). Les fleurs sont sessiles, de couleur jaune ou orangée, et naissent isolées ou en petits groupes à l'aisselle des feuilles sur des branches primaires et secondaires. Elles se composent d'un calice à 5 sépales soudés, d'un hypanthe et de 10 anthères dont 8 sont généralement fertiles. Le pistil comprend un seul ovaire contenant 2 à 5 ovules et un style très long terminé par un stigmate renflé surplombant les anthères (Clavel & Gautreau, 1997). Le stigmate est réceptif au pollen 12 heures après la déhiscence des anthères, qui survient à l'aube 2 à 3 heures avant l'ouverture des fleurs (Janila *et al.*, 2013). La fécondation s'effectue environ 6 heures après la pollinisation et la base de l'ovaire va s'allonger pour donner naissance au gynophore qui contient à son extrémité l'ovule fécondé. Le gynophore va ensuite s'enterrer verticalement par géotropisme positif pour la formation des fruits. La fructification souterraine (3 à 5 cm) aboutît en la formation de gousses contenant 1 à 5 graines ovoïdes dicotylédonées.



Figure 3. Description d'une plante d'arachide cultivée

1 : feuille composée de 4 folioles ; 2 : fleur ; 3 : hypanthe ; 4 : gynophore ; 5 : gousse ; 6 : bec de la gousse ; 7 : constriction ; 8 : tégument de la graine ; 9 : graine sans tégument ; 10 : Cotylédon portant l'hypocotyle, l'épicotyle et la radicule (Fonceka, 2010).

I.3. Histoire de la domestication : origine, diversification et diffusion

Les 83 espèces du genre *Arachis* sont natives d'Amérique du Sud, et auraient divergé il y a 2,33 à 4,99 M d'années (Moretzsohn *et al.*, 2013; Bertioli *et al.*, 2016; Zhuang *et al.*, 2019). L'arachide cultivée est originaire du Sud de la Bolivie et du Nord de l'Argentine (Kochert *et al.*, 1996). L'analyse des données génomiques indiquent que, l'arachide cultivée serait apparue il y a ~9400 ans, à la suite d'une hybridation interspécifique et d'une duplication de chromosomes entre les espèces sauvages diploïdes (2n=2x=20) apparentées : *A. duranensis* (parent femelle, génome A) et *A. ipaensis* (parent mâle, génome B) (Bertioli *et al.*, 2016). Par ailleurs, des vestiges de coques de gousses d'arachide retrouvés sur des sites archéologiques de l'actuel Pérou datant ~3900 à 3750 ans, témoignent de l'ancienneté de sa culture (Hammons, 1994). La polyploïdisation a d'abord donné naissance à *Arachis monticola*, que l'on ne retrouve

que dans deux petites zones du nord-est de l'Argentine (Leal-Bertioli *et al.*, 2017). Le processus de domestication a ensuite conduit à la transformation d'*A. monticola* en *A. hypogaea*, qui se différentie clairement de son ancêtre (Krapovickas & Gregory, 2007). Ferguson *et al.* (2005) ont analysé la distribution biogéographique de 3451 échantillonnages d'espèces sauvages d'arachide. Ils ont montré qu'une population *A. duranensis*, qui serait le probable donneur du génome A, est distribuée à proximité de la seule population d'*A. ipaensis* connue à ce jour (donneur du génome B) et d'une population d'*A. monticola*. Les aires de répartition de ces populations se situent dans les contreforts orientaux des Andes et les régions proches du Chaco en Argentine, en Bolivie et au Paraguay (Ferguson *et al.*, 2005). Au moins 71% des espèces étudiées ont présenté une préférence pour les zones à proximité de cours d'eau ou de lagunes, bien que la raison ne soit pas clairement élucider (Ferguson *et al.*, 2005).

L'arachide cultivée se diversifia sur l'ensemble du continent sud-américain au travers de ses six centres de diversification secondaires et tertiaires : la région des Guaranis au sud-est du Brésil et en Uruguay ; le Goiás et le Minas Gerais au Brésil ; le Rondônia et le nord-ouest du Mato Grosso au Brésil ; le piémont est-est andin en Bolivie ; le Pérou ; et le nord-est du Brésil (Gregory & Gregory, 1976). Sa diffusion à travers le monde remonte au XVI^{e} siècle (Clavel & Gautreau, 1997). Les Portugais l'auraient introduite à partir du Brésil, en Afrique, en Inde et en Extrême-Orient. Les Espagnols ont assuré sa dispersion à partir de la côte Ouest de l'Amérique du Sud, dans le Pacifique Ouest, en Indonésie et en Chine.

I.4. Importance économique, alimentaire et agroécologique

L'arachide est une culture à graines oléagineuses, fourragère et vivrière économiquement importante et largement cultivée dans les régions tropicales et subtropicales. Elle est cultivée dans plus de 100 pays du monde, couvrant une superficie de plus de 32 M d'hectares (ha), avec une production mondiale d'environ 54 M de tonnes (t) en 2021 (FAOSTAT, 2023). L'Asie (63,7%) et l'Afrique (27,8%) fournissent ~91,6% de la production mondiale, où la Chine, l'Inde et le Nigéria sont les principaux pays producteurs (FAOSTAT, 2023). Environ 60 % de la production mondiale est destinée à la transformation industrielle (principalement pour la production d'huile), et 40% à l'alimentation humaine (Birthal *et al.*, 2010). Au Sénégal, l'arachide est la culture de rente la plus importante et sa production est surtout destinée à la transformation locale et la commercialisation (Beye *et al.*, 2022). En 2021, la production sénégalaise d'arachide était de 1 677 803,71 t sur une superficie de 1 214 316 ha (FAOSTAT, 2023). L'arachide est une source de revenus monétaires en milieu rural et contribue pour plus de 30% aux dépenses liées à l'alimentation (Clavel *et al.*, 2013). Sa culture y est essentiellement

assurée par une multitude de petits producteurs constituant 75% des agriculteurs du pays et contribuant encore pour 20% du produit intérieur brut (PIB) (Clavel *et al.*, 2013). Ce qui représente une baisse considérable par rapport aux 80% du PIB enregistrés durant la période de l'indépendance (Noba *et al.*, 2014).

Les graines d'arachide contiennent 30 à 60% d'huile, 22 à 30 % de protéines, 10 à 20 % d'hydrates de carbone, des vitamines (E, K et B), des minéraux (Phosphore, Calcium, Magnésium, Fer et Zinc) et des fibres (Dutta *et al.*, 2011; Variath & Janila, 2017). Elles contiennent plus de protéines que la viande, 2,5 fois plus que les œufs et largement plus que la plupart des plantes cultivées (Janila *et al.*, 2016). Les graines peuvent être consommées comme aliment sous différentes formes : crues ; bouillies ; rôties ou transformées (confiseries ou farine). Elles peuvent être utilisées pour la fabrication d'aliments riches en nutriments pour lutter contre la malnutrition des populations vulnérables (les enfants mal nourris de moins de 2 ans et les femmes enceintes) dans les pays en développement (Anim-Somuah *et al.*, 2013).

La filière arachide joue également un rôle important dans l'alimentation animale. Le tourteau issu de l'extraction de l'huile est un aliment riche en protéines pour les animaux (Dutta *et al.*, 2011). Les fanes séchées d'arachide contiennent des protéines (8-15%), des lipides (1-3%), des minéraux (9-17%) et des glucides (38-45%) à des teneurs supérieures à celles des fourrages céréaliers (Janila *et al.*, 2013). Au Sénégal, les fanes d'arachide sont utilisées pour nourrir le bétail pendant la saison sèche et sont une source de revenus plus importante pour le producteur, que les graines. En plus de l'arachide cultivée, certaines populations indigènes en Amérique du Sud consomment les graines d'autres espèces d'*Arachis*. Les espèces du genre *Arachis* telles que *Arachis glabrata* et *Arachis pintoi* sont également utilisées comme fourrages dans les régions tropicales et subtropicales (Bechara *et al.*, 2010).

Sur le plan agroécologique, les fanes d'arachide peuvent être utilisées comme engrais verts. En Afrique de l'Ouest, l'arachide est une culture appréciée pour sa capacité d'adaptations aux conditions environnementales subsahariennes et aux conditions de cultures en rotation ou en association avec les céréales. Comme d'autres légumineuses, l'arachide améliore la fertilité et la structure du sol, favorise la croissance des cultures céréalières associées ou subséquentes et augmente la productivité globale et les bénéfices économiques du système de culture (Dwivedi *et al.*, 2005; Peoples *et al.*, 2009a). Dans le bassin arachidier du Sénégal, la rotation de culture du mil-arachide permet aux petits producteurs de produire du mil quasiment sans apport d'engrais sur des sols pauvres en nutriments (Diagana & Kelly, 1996).

I.5. Principales contraintes de production de l'arachide

La productivité de l'arachide varie significativement d'une région à l'autre, l'Afrique présentant le rendement moyen le plus faible à l'hectare ~0.9 t/ha (FAOSTAT, 2023). Dans la filière arachide on distingue deux systèmes de production. Le système de production sans ou avec un faible apport en intrants agricoles pratiqué par des petits producteurs en Afrique et en Asie. Les producteurs cultivent des variétés précoces sur des sols pauvres en nutriments, sans irrigation, sans apports d'engrais et avec des faibles rendements moyens. Le second système de production qui s'effectue avec un fort apport en intrants agricoles, est surtout pratiqué dans les pays plus développés tels que la Chine, les Etats-Unis d'Amériques, l'Argentine et le Brésil, et où les rendements moyens varient entre 2 et 4 t/ha (Variath & Janila, 2017). La culture de l'arachide est surtout assurée par des grandes firmes industrielles utilisant des variétés améliorées, l'irrigation, des pratiques améliorées de gestion des cultures, l'apport d'engrais et la mécanisation agricole.

Dans de nombreux pays africains les rendements d'arachide demeurent faibles en raison de nombreuses contraintes de production incluant le manque de systèmes efficaces de distribution de semences de bonne qualité, les stress abiotiques et biotiques, la faible utilisation d'intrants agricoles et de moyens technologiques, l'accessibilité au marché et des facteurs socio-économiques (Variath & Janila, 2017). La faible fertilité des sols, la sécheresse, les insectes ravageurs et les maladies sont les principaux stress environnementaux qui entravent la production d'arachide (Fonceka, 2010). Au Sénégal, la plupart des terres cultivées en arachide se trouvent dans le bassin arachidier, où le déficit hydrique est un facteur limitant majeur. L'absence de semences et la sécheresse ont conduit à l'effondrement de la filière arachide, et causé la fermeture de nombreuses usines durant les dernières décennies (Clavel *et al.*, 2013). Les sols du bassin arachidier sont généralement très pauvres en nutriments (N, P, etc.) et contiennent environ 0,3 à 1 % de matière organique (McClintock & Diop, 2005a). Les producteurs ne disposent pas de ressources financières pour l'achat et l'application de fertilisants dans leurs parcelles agricoles, ce qui conduit à une baisse du rendement, de la qualité des graines et des fanes.

La culture de l'arachide est également confrontée aux attaques de plusieurs pathogènes incluant des champignons, des bactéries, des nématodes et des virus. Les maladies fongiques sont généralement les plus répandues et les plus destructrices au monde. Les cercosporioses foliaires précoces ou tardives causées par *Cercospora arachidicola* et *Phaeoisariopis personata*, et la rouille causée par *Puccina arachidis* sont des maladies foliaires à l'origine des fortes pertes de rendements (Janila *et al.*, 2013). Elles entraînent une défoliation sévère et une diminution des

rendements de ~40 à 70 % (Subrahmanyam *et al.*, 1985; Giordano *et al.*, 2021). Plusieurs virus infectent naturellement l'arachide dans différentes régions du monde, et causent de nombreuses maladies dont quelques-unes sont économiquement importantes. La rosette est une maladie virale répandue en Afrique, et causée par la synergie d'action de deux virus (le Groundnut Rosette Virus et le Groundnut Rosette Assistor Virus) et d'un ARN satellite (Reddy, 1991). Entre 1995 et 1996, une épidémie de la maladie de la rosette a réduit la production d'arachide de 23% au Malawi, dévastée ~40 000 ha d'arachide en Zambie et causé une perte estimée à 4,89 M de dollars (Waliyar *et al.*, 2007; Nigam *et al.*, 2012). Concernant les maladies bactériennes, le flétrissement causé par *Ralstonia solanacearum* prédomine sur les autres. Les nématodes sont responsables ~12% des pertes de rendements en arachide au monde (Minton & Baujard, 1990; Janila *et al.*, 2013).

En Afrique et en Asie, la contamination des graines d'arachide par les champignons *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* est un autre frein important au développement de la filière arachide (Variath & Janila, 2017). Ces champignons du sol infectent les graines au champ, pendant le séchage ou le stockage, et détériorent la qualité des graines en produisant une mycotoxine cancérigène appelée aflatoxine. La présence de cette toxine affecte considérablement la valeur marchande des graines au niveau du commerce international. La conséquence est la baisse de l'attractivité de la filière arachide par les producteurs. Au Sénégal par exemple, l'exportation des produits arachidiers vers l'Europe est devenue complexe depuis le renforcement des normes sanitaires pour l'exportation (Clavel *et al.*, 2013). Par ailleurs, ces produits contaminés se retrouvent sur le marché local et constituent un risque de santé publique majeur pour les populations (Clavel *et al.*, 2013).

I.6. Amélioration variétale de l'arachide

I.6.1. Diversité génétique et méthodes de sélection

Une faible diversité génétique a été mise évidence chez l'arachide cultivée (Kochert *et al.*, 1996; Seijo *et al.*, 2007; Moretzsohn *et al.*, 2013). Elle serait due à son origine monophylétique combiné à la différence de ploïdie entre espèces cultivée et sauvages, et aux pressions de sélection survenues durant le processus de domestication. Cette faible diversité génétique, contraste avec sa large diversité concernant les caractères agro-morphologiques (Krapovickas & Gregory, 1994, 2007). Cette diversité agro-morphologique a été exploitée par les méthodes de sélection conventionnelles des plantes autogames pour l'amélioration de l'arachide. Elles regroupent la sélection massale, la sélection généalogique et la sélection par filiation unipare,

la sélection par rétrocroisement et la sélection récurrente (Clavel & Gautreau, 1997; Janila *et al.*, 2013). Au Sénégal, ces méthodes ont été employée pendant de nombreuses années par l'ISRA (Institut Sénégalais de Recherches Agricoles) et le CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) pour la sélection de plusieurs variétés qui sont encore actuellement cultivées (Clavel & N'Doye, 1997; Clavel *et al.*, 2005, 2007).

La sélection généalogique est la méthode la plus employée. Elle consiste au suivi des meilleures descendances d'un hybride F_1 de génération en génération. Cette méthode peu coûteuse permet aux sélectionneurs de cibler des caractères avec une forte héritabilité tels que la taille des gousses et des graines, la couleur des graines, le rendement en graines (Janila *et al.*, 2013). La sélection récurrente est efficace pour la sélection des caractères polygéniques. Cependant, elle est peu utilisée chez l'arachide à cause des difficultés liées au grand nombre de croisements manuels nécessaires et à l'absence de stérilité génique mâle (Clavel & Gautreau, 1997).

La sélection par rétrocroisement ou *Backcross* (BC) consiste à croiser un hybride avec l'un de ses parents. Cette méthode est adaptée au transfert des caractères polygéniques comme la résistance aux maladies ou le port de la plante à travers des croisements intra ou interspécifiques (Fonceka, 2010). En Afrique de l'Ouest, elle a été employée avec succès pour raccourcir le cycle de développement des variétés et transférer la résistance au virus de la rosette (Clavel & Gautreau, 1997). Durant les dernières décennies, la sélection par rétrocroisement a été de plus en plus utilisée, afin de transférer chez l'espèce cultivée des gènes intéressants provenant des espèces sauvages diploïdes (Stalker, 2017). Deux techniques ont été développées :

- La première technique consiste à croiser l'arachide cultivée tétraploïde avec une espèce sauvage diploïde afin d'obtenir des hybrides triploïdes (3x=30) stériles. Les triploïdes sont ensuite traités à la colchicine pour augmenter le stock chromosomique au niveau hexaploïde (6x=60) et restaurer la fertilité. Les rétrocroisements successifs des hexaploïdes avec l'arachide cultivée (parent récurrent), aboutissent à des descendants pentaploïdes, aneuploïdes et tétraploïdes fertiles (Fonceka, 2010). L'autofécondation des hexaploïdes peut occasionner une perte de chromosomes et stabiliser le niveau de ploïdie à 4x. Company *et al.* (1982) ont obtenu des individus tétraploïdes stables et fertiles après 12 générations d'autofécondation des hexaploïdes issus du croisement entre *A. hypogaea* et *A. cardenasii*. Bien que ce soit rare, les triploïdes peuvent produire quelques graines par fusion des gamètes non réduits (Singsit & Ozias-Akins, 1992).
- La seconde technique consiste à synthétiser un amphidiploïde en doublant la ploïdie du parent sauvage diploïde, avant de réaliser le croisement avec l'arachide cultivée. La stabilisation

de la ségrégation des individus F_1 issus de ce croisement s'effectue par rétrocroisements successifs avec l'espèce cultivée. Cette technique a l'avantage d'être plus rapide, de permettre d'éviter plusieurs générations d'hybrides très souvent stériles et de garantir l'obtention de descendants compatibles avec l'espèce cultivée (Stalker, 2017). Des amphidiploïdes synthétiques qui combinent les génomes A, B ou K ont été utilisés avec succès pour introduire des fragments de chromosomes sauvages dans le fond génétique cultivé (Burow *et al.*, 2001, 2014b; Fonceka *et al.*, 2009; Mallikarjuna *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2012; Khera *et al.*, 2019).

I.5.2. Approche AB-QTL et outils génomiques

Les outils de génomique (marqueurs moléculaires, carte génétique, etc.) combinés aux méthodes de sélection conventionnelles ont révolutionné l'amélioration variétale des plantes, en permettant d'associer un caractère quantitatif donné à une région génomique appelée QTL (Loci de caractères quantitatifs). Tanksley & Nelson (1996) ont développé la stratégie Advanced Backcross Analysis (AB-QTL Analysis), qui consiste à l'identification et au transfert simultanés d'allèles favorables aux QTL apportés par les espèces sauvages dans un fonds génétique cultivé. Elle repose sur le phénotypage et le marquage moléculaire des individus de populations en générations avancées de backcross (BC_2, BC_3) (Fonceka, 2010).

Selon de nombreux auteurs, on distingue 02 types de populations :

- Le premier comprend des individus (lignées d'introgressions) dans lesquels on retrouve plusieurs fragments chromosomiques du parent sauvage. Ces fragments peuvent être à l'état homozygote ou hétérozygote. Ce type de population peut être dénommé Backcross Inbred Lines (BIL) ou Backcross Recombinant Inbred Lines (BCIL) (Monforte & Tanksley, 2000) ou pré-IL (Introgression Lines) (Grandillo *et al.*, 2007) ;
- Le second est constitué de lignées dans lesquelles on ne retrouve qu'un seul fragment de chromosome du parent donneur. Ces fragments sont généralement fixés à l'état homozygote. Selon les auteurs ce type de population peut être dénommé Nearly Isogenic Lines (NIL) (Tanksley & Nelson, 1996; Monforte & Tanksley, 2000) ou Introgression Lines (IL) (Grandillo *et al.*, 2007) ou Chromosome Segment Substitution Lines (CSSL) (Wan *et al.*, 2004). Toutefois, ces populations diffèrent par la taille du fragment de chromosome sauvage introgressé, qui généralement est plus réduite chez les NIL (Fonceka, 2010).

L'approche AB-QTL a été employée chez de nombreuses espèces végétales comme le riz, le blé, la tomate, l'orge et le coton pour l'amélioration de plusieurs caractères d'intérêt agronomique ou/et économique (Bhanu *et al.*, 2017). L'absence de ressources génomiques a été pendant longtemps un frein important à l'amélioration de l'arachide cultivée. Plusieurs

marqueurs moléculaires tels que le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RADP), le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP), les microsatellites ou répétition de séquences simples (SSR) et le polymorphisme nucléotidique (SNP), ont été développés et utilisés pour l'analyse de la diversité génétique, la construction de cartes génétiques et la sélection assistée par marqueurs (Pandey *et al.*, 2012; Janila *et al.*, 2013, 2016; Varshney, 2016). Récemment, les génomes de l'arachide cultivée et de ses ancêtres sauvages diploïdes les plus probables (*A. duranensis* et *A. ipaensis*) ont été séquencés (Bertioli *et al.*, 2016, 2019; Zhuang *et al.*, 2019). Burow *et al.* (2001) ont développé la première carte génétique tétraploïde à partir d'une population de 78 BC_1F_1 issus du croisement entre la variété Florunner et l'amphidiploïde synthétique TxAG-6 [*A. batizokoi* × (*A. cardenasii* × *A. diogoi*)]$^{4\times}$. Fonceka *et al.* (2009) et Fávero *et al.* (2006) ont développé une population de lignées d'introgressions à partir du croisement la variété Fleur11 et l'amphidiploïde synthétique AiAd [(*A. ipaensis* × *A. duranensis*)$^{4\times}$]. Ces travaux ont permis de publier la première carte génétique tétraploïde impliquant les ancêtres diploïdes de l'arachide cultivée. Au Sénégal, les populations AB-QTL sont à la base d'un programme d'élargissement de la base génétique de l'arachide cultivée. Des populations CSSL et BCIL ont été développées en croisant la variété cultivée Fleur11 avec les amphidiploïdes synthétiques : ISATGR278-18 (*A. duranensis* × *A. batizokoi*)$^{4\times}$ (Nguepjop *et al.*, 2016), AiAd (*A. ipaensis* × *A. duranensis*)$^{4\times}$ (Fonceka *et al.*, 2012a; b). L'amélioration de l'arachide cultivée à travers l'exploitation de la diversité des espèces sauvages a été mise en évidence pour de nombreux caractères d'intérêts tels que la résistance aux maladies (Burow *et al.*, 1996, 2014b), la tolérance à la sécheresse (Fonceka *et al.*, 2012a), la qualité de l'huile (Khera *et al.*, 2019), le rendement et ses composantes (Fonceka *et al.*, 2012a; Tossim *et al.*, 2020; Gimode *et al.*, 2023), et des caractères morphologiques (Fonceka *et al.*, 2012b).

II. Fixation biologique de l'azote : description et rôle

II.1. Processus biologique important pour le vivant

Sans azote il n'y aurait pas de vie possible. L'azote constitue avec le carbone, l'un des principaux macroéléments de la matière vivante. Il est essentiel à la synthèse des molécules telles que les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques, qui sont fondamentales aux organismes vivants. Cependant, une quantité importante de l'azote du globe terrestre (environ79% l'atmosphère) se trouve sous forme gazeuse (N_2) et n'est pas accessible à l'ensemble du vivant, exceptés certains procaryotes appelés bactéries diazotrophes (« qui se

nourrissent d'azote »). Ces bactéries sont capables de réduire l'azote atmosphérique non assimilable en azote combiné (NH_3/NH_4^+) assimilable par les végétaux (Udvardi & Poole, 2013). L'azote réduit est incorporé par la plante sous forme d'acides aminés, à travers une chaîne métabolique régulée par des enzymes tels que la glutamine synthétase (GS), la glutamate synthétase (GOGAT) et l'aspartate aminotransférase (AAT) (Figure 4). La réduction de l'azote gazeux en NH_4^+ par les bactéries diazotrophes est encore appelée fixation biologique de l'azote (FBA). Il s'agit d'une réaction réductrice très couteuse en énergie (sous forme ATP : Adénosine triphosphate), et catalysée par une enzyme appelée la nitrogénase.

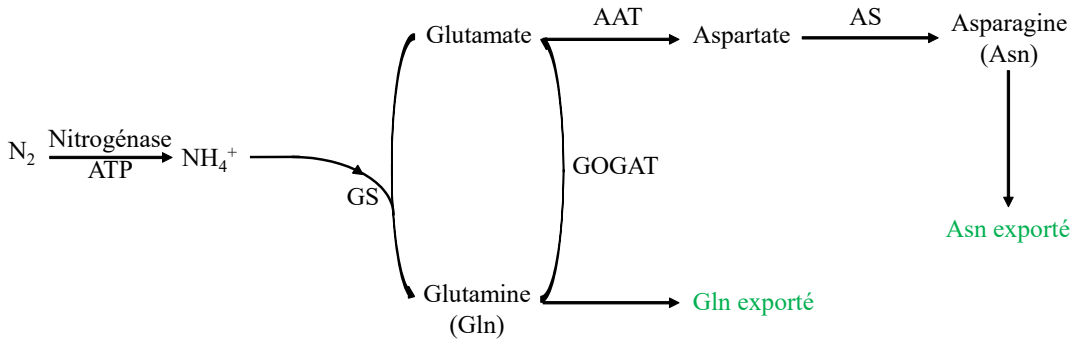


Figure 4. Assimilation de l'azote gazeux en acides aminés (Gln, Asn).
GS : glutamine synthétase ; GOGAT : glutamate synthétase, ATT : aspartate aminotransférase, AS : Asparagine synthétase.

Chaque année la fixation biologique d'azote injecte environ50 à 70 M de tonnes d'azote dans les systèmes agricoles (Herridge *et al.*, 2008, 2022). Environ 50% de la production agricole mondiale nécessite l'usage des engrais azotés de synthèse (environ123 M de tonnes NH_3 via le processus Haber-Bosch) pour augmenter les rendements (Erisman *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 2017; Ritchie *et al.*, 2022). La FBA constitue un levier à considérer afin de réduire la dépendance de la production aux engrais de synthèse azotés, qui sont coûteux (environ0.8 à 1,2 $/kg de NH_3) et responsables de la pollution de la nappe phréatique et environ1.44% des émissions totales de CO_2 de la planète (Morgan *et al.*, 2017; Adams *et al.*, 2018; Soloveichik, 2019).

II.2. Nitrogénase

La nitrogénase est une métalloenzyme composée de deux protéines associées : une protéine-Fe (ou dinitrogénase réductase) et une protéine fer-molybdène (MoFe) (ou dinitrogénase) (Figure 5). La protéine-Fe est un homodimère δ_2 d'environ64 kDa, constitué de deux sous-unités ayant

chacune un site de liaison nucléotidique MgATP/MgADP et qui sont reliées par un seul métallocluster central [4Fe-4S]. La protéine MoFe est un hétérotétramère $\alpha_2\beta_2$ d'environ250 kDa, qui comprend un métallocluster [8Fe-7S] (appelé cluster P) et un cofacteur (FeMo-co) polypeptidique fer-molybdène-souffre [7Fe-Mo-9S-homocitrate-X] dans chacune des unités α et β (Seefeldt *et al.*, 2009). La nitrogénase molybdène dépendante est la plus répandue et la plus étudiée. Toutefois, il existe des nitrogénases où le molybdène du cofacteur de la dinitrogénase est remplacé par un atome de vanadium ou de fer (Lea, 1997).

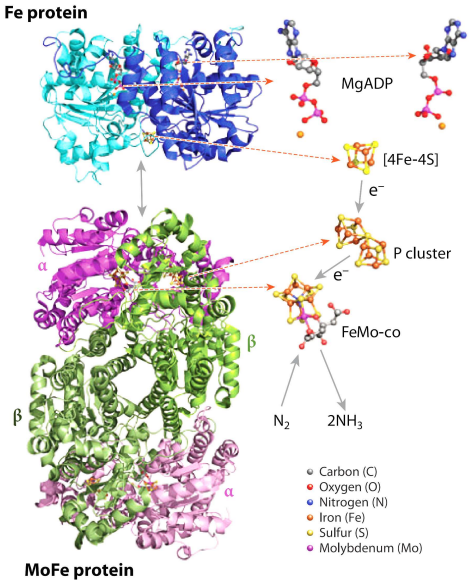


Figure 5. Structure et interactions des métalloprotéines Fe et MoFe de la nitrogénase FeMo-co : cofacteur polypeptidique fer-molybdène-souffre [7Fe-Mo-9S-homocitrate-X] dans chacune des unités α et β. Cluster P : métallocluster [8Fe-7S] (Seefeldt *et al.*, 2009).

La protéine-Fe assure un transfert cyclique d'un électron à la protéine MoFe via l'hydrolyse de deux molécules d'MgATP, ce qui entraîne l'oxydation du cofacteur protéique FeMo-co et la réduction de l'azote gazeux (N_2) en ammoniac (NH_3) en 8 cycles réactionnels.

L'équation bilan de la réduction d'une molécule d'azote gazeux par la nitrogénase est la suivante :

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16MgATP \Longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16MgADP + 16P_i$$

L'activité catalytique de la nitrogénase est inhibée de manière irréversible en présence du dioxygène. Au cours de l'évolution, les diazotrophes ont acquis divers mécanismes d'adaptation, qui leur permettent de protéger la nitrogénase du O_2.

II.3. Microorganismes diazotrophes

Les microorganismes aptes à convertir l'azote gazeux en ammonium sont qualifiés de diazotrophes. Cette aptitude tributaire à la présence de la seule enzyme nitrogénase, est répandue uniquement chez les procaryotes (Bactéries et Archées). Depuis la découverte de la fixation biologique de l'azote (Hellriegel & Wilfarth, 1888), elle a été mise en évidence chez de nombreux procaryotes incluant (i) plusieurs groupes phylogénétiques de bactéries tels que : les bactéries vertes sulfureuses, les Firmicutes Gram+ (Firmibactéries, etc.), les cyanobactéries, les bactéries actinomycètes et toutes les subdivisions des protéobactéries, (ii) exclusivement les méthanogènes chez les Archées (Dixon & Kahn, 2004). Ces organismes sont ubiquistes et présentent par conséquent une large capacité d'adaptation à différents milieux écologiques.

III. Symbiose fixatrice d'azote

La plupart des bactéries diazotrophes connues se trouvent associées aux plantes. Réciproquement, face à une carence en azote certaines plantes ont acquis la capacité d'établir des relations symbiotiques avec ces bactéries, pour un approvisionnement en azote atmosphérique. Le degré d'intimité et d'interdépendance lors de l'interaction varient selon la nature des organismes associés. Lorsque les bactéries associées colonisent la surface des racines de la plante, sans pénétrer les tissus racinaires on parle d'interactions épiphytes. A l'opposé, lorsque les bactéries colonisent la rhizosphère, pénètrent à l'intérieur des tissus végétaux, envahissent les espaces inter et/ou intracellulaires on parle d'interactions endophytes ou endosymbioses. De l'association mutualiste à l'endosymbiose, les symbioses fixatrices d'azote sont classées habituellement selon les types de bactéries diazotrophes, qui sont subdivisées en trois groupes : les cyanobactéries, les *Frankia* et les *rhizobia* (Mus *et al.*, 2016).

- **Les symbioses avec les cyanobactéries**

Les cyanobactéries sont des bactéries filamenteuses $Gram^{+}$ photosynthétiques capables de fixer l'azote atmosphérique dans des cellules spécialisées appelées hétérocystes. Ces cellules sont munies d'une paroi épaisse qui régulent la diffusion du dioxygène et empêchent l'inactivation de la nitrogénase (Perkins & Peters, 1993). Les cyanobactéries s'associent avec des plantes appartenant à différents embranchements : les ptéridophytes, les gymnospermes et les angiospermes. La symbiose avec la fougère aquatique Azolla (ex : Azolla-Anabaena) est la plus connue et exploitée en agriculture en (Peters & Meeks, 1989; Adhikari *et al.*, 2021). Elle injecte annuellement environ50 à 90 kg N/ha dans les rizières (Herridge *et al.*, 2008).

- **La symbiose avec** *Frankia*

Le genre *Frankia* comprend des actinobactéries filamenteuses Gram$^+$ caractérisées par la présence d'hyphes végétatifs, de vésicules et de spores. Ces bactéries s'associent avec des plantes dites actinorhiziennes appartenant à 25 genres regroupés en 8 familles et 3 ordres : les Fagales (*Betulaceae*, *Casuarinaceae*, et *Myricaceae*), les Rosales (*Rosaceae*, *Eleagnaceae*, et *Rhamnaceae*) et les Cucurbitales (*Datiscaceae* & *Coriariaceae*) (Dawson, 2008). L'interaction entre les deux symbiotes conduit à la formation d'un nouvel organe appelé nodule ou nodosité. Cette symbiose permet aux plantes actinorhiziennes de jouer un rôle important dans la restauration des sols dégradés, le reboisement ou encore l'agroforesterie.

- **La symbiose avec les** *rhizobia*

Les *rhizobia* sont des bactéries Gram$^-$ appartenant majoritairement aux α- et β-protéobactéries (Checcucci *et al.*, 2019). A l'exception des espèces du genre *Parasponia* (famille des *Cannabaceae*), les *rhizobia* n'établissent les interactions symbiotiques qu'avec les plantes de la famille des *Fabaceae* (légumineuses). Les bactéries envahissent les cellules végétales et provoquent la formation de nodules sur les racines ou la tige des légumineuses (Planche 1), où elles se différencient le plus souvent en bactéroïdes qui fixent l'azote atmosphérique pour transférer à la plante, en échange de photosynthétats. La symbiose légumineuse-*rhizobia* injecte environ40 M de tonnes N dans les systèmes de culture chaque année (Herridge *et al.*, 2008). Elle joue un rôle important en agriculture en réduisant la demande ou les apports en engrais chimiques, qui sont couteux et néfastes pour l'environnement. La quantité d'azote fixé par les légumineuses représente environ30 à 50% de l'azote utilisée couramment en agriculture (Herridge *et al.*, 2022).

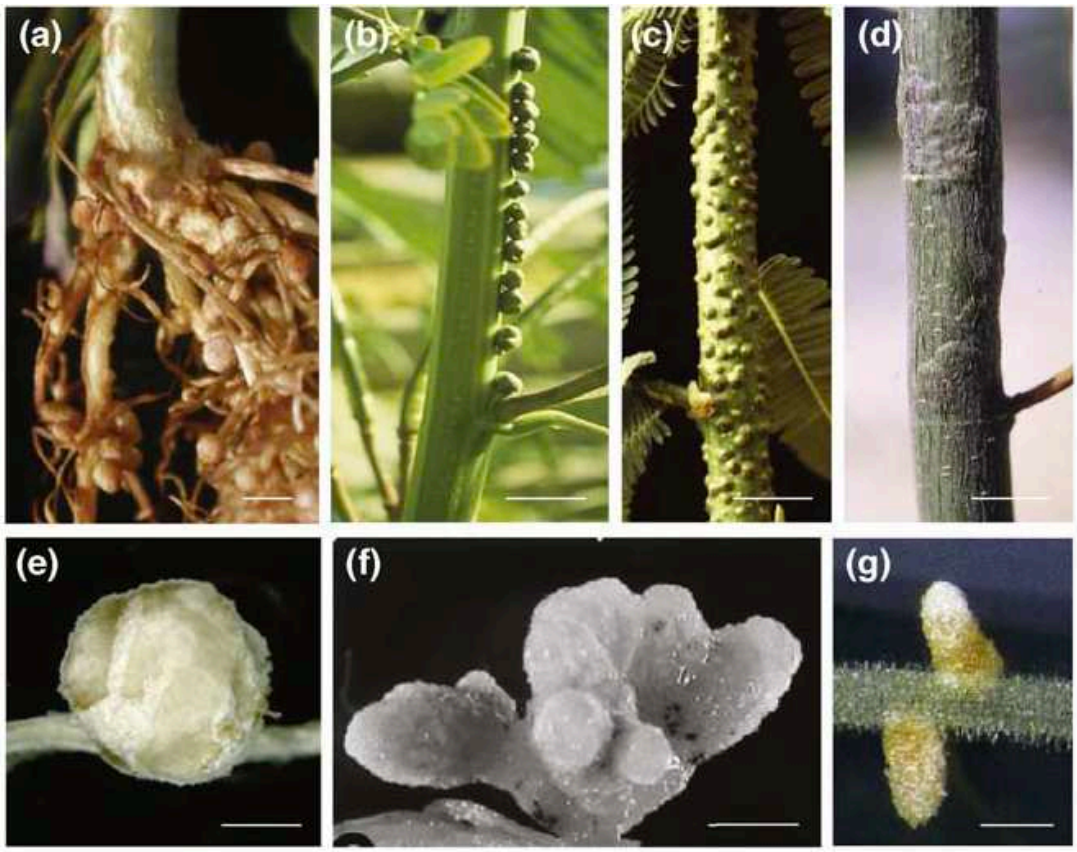


Planche 1. Variations morphologiques de la symbiose légumineuse-*rhizobia*

Nodules racinaires : (a) *Mimosa pudica-Cupriavidus taiwanensis* ; Nodules caulinaires : b) *Sesbania rostrata-Azorhizobium caulinodans*, (c) *Aeschynomene sensitiva-Bradyrhizobium* sp. ORS322, (d) *Aeschynomene sensitiva-Bradyrhizobium* sp. ORS278. On distingue différentes formes de nodules : (e) arrondie chez Soja-*Sinorhizobium fredii*, (f) coralloïde chez *Crotalaria perrottetii-Methylobacterium* nodulans et (g) allongée chez *Medicago sativa-Sinorhizobium meliloti* (Masson-Boivin *et al.*, 2009 modifié).

III.1. Symbiose légumineuse-*rhizobia* : les deux partenaires

III.1.1. Diversité des *rhizobia*

Les *rhizobia* sont des bactéries du sol capables d'infecter les racines de la plante et de former des nodules, où elles peuvent fixer l'azote. Initialement, toutes les bactéries capables de noduler et de fixer l'azote en association avec les légumineuses, étaient assignées au genre *Rhizobium*. Par la suite, elles ont été classées suivant leurs phénotypes et leurs caractères nutritionnels ou métaboliques. Par exemple, le temps de régénération a permis de distinguer les *rhizobia* à croissance lente et ceux à croissance rapide (Sadowsky *et al.*, 1983). Toutefois, les différences taxonomiques fines ont été observées grâce à l'analyse de la diversité génétique des souches, en utilisant des marqueurs taxonomiques comme l'ADNr 16S (Figure 6) (Masson-Boivin *et al.*, 2009). Récemment, les techniques de séquençage nouvelle génération (NGS) associées aux

critères standard de description d'une espèce tels la comparaison de génomes et l'identité nucléotidique moyenne (De Lajudie *et al.*, 2019) ont facilité la classification taxonomique des *rhizobia*. De nos jours, les *rhizobia* comprennent environ 180 espèces, regroupées en 21 genres appartenant essentiellement aux classes des α- et β-protéobactéries (respectivement α- et β-*rhizobia*). Les alpha-*rhizobia* sont majoritaires et plus diversifiées. Elles comprennent de nombreux genres parmi lesquels : *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Neorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Methylobacterium* (Rogel *et al.*, 2011; Mousavi *et al.*, 2014). Les β -*rhizobia* sont moins diversifiés et regroupent les genres comme *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Vandamme *et al.*, 2002; Vandamme & Coenye, 2004). A l'exception de quelques espèces d'*Azorhizobium* et des *Bradyrhizobium* photosynthétiques, les *rhizobia* sont hétérotrophes à l'état libre dans le sol, et n'acquièrent l'aptitude à fixer l'azote qu'une fois la symbiose établie avec leur hôte.

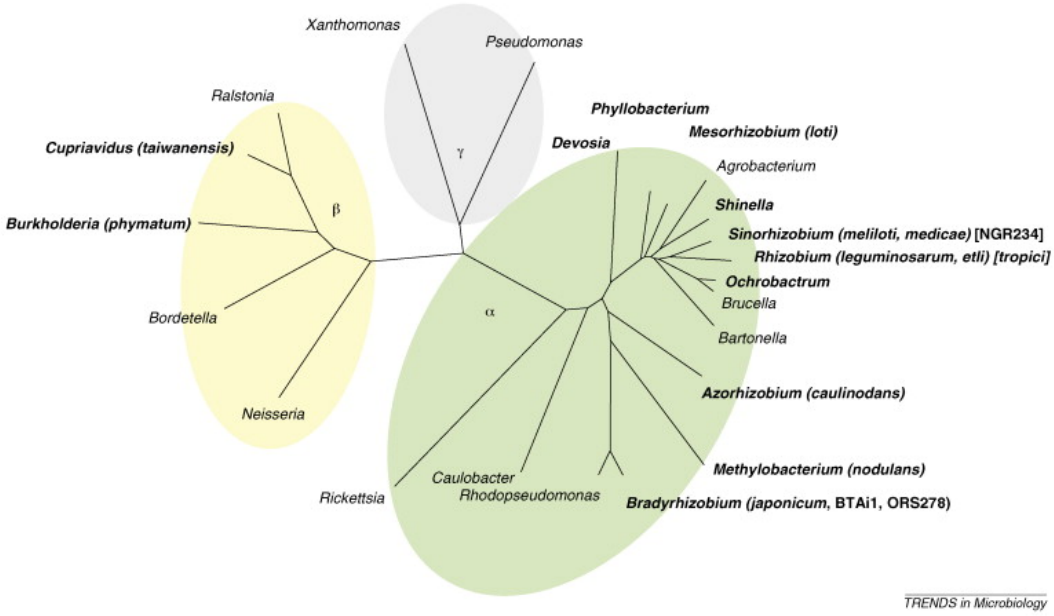


Figure 6. Phylogénie des α, β, et γ protéobactéries basée sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S Les genres qui comprennent les *rhizobia* sont représentés en gras. Les parenthèses indiquent les espèces dont les génomes ont été entièrement séquencés.

III.1.2. Diversité des *Fabaceae* et capacité à noduler

Suivant une classification taxonomique récente basée sur les séquences peptidiques de 81 protéines codées par des gènes chloroplastiques, les légumineuses se regroupent en six sous-familles (Azani *et al.*, 2017). Bien que, les légumineuses soient apparues il y a environ 60 M

d’années, l’aptitude à former des nodules en interaction avec les *rhizobia* n’est pas présente chez toutes les légumineuses (Doyle, 2016). Sur les six sous-familles des légumineuses, la nodulation ne s’observe que chez les *Caesalpinioideae* et les *Papilionoideae* (Figure 7).

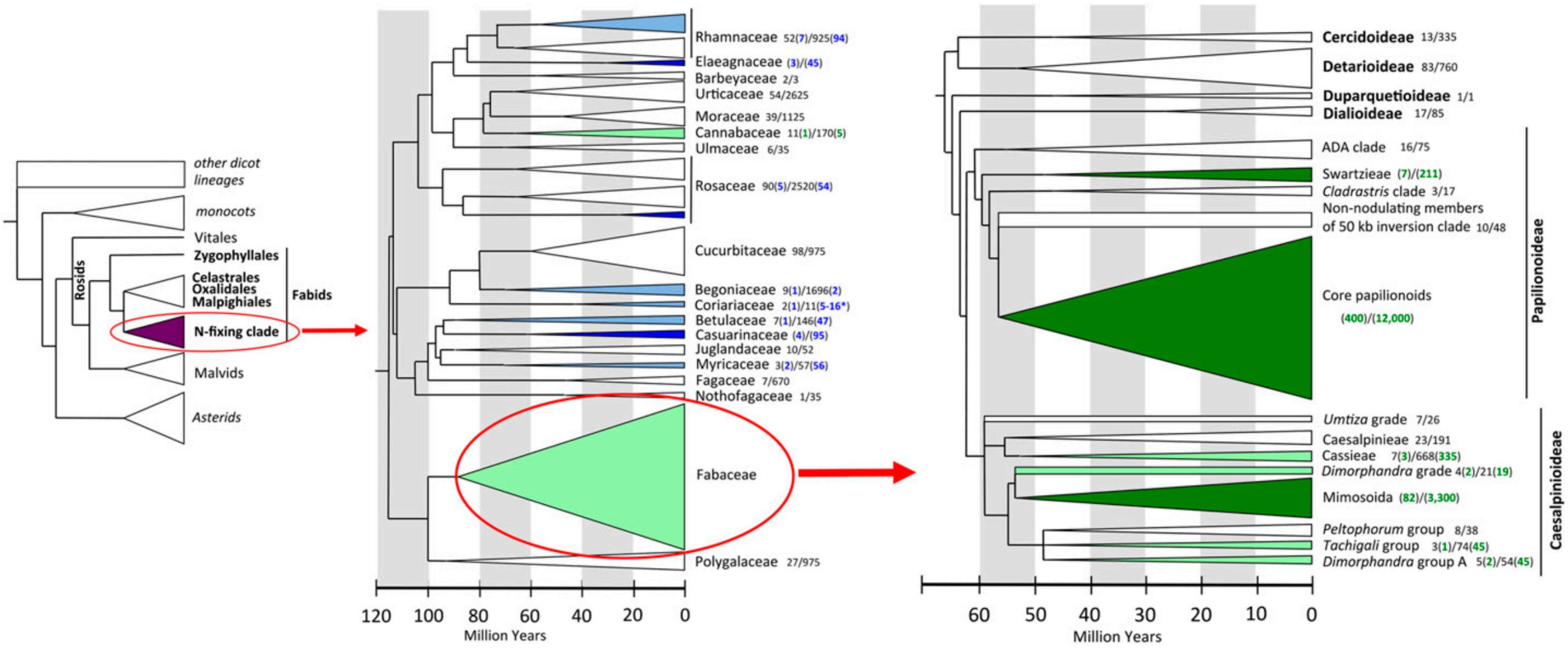


Figure 7. Répartition phylogénétique de l'aptitude à noduler chez des angiospermes (Doyle, 2016).

A gauche : Position du sous-clade des plantes fixatrices d'azote au sein du clade des Rosidae. Au centre : Phylogénie des familles de plantes aptes à noduler et chronologie d'apparition des différentes familles, en blanc : les familles de plantes non-nodulantes ; en bleu clair ou foncé : famille de plantes actinorhiziennes et en vert : les *Fabaceae* ou plantes légumineuses. A droite : Arbre phylogénétique des *Fabaceae*, les sous familles comprenant les plantes formant des nodules sont représentées en vert foncé ou clair.

III.1.3. Compatibilité d'hôte

Environ 88% des légumineuses sont capables de former des nodules. L'interaction légumineuse-*rhizobia* peut être étroite (ou spécifique) ou large. De nombreux *rhizobia* sont capables de noduler avec une large gamme de légumineuses, tandis que d'autres *rhizobia* n'infectent que certaines espèces de légumineuses. Réciproquement, de nombreuses légumineuses ne sont nodulées que par certaines souches, tandis que d'autres légumineuses peuvent s'associer avec des *rhizobia* appartenant à des genres différents. Ainsi, le pois chiche (*Cicer arietinum*) ne peut être nodulé que par espèces du genre *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2012). De même, *Medicago truncatula* n'établit de symbiose qu'avec quelques espèces du genre *Sinorhizobium* (*Ensifer*) (Wang *et al.*, 2018). A l'opposé, le soja (*Glycine max*) est nodulé par des bactéries appartenant aux genres *Bradyrhizobium* et *Sinorhizobium*. D'autres légumineuses s'associent préférentiellement à de nombreuses espèces de *rhizobia* appartenant au même genre. Par exemple, le haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) et l'arachide (*Arachis hypogaea*) qui s'associent respectivement avec les *rhizobia* des genres *Rhizobium* (Aguilar *et al.*, 2004) et *Bradyrhizobium* (Taurian *et al.*, 2006; Zaiya *et al.*, 2018). Tandis que les espèces du genre *Sophora* sont capables de noduler avec 6 genres de *rhizobia* (Wang *et al.*, 2019b). La réciproque se vérifie avec les souches NGR234 (New Guinea Rhizobium) et USDA257 (*Rhizobium fredii*) qui sont connues pour leur large spectre d'hôte. NGR234 est capable de noduler des espèces appartenant à 112 genres de légumineuses (Pueppke & Broughton, 1999), ainsi que les espèces non-légumineuses du genre *Parasponia* (Behm *et al.*, 2014). *R. fredii* quant à elle infecte les espèces appartenant à 79 genres de légumineuses (Pueppke & Broughton, 1999). La phylogénie des *rhizobia* ne se traduit pas sur la répartition taxonomique de leurs légumineuses hôtes (Figure 8). Il n'y a pas de relation directe entre la position taxonomique des légumineuses et leur aptitude à établir la symbiose avec les *rhizobia* (Doyle, 1998).

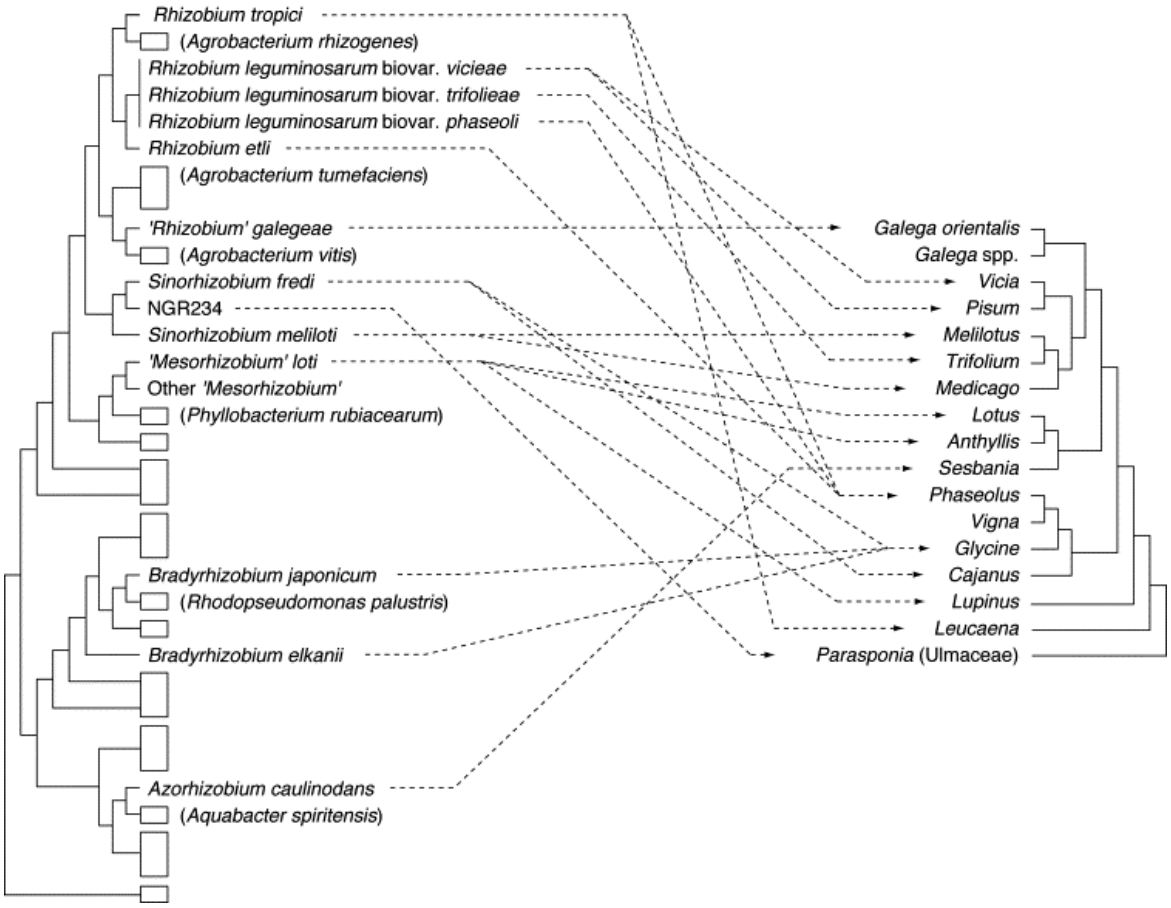


Figure 8. Répartition taxonomique et interactions entre *rhizobia* et légumineuses.

A gauche l'arbre phylogénique des *rhizobia* basé sur la séquence de l'ARNr 16S. Les bactéries non-symbiotiques sont représentées par des rectangles blancs et les espèces correspondantes sont indiquées entre parenthèses. A droite l'arbre phylogénétique des légumineuses et de la non-légumineuse *Parasponia* basé sur la séquence du gène *rbcL*. Les flèches montrent les différentes combinaisons *rhizobia*-légumineuses. Le spectre d'hôte de la souche NGR234 est juste représenté par son interaction avec *Parasponia* (Doyle, 1998).

III.1.4. Mise en place de la symbiose légumineuse-*rhizobia*

III.1.4.1. Reconnaissance entre les deux partenaires

Le processus de mise en place de la symbiose légumineuse-*rhizobia* a été largement décrit chez les légumineuses modèles *Lotus japonicus et Medicago truncatula* (Oldroyd *et al.*, 2011; Oldroyd, 2013; Roy *et al.*, 2020). L'établissement de la symbiose débute par un dialogue moléculaire entre les deux partenaires. La plante libère dans la rhizosphère des exsudats racinaires qui contiennent des flavonoïdes, reconnus par la bactérie comme des signaux symbiotiques. Cette reconnaissance attire la bactérie au tour de la racine (chimiotactisme) et active la transcription des gènes de nodulation (*nod*, *nol*, *noe*) impliqués dans la synthèse de facteurs Nod (NF), des lipochitooligosaccharides reconnus par des récepteurs membranaires spécifiques LysM-receptor-like kinases, LysM-RLKs (NFR1 et NFR5 de *L. japonicus* / LYK3 et NFP de *M. truncatula*) des cellules végétales (Oldroyd *et al.*, 2011). Cependant, en l'absence de gènes de nodulation bactériens (*nodABC*, *nodD*, *nodIJ*) et donc de NFs, certaines souches de *Bradyrhizobium* sont capables noduler avec la plante (Giraud *et al.*, 2007). Ces bactéries utilisent une autre voie d'infection, faisant intervenir le système de sécrétion de type III (T3SS) (Okazaki *et al.*, 2013). Le T3SS est un système de sécrétion bien connu chez les bactéries pathogènes des plantes et des animaux, qui leur permet de contourner les mécanismes de défense de la plante pendant l'infection, en injectant des effecteurs[1] qui modulent les réponses de défense (Hueck, 1998). Son rôle dans le processus symbiotique été démontré chez le soja (Okazaki *et al.*, 2013) et *Aeschynomene* sp. (Okazaki *et al.*, 2016 ; Teulet *et al.*, 2019). Okazaki *et al.* (2016) suggèrent que le T3SS serait peut-être la voie d'infection primitive de l'interaction *rhizobia*-légumineuse, avant l'acquisition d'une voie plus sophistiquée impliquant les NF

III.1.4.2. Infection et organogénèse nodulaire

La reconnaissance entre la bactérie et la plante déclenche d'une part un programme de développement conduisant à la formation de nodules et d'autre part à l'infection des tissus de la plante par la bactérie (Fabra *et al.*, 2010; Ibáñez *et al.*, 2017a). La perception des NF conduit à des oscillations calciques nucléaires, qui découlent de l'activation d'un corécepteur RLKs de NF (*LjSYMRK*/*MtDMI2*), des canaux ioniques (CASTOR et POLLUX) et des pores nucléaires (NUP133, NUP85 et NENA) (Oldroyd *et al.*, 2011). Ces oscillations calciques conduisent à l'activation du complexe CCaMK et CYCLOPS, puis à l'induction de plusieurs facteurs de

[1] Un effecteur est une protéine injectée par la bactérie phytopathogène dans le cytoplasme des cellules végétales de la plante hôte qui joue un rôle essentiel au pouvoir pathogène de la bactérie

transcription tels que NSP1, NSP2, ERF, NIN et ERN qui vont réguler l'organogénèse et l'infection du nodule (Oldroyd, 2013). Plusieurs phytohormones telles que les cytokines, l'auxine, l'éthylène, les gibbérellines ou encore l'acide abscissique régulent également le processus de nodulation. L'activation de la synthèse des cytokinines au niveau des cellules corticales est nécessaire et suffisante pour initier la formation du primordium nodulaire (Murray *et al.*, 2007). La perception de NF induit la synthèse de cytokinines et une inhibition du transport polarisé (de l'apex caulinaire vers les racines) de l'auxine. Il en résulte une baisse de la teneur en auxine et une reprogrammation des cellules corticales, qui se divisent pour former le méristème nodulaire (Oldroyd *et al.*, 2011). Guinel (2015) rapporte que l'éthylène seul ou en concert avec d'autres phytohormones joue un rôle crucial au cours de la division cellulaire, la différentiation des bactéries en bactéroïdes, l'organogénèse et la senescence du nodule.

III.1.4.2.1. Modes d'infection

Deux modes d'infection ont été décrits chez les légumineuses (Figure 9). Dans la majorité des cas, l'infection des racines par les *rhizobia* est intracellulaire (Figure 9A). Ce mode d'infection est le plus étudié et s'observe chez les légumineuses comme le soja, le pois, la luzerne ou encore les légumineuses modèles (*Medicago truncatula* ou *Lotus japonicus*) (Sprent, 2008). Les *rhizobia* colonisent la rhizosphère et provoquent l'incurvation des poils absorbants en forme de ″crosse de berger″ à l'intérieur de laquelle, les bactéries se multiplient. Par la suite, ces dernières pénètrent les cellules épidermales à travers la membrane plasmique et infectent les tissus racinaires à travers les poils absorbants, via l'établissement de nouvelles structures tubulaires appelées cordons d'infection (Fabra *et al.*, 2010). Ces structures tubulaires s'allongent jusqu'aux cellules corticales où elles se ramifient pour atteindre le primordium nodulaire (Oldroyd *et al.*, 2011). Chez d'autres légumineuses (environ25% des *Fabaceae*) comme l'arachide, *Aeschynomene indica*, *Stylosanthes* sp., *Sesbania rostrata* ou *Neptunia natans*, l'infection est intercellulaire. Les bactéries infectent les racines sans former de cordons d'infection. Elles pénètrent et colonisent les espaces intercellulaires du cortex : (i) à travers les lamelles moyennes entre deux cellules adjacentes des poils absorbants , (ii) à travers les espaces à la base des poils absorbants sur les racines latérales émergées, (iii) à travers les fissures où émergent les racines latérales « crack entry » (Figure 9B) ou (iv) directement entre les cellules épidermiques (Ibáñez *et al.*, 2017a). L'infection intercellulaire apparemment plus simple serait le mode d'infection ancestral ou primitif, à partir duquel dériverait le mode d'infection ″sophistiqué″ intracellulaire (Madsen *et al.*, 2010).

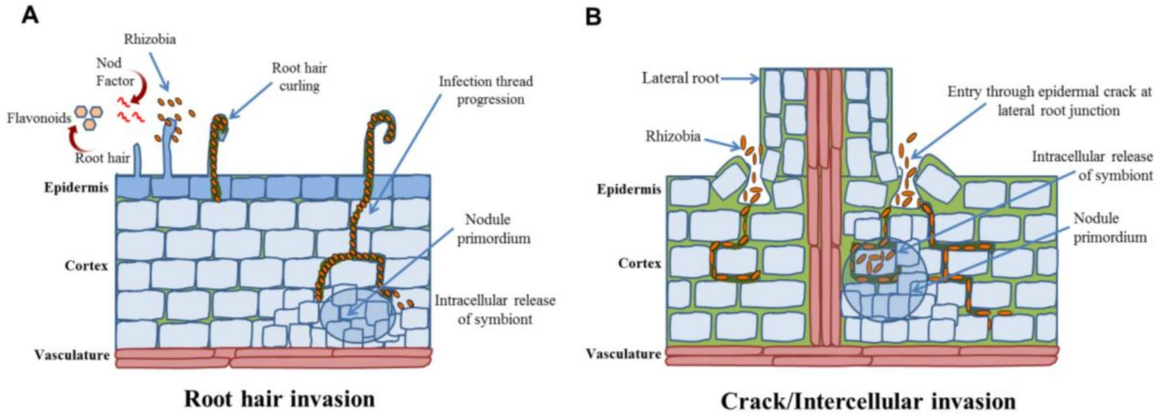


Figure 9. Infection intra et intercellulaire chez les légumineuses.

A : Infection intracellulaire à travers le poil absorbant racinaire. De la reconnaissance entre les *rhizobia* et la plante à la formation du primordium nodulaire, en passant par l'infection des cellules épidermales par la bactérie et la colonisation des tissus racinaire via l'établissement, l'allongement et la ramification du cordon d'infection. B : Infection intercellulaire par crack entry. Les bactéries pénètrent la racines à travers les fissures où émergent les racines latérales et colonisation des cellules corticales jusqu'au primordium nodulaire (Sharma *et al.*, 2020)

III.1.4.2.2. Types de nodules

Indépendamment du mode d'infection, l'interaction *rhizobia*-légumineuse conduit toujours à la formation d'un organe symbiotique appelé nodule, contenant des *rhizobia* différentiés en bactéroïdes capables de fixer l'azote atmosphérique. On distingue chez les légumineuses les nodules à croissance déterminée ou indéterminée, en fonction de l'activité du méristème nodulaire (Planche 2). La leghémoglobine est la protéine la plus abondante du nodule, indispensable au fonctionnement de la nitrogénase. La suppression de l'expression du gène codant la leghémoglobine chez *L. japonicus* par la technique de l'inférence d'ARN conduit à de faibles ratios ATP/ADP, l'augmentation de la teneur en oxygène du nodule et l'inhibition de l'activité catalytique de la nitrogénase (Ott *et al.*, 2005).

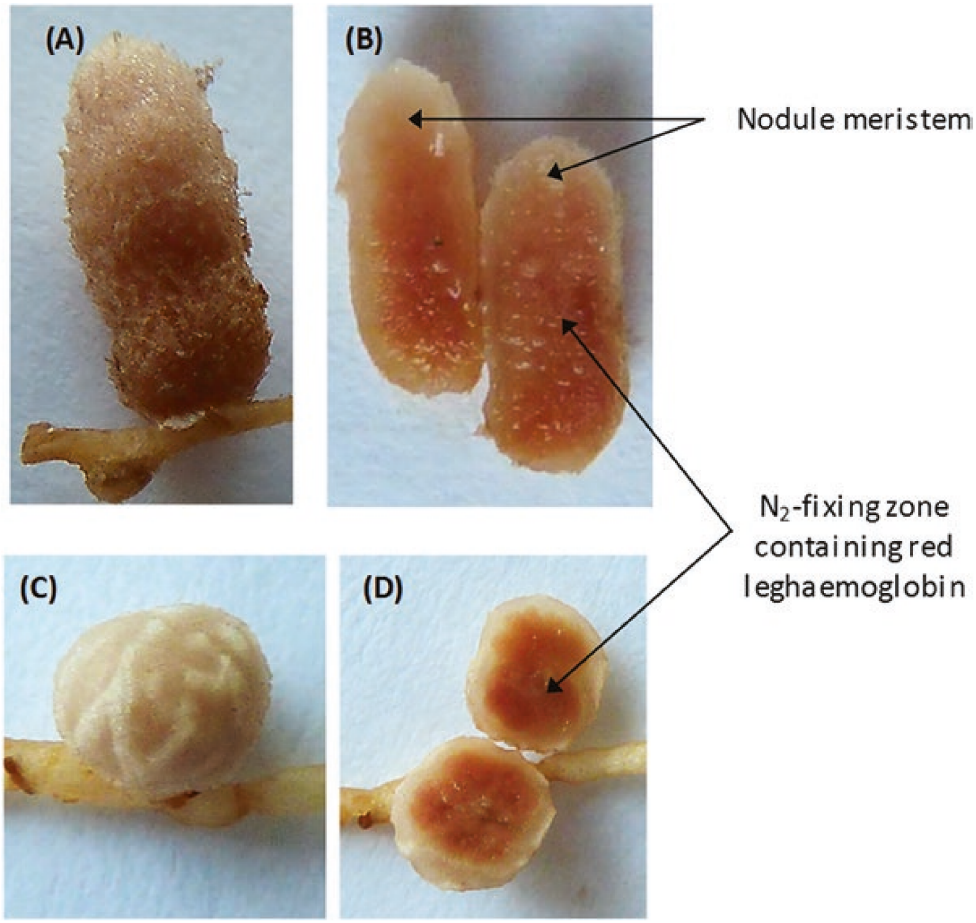


Planche 2. Morphologie des nodules chez les légumineuses

A et B : nodule mature de type indéterminé chez *Leucaena leucocephala* ; C et D : nodule mature de type déterminé chez *Vigna unguiculata*. La coloration rouge observée sur les coupes des nodules (B et D) indique la présence de la leghémoglobine et la zone de fixation (Wang *et al.*, 2019).

Les nodules déterminés (comme chez *Lotus japonicus*, *Glycine max*, *Vigna unguiculata Phaseolus vulgaris*, *Arachis hypogaea*) sont sphériques sans méristème persistent tandis que, les nodules indéterminés (comme chez *Medicago sativa*, *Pisum sativum*, *Vicia sativa*) sont allongés avec un ou plusieurs méristème (s) persistent (s) (Planche 3). En général, un nodule mature est composé d'une zone centrale et d'une zone périphérique. La zone centrale représente le siège de la fixation biologique de l'azote. La zone périphérique assure un rôle de protection physique, d'approvisionnement du nodule et d'exportation de l'azote fixé à la plante. Elle constitue le parenchyme nodulaire composé des cellules non infectées.

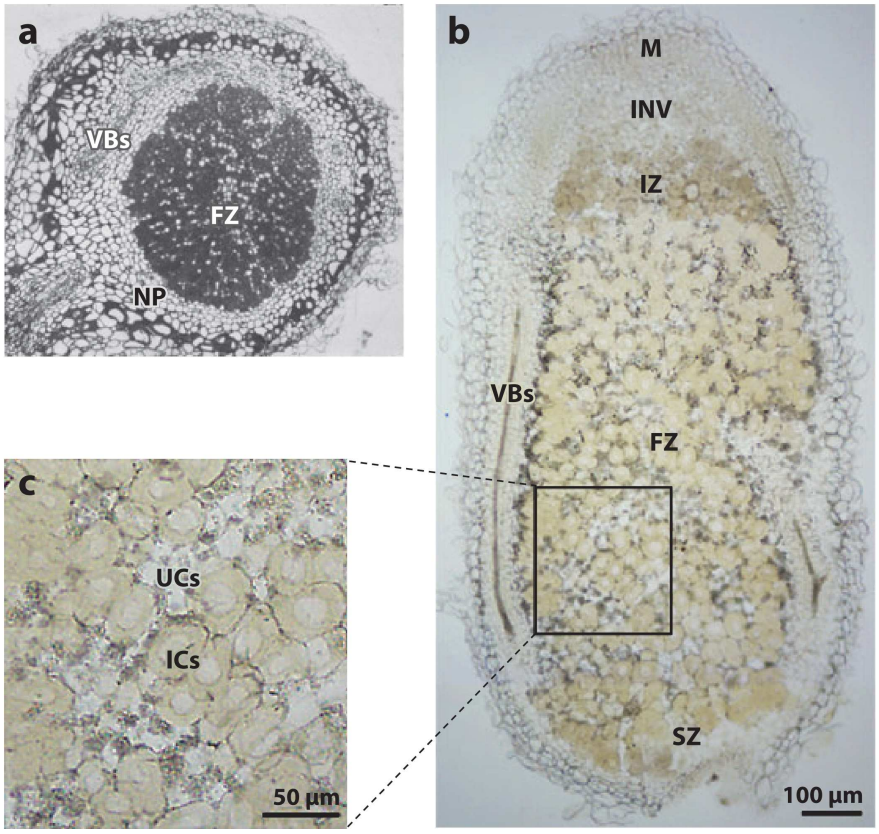


Planche 3. Anatomie nodulaire des légumineuses.

a : coupe longitudinale d'un nodule déterminé de *Glycine max*. Le nodule déterminé comprend une zone centrale de fixation de l'azote (FZ), où les cellules infectées sont sombres et celles non infectées sont claires. FZ est entourée du parenchyme nodulaire (NP) et de faisceaux vasculaires (VBs). b & c: coupe longitudinale d'un nodule indéterminé de *Medicago* sp. Le nodule indéterminé est composé de différentes zones montrant un gradient de développement : M : méristème, INV : zone d'infection, IZ : zone intermédiaire ou de pré-fixation, FZ : zone de fixation, SZ : zone de senescence. ICs et UCs indiquent respectivement les cellules infectées et non infectées (Udvardi & Poole, 2013).

III.5. Symbiose fixatrice d'azote chez l'arachide

III.5.1. *Rhizobia* associés à l'arachide

En général, l'arachide établit l'interaction symbiotique avec les *rhizobia* à croissance lente appartenant au genre *Bradyrhizobium*, représenté par les espèces *B. arachidis*, *B. guansdongense*, *B. guangxiense*, *B. lablabi*, *B. yuanmingense*, *B. iriomotense*, *B. japonicum*, *B. elkani*, *B. vignae* et d'autres *Bradyrhizobium* spp. qui n'ont pas encore été totalement décrits (Wang *et al.*, 2013, 2019b). Toutefois, quelques bactéries à croissance rapide (*Rhizobium*) ont été également isolées des nodules d'arachide (Taurian *et al.*, 2006; El-Akhal *et al.*, 2008; Jaiswal *et al.*, 2017). Zaiya *et al.* (2018) ont identifié à partir de la région intergénique 16-23S de ARNr trois grands groupes de *Bradyrhizobium* associés à l'arachide cultivée au Sénégal

(Figure 10). Cette étude a mis en évidence une relation entre la diversité phylogénétique des *rhizobia* et un gradient d'efficacité symbiotique. Les souches du cluster A étant les plus efficaces.

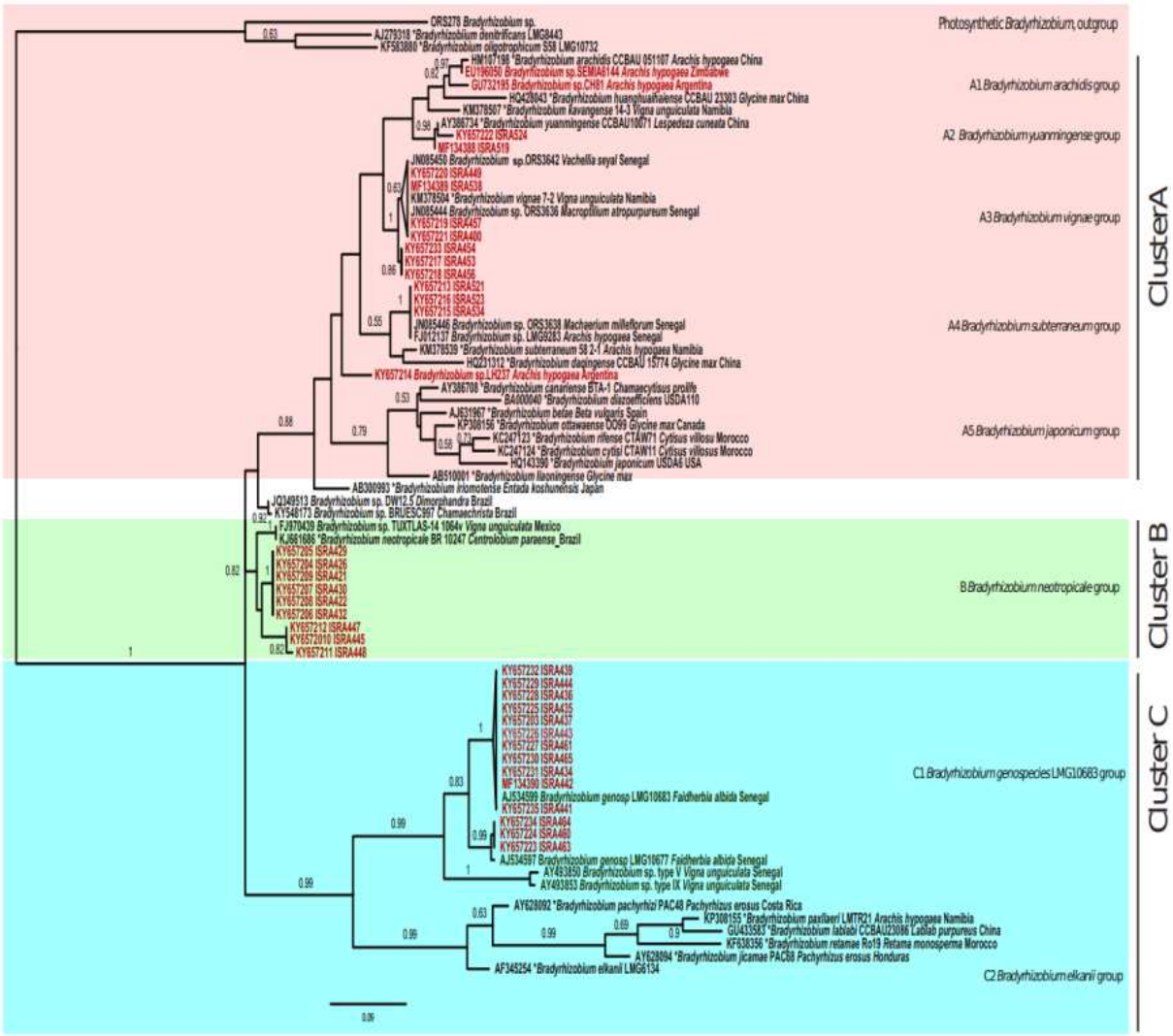


Figure 10. Arbre phylogénétique des *rhizobia* associés à l'arachide cultivée au Sénégal, basé sur l'analyse des séquences de la région 16S-23S de l'ARNr.

III.5.2. Processus d'infection et de formation du nodule chez l'arachide

Comme chez toutes les légumineuses, l'interaction symbiotique entre l'arachide et les *bradyrhizobia* débute par un dialogue moléculaire. Les exsudats racinaires de l'arachide contiennent de la diaidzéine, la génistéine et la chrysine, qui sont des flavonoïdes inducteurs de la synthèse des NF bactériens (Taurian *et al.*, 2008). La perception des NF par la plante conditionne l'adhésion des bactéries à la racine et l'infection des tissus racinaires. Par ailleurs, la production de NF ne serait pas indispensable à la nodulation chez l'arachide (Ibáñez & Fabra, 2011; Noisangiam *et al.*, 2012; Guha *et al.*, 2016). Ce qui signifie que le processus symbiotique

chez l'arachide peut s'établir suivant deux voies : NF-dépendante et NF-indépendante (à priori via le T3SS). L'infection intercellulaire des cellules racinaires s'effectue à travers les lamelles moyennes entre deux cellules adjacentes des poils absorbants (Figure 11). Morgante *et al.* (2007) indiquent que les *bradyrhizobia* produisent des exopolysaccharides qui seraient impliqués dans la suppression des mécanismes de défense de la plante et l'infection intercellulaire chez l'arachide.

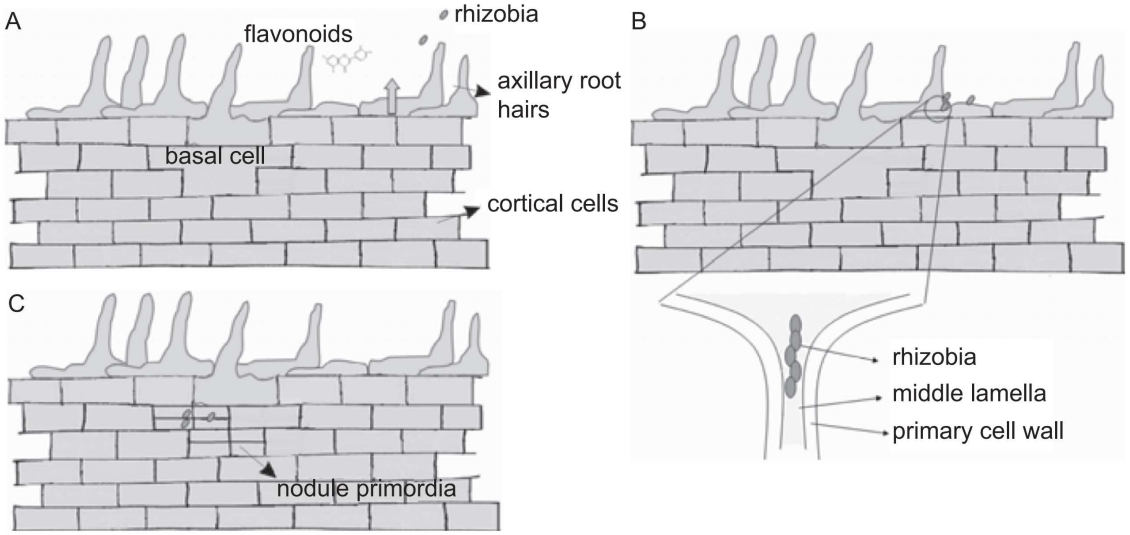


Figure 11. Processus d'infection intercellulaire chez l'arachide (*Arachis hypogaea*). A : Echanges de signaux entre la plante et les *rhizobia* ; B : Site d'infection des *rhizobia* à la jonction entre les cellules épidermales et les cellules corticales ; C : Colonisation des cellules corticales et formation du primordium nodulaire (Fabra *et al.*, 2010).

A l'inverse des plantes modèles où les mécanismes moléculaires qui gouvernent l'interaction symbiotique sont bien connus (Oldroyd *et al.*, 2011), chez l'arachide le processus de nodulation demeure peu connu. Tous les gènes indispensables à la nodulation chez les plantes modèles à l'exception de RPG (impliqué dans la formation du cordon d'infection) ont été également identifiés chez l'arachide (Lu *et al.*, 2018; Griesmann *et al.*, 2018; Karmakar *et al.*, 2018). Il y aurait une conservation fonctionnelle de la plupart des gènes de nodulation. Les deux récepteurs membranaires LysM-RLK *LjNFR1* et *LjNFR5* qui assurent la perception des NF chez *Lotus japonicus*, sont présents chez *Arachis hypogaea* par leurs gènes orthologues[2] respectifs *AhNFR1* et *AhNFR5* (Ibáñez *et al.*, 2015). Malgré la présence des récepteurs NFR chez

[2] Deux gènes sont dits orthologues lorsqu'ils sont issus d'un ancêtre commun et ne sont pas le résultat d'une duplication génétique.

l'arachide, la nodulation NF-dépendante semble être spécifique au *Bradyrhizobium* (Sharma *et al.*, 2020). En aval, de la perception de NFs, *MtDMI2/LjSYMRK* (récepteurs kinase à domaine Leucine-Rich-Repeat, LRR-LRK) initie une cascade de phosphorylation responsable de la mise en place du signal calcique nucléaire. *AhSYMRK* a été également identifié, mais son implication directe durant le processus symbiotique n'est pas encore clairement démontré (Sharma *et al.*, 2020). *LjCCaMK/MtDMI3* (kinases dépendantes du calcium et de la calmoduline) est impliqué dans la perception et le décodage des oscillations calciques nucléaires. Il contrôle l'invasion bactérienne à travers l'épiderme et le cortex et jusqu'au primordium nodulaire (Mitra *et al.*, 2004). Chez l'arachide, on retrouve l'orthologue *AhCCaMK*, dont la suppression de l'expression affecte considérablement le développement et la fonctionnalité du nodule (Sinharoy & DasGupta, 2009). *AhCYCLOPS* (*LjCYCLOPS/MtIP3*) joue un rôle important dans la transduction du signal calcique nécessaire à l'organogénèse nodulaire. L'inhibition de son expression conduit à la dérégulation de nombreux gènes de nodulation (*AhCCaMK, AhHK1, AhNIN, ENOD40*) responsables de l'infection, la différentiation des *rhizobia* en bactéroïdes et de la formation du nodule (Das *et al.*, 2019).

Quelques études indiquent également le rôle des phytohormones dans le processus de nodulation chez l'arachide. Les cytokinines jouent un rôle central dans la formation du primordium nodulaire et le développement du nodule. Kundu & DasGupta (2018) ont montré que le processus de nodulation chez l'arachide est associé à une forte expression des gènes impliqués dans les voies métaboliques des cytokinines et de l'éthylène. L'inhibition de l'expression du gène *AhHK1* (*MtCRE1/LjHK1*) qui code pour un récepteur de cytokinines affecte considérablement l'organogénèse du nodule chez l'arachide. L'analyse de profils transcriptomiques révèlent une forte expression de récepteurs d'éthylène (ERFs) et des orthologues des gènes de protéines de défense *PR*-10 durant la symbiose chez l'arachide (Peng *et al.*, 2017a; Kundu & DasGupta, 2018).

III.6. Méthodes de quantification de la symbiose fixatrice d'azote

L'azote fixé par les *rhizobia* à l'intérieur du nodule, est rapidement assimilé sous forme de glutamine (Atkins, 1987; Vance & Gantt, 1992), puis métabolisé et transféré vers les parties aériennes de la plantes via le xylème sous forme d'asparagine (Asn) (80% chez les légumineuses à amides) ou sous forme d'uréides (90 % chez les légumineuses à uréides) (Thilakarathna *et al.*, 2017). Il est essentiel de déterminer à l'échelle d'une plante ou d'un écosystème, les entrées d'azote dues à la symbiose fixatrice d'azote. Pour effectuer ces mesures, on distingue deux grands groupes de méthodes :

– Les méthodes directes englobent la méthode isotopique ^{15}N (Herridge & Rose, 2000) et le dosage des uréides. La méthode isotopique ^{15}N est la plus précise et la plus couramment utilisée. Elle est basée sur la mesure du taux d'incorporation ou d'abondance de l'isotope ^{15}N ($\delta^{15}N$) dans un échantillon (Chalk *et al.*, 2019; Cox *et al.*, 2022). Cette abondance est calculée à partir du ratio isotopique $^{15}N/^{14}N$, qui lui-même est déterminé par analyse au spectromètre de masse. L'isotope ^{15}N étant chimiquement stable et naturellement rare dans l'atmosphère et présent dans le sol, les plantes non fixatrices ont le même $\delta^{15}N$ que le sol sur lequel elles se développent. Tandis que, les plantes fixatrices ont un plus faible $\delta^{15}N$, car elles puisent une partie de leur azote de l'atmosphère, où le $\delta^{15}N$ est par définition nul.

$$\delta 15\mathrm{N}(‰) = \frac{R_{échantillon} - R_{atmosphère}}{R_{atmosphère}} \times 1000$$

Où R correspond au ratio isotopique $^{15}N/^{14}N$.

Par la suite, le $\delta^{15}N$ permet de calculer le pourcentage d'azote fixé (%Ndfa) à partir de la formule :

$$\%\mathrm{Ndfa} = \frac{\delta 15\mathrm{N}_{\,référence} - \delta 15\mathrm{N}_{\,légumineuse}}{\delta 15\mathrm{N}_{\,référence} - B} \times 100$$

Où $\delta^{15}N_{référence}$ et $\delta^{15}N_{légumieuse}$ correspondent respectivement à l'abondance isotopique ^{15}N de la plante non fixatrice d'azote et de la légumineuse ; B représente l'abondance isotopique ^{15}N lorsque la légumineuse dépend uniquement de la fixation d'azote. Communément, chez l'arachide B = -2,70 ‰ (Mokgehle *et al.*, 2014)

– Les méthodes indirectes comprennent la méthode de différence, l'activité réductrice de l'acétylène (ARA), ou encore le nombre de *rhizobia* différenciés par nodule (Bourcy *et al.*, 2013). La mesure de l'ARA repose sur la capacité de la nitrogénase à réduire l'acétylène en éthylène. Elle consiste à placer des racines nodulées excisées ou des plantes entières dans un flacon hermétique où 10% de l'air ont été remplacés par de l'acétylène (Kalia & Drevon, 1985; Bonaldi *et al.*, 2010b). Après 03 heures d'incubation à l'obscurité à 25 °C, des échantillon de gaz (1 ml) sont prélevés et analysés par chromatographie en phase gazeuse, pour mesurer la quantité d'éthylène produit. La méthode de différence est basée sur la comparaison des quantités d'azote entre une plante fixatrice et une plante non fixatrice. La détermination de la teneur en glutamine des feuilles constitue également un excellent indicateur de la quantité

d'azote fixé (Thilakarathna *et al.*, 2017). Le tableau I récapitule les avantages et inconvénients de quelques méthodes de quantification de la fixation d'azote.

Tableau I : Quelques caractéristiques des méthodes de quantification de la fixation biologique de l'azote

Caractéristiques	Méthodes de quantification						
	SPAD	Biomasse	Différence teneur N	ARA	Dosage glutamine	Dosage uréides	Isotopique ^{15}N
Précision	Faible	Faible	Faible	Moyenne	Très élevée	Élevée	Très élevée
Type de mesure	Indirecte	Indirecte	Indirecte	Indirecte	Indirecte	Directe	Directe
Coût	Faible	Faible	Élevée	Élevée	Faible	Élevée	Très élevée
Destructive	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
Plante non fixatrice	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	Oui
Milieu d'application	Serre	Serre et Champ	Serre et champ	Serre	Serre	Serre et champ	Serre et champ

III.7. Impacts des stress abiotiques sur la symbiose fixatrice d'azote

Les conditions de stress pédoclimatiques peuvent affecter considérablement le processus de nodulation. Dans les régions tropicales, elles y sont principalement caractérisées par les températures élevées, le pH du sol, le stress salin, le stress hydrique et la fertilité du sol, qui peuvent influencer la réponse de la plante et/ou des *rhizobia* et entraîner une diminution de l'efficacité symbiotique. Par ailleurs, d'autres facteurs environnementaux tels que les stress biotiques, la toxicité par les ions métalliques et les pesticides influencent également la symbiose légumineuse-*rhizobia* (Goyal *et al.*, 2021).

III.7.1. Température

La survie des populations bactériennes dans le sol est primordiale pour la mise en place de la symbiose lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables. La température influence la distribution géographique des *rhizobia* et affecte significativement la survie, la diversité des *rhizobia* et leur capacité à noduler (Hungria & Vargas, 2000). La température idéale de croissance des *rhizobia* est comprise entre 25 et 30°C, mais certains symbiotes sont capables de fixer l'azote entre 30 et 42 °C dans les conditions semi-arides et arides (Dwivedi *et al.*, 2015). Toutefois, l'adaptation des bactéries aux températures élevées est très souvent associée à une réduction de l'activité de la nitrogénase, de la teneur en azote, et du nombre de nodules (Michiels *et al.*, 1994; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2016). L'augmentation de la température

à 37 et 40 °C entraîne respectivement une diminution de la teneur en azote de 49% et une absence de nodulation chez l'arachide inoculée avec différentes souches de *Bradyrhizobium* sp (Kishinevsky *et al.*, 1992).

III.7.2. pH du sol

Les sols tropicaux sont généralement fortement lessivés, acides et infertiles, et contiennent des concentrations toxiques en ions métalliques (Fageria & Baligar, 2008). L'effet du pH du sol sur le processus de nodulation a été largement étudié, en raison de l'augmentation des superficies de sols acides à travers le monde (Hungria & Vargas, 2000). L'acidité du sol affecte les étapes précoces de l'infection, incluant le dialogue moléculaire entre les deux partenaires. Un faible pH réduit la sécrétion de flavonoïdes et des facteurs Nods, et la formation de nodules (McKay & Djordjevic, 1993). Une très faible induction de facteurs Nods en présence d'exsudats racinaires d'arachide ou de flavonoïdes a été observée chez des *rhizobia* acido-sensibles en milieu acide (Angelini *et al.*, 2003). Angelini *et al.* (2005) ont analysé la cinétique de nodulation de l'arachide par des *rhizobia* acido-sensibles et tolérants dans des conditions de stress acide. Le nombre de nodules diminue uniquement lorsque l'arachide est inoculée avec des *rhizobia* acido-sensibles, tandis que la nodulation par les *rhizobia* acido-tolérants n'a pas été affectée par les conditions de stress. Ces résultats suggèrent que l'efficacité symbiotique de l'arachide dans les sols acides dépend essentiellement de la capacité du symbiote bactérien à tolérer l'acidité.

III.7.3. Salinité

Environ 40% des surfaces de terres arabes au monde sont affectées par la salinité et la dessiccation, limitant considérablement la productivité des cultures (Goyal *et al.*, 2021). Le stress salin peut affecter la symbiose à différentes étapes : la croissance et la survie des *rhizobia* dans le sol, la colonisation des racines, l'infection des tissus, le développement et le fonctionnement de nodules (Kulkarni *et al.*, 2000). Dardanelli *et al.*, (2012) ont montré que, le stress salin diminue la capacité des exsudats racinaires du haricot commun à induire la synthèse des facteurs Nods, bien que la structure des flavonoïdes n'ait pas été altérée. Généralement, les *rhizobia* tolèrent plus la salinité que leurs plantes hôtes. Cette tolérance à la salinité peut être associée à la phylogénie de la bactérie. Les souches *Bradyrhizobium* et *Mesorhizobium* sont les plus sensibles, tandis que les souches *Rhizobium* et *Sinorhizobium* sont relativement plus tolérantes (Laranjo & Oliveira, 2011; Brígido *et al.*, 2012). Les fortes teneurs en sel peuvent inhiber complètement la nodulation de l'arachide inoculée avec différentes souches de *Bradyrhizobium* (Dardanelli *et al.*, 2009). Le stress salin induit des modifications dans la

composition de la membrane phospholipidique des *Bradyrhizobium* associés à l'arachide (Medeot *et al.*, 2007).

III.7.4. Stress hydrique

Le manque en eau est le facteur majeur qui limite drastiquement la fixation biologique d'azote, en entravant le processus de nodulation (Hungria & Vargas, 2000). Il affecte la survie, la croissance des *rhizobia* dans le sol, la formation et la longévité des nodules, la synthèse de la leghémoglobine, et le fonctionnement du nodule (Purcell & King, 1996; Serraj *et al.*, 1999). Kunert *et al.* (2016) ont montré que le stress hydrique affecte considérablement l'architecture racinaire de la plante et induit une senescence précoce de nodules chez le soja. Une réduction de 30 à 40% de la teneur en azote des feuilles et des graines a été observée chez les plantes de soja dans les conditions de stress hydrique (Streeter, 2003). Chez l'arachide, l'activité de la nitrogénase, la teneur en azote, le nombre et le poids de nodules diminuent significativement en absence d'eau (Pimratch *et al.*, 2008; Furlan *et al.*, 2012). L'impact du stress hydrique sur la nodulation dépend du stade de développement de la plante, c'est-à-dire que, un stress qui intervient au début de la croissance végétative n'aura pas d'effets significatifs sur la nodulation, mais pendant la floraison et le remplissage des gousses, il réduit drastiquement la quantité d'azote fixée (Chalk *et al.*, 2010). Wang *et al.* (2023) ont montré que l'application d'un stress hydrique au stade préfloraison réduit considérablement la quantité d'azote fixée par rapport à un stress appliqué en fin de cycle chez l'arachide.

III.7.5. Fertilité du sol

La symbiose entre la légumineuse et la bactérie n'est pas toujours obligatoire. Elle peut être conditionnée par la disponibilité ou la carence de nombreux nutriments tels que N , le phosphore (P), le fer (Fe), le potassium (K), la calcium (Ca) ou le molybdène (Mo) (O'Hara, 2001; Chalk *et al.*, 2010). Par exemple, un apport suffisant d'azote (NH_4^+/NO_3^-) à travers l'application de fertilisants chimiques peut inhiber l'activité de la nitrogénase et la nodulation (Streeter & Wong, 2008; Murray *et al.*, 2017). Cependant, une carence en N déclenche le processus symbiotique. La SFA est un processus très couteux en énergie (~16 moles d'ATP par mole de N_2 fixé), par conséquent la demande en phosphore est importante. Une déficience en phosphore entraîne une diminution de la teneur en N, due à une réduction de l'efficacité symbiotique chez des légumineuses telles que le soja (Qiao *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2012), le haricot commun (Isidra-Arellano *et al.*, 2018) et l'arachide (Didagbé *et al.*, 2014). Généralement, dans les sols à faible disponibilité en P, les champignons mycorhiziens à arbuscules sont associés aux légumineuses

afin de satisfaire la forte demande en P (Bucher, 2007). L'inhibition de la nodulation en absence de Fe a été démontrée chez l'arachide (O'Hara *et al.*, 1993).

IV. Méthodes d'optimisation de la symbiose fixatrice d'azote

L'efficacité de la symbiose légumineuse-*rhizobia* dépend de la triple interaction plante × *rhizobia* × environnement. Pour optimiser la SFA, les efforts de la recherche ont été axés d'une part sur la sélection de *rhizobia* efficients et le développement de la technologie de l'inoculation, et d'autre part sur les aspects génétiques de la SFA à travers la sélection des génotypes à fort potentiel symbiotique.

IV.1. Sélection sur le symbiote bactérien et technologie d'inoculation

Pendant de nombreuses années, l'amélioration de la SFA reposait essentiellement sur le ciblage de *rhizobia* efficaces associés à la légumineuse-hôte. Les *rhizobia* efficaces ont la capacité de bien infecter les tissus de la plante en formant des nodules fonctionnels caractérisés par la présence de la leghémoglobine, et sont adaptés aux conditions édaphiques de leur (s) hôte (s). La sélection des *rhizobia* efficaces est un long processus qui débute par un isolement de souches rhizobiennes en utilisant une série de cultures bactériennes à partir de nodules sains et fonctionnels de l'hôte ciblé. Ensuite, l'efficacité des souches isolées sera évaluée en les inoculant sur des graines ou des jeunes plantules de l'hôte en conditions stériles. Les plantes inoculées avec des *rhizobia* efficaces présenteront une bonne vigueur avec des feuilles de couleur vert-foncée et une hauteur plus importante que celles des plantes non inoculées. Les *rhizobia* efficaces seront par la suite testés sur les plantes en serre et/ou en champ pour évaluer leur compétitivité et leur adaptation. Enfin, les *rhizobia* les plus performants seront sélectionnés pour la production d'inoculum. Le séquençage des gènes symbiotiques (*Nod*ABC, *nif*HDK et T3SS), de la région 16S-23S de l'ADN ribosomal et/ou du génome complet peut être utilisé pour la caractérisation génétique et l'identification des *rhizobia* sélectionnés. Ce processus de sélection des *rhizobia* a été développé chez de nombreuses légumineuses cultivées telles que le soja (Seneviratne *et al.*, 2000; Furseth *et al.*, 2012), le haricot commun (Mostasso *et al.*, 2002; Mercante *et al.*, 2017), le niébé (Krasova-Wade *et al.*, 2003; Boddey *et al.*, 2017), le pois (Kyei-Boahen *et al.*, 2002; Singh & Singh, 2018) ou l'arachide (Allen & Allen, 1940; Castro *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2013; Zaiya *et al.*, 2018).

Depuis 1985, les inoculums rhizobiens sont utilisés en agriculture pour favoriser la croissance des légumineuses au monde. En Afrique subsahélienne, l'usage des inoculums demeure peu adopté par les producteurs en raison de l'absence de partenariat public-privé dans le

développement de la technologie d'inoculation, la faible sensibilisation des producteurs et l'accès limité aux inoculums, et le manque de partenariat entre les universités, les instituts de recherche et les associations de producteurs i.e., l'approche participative (Chianu *et al.*, 2011). Par ailleurs l'industrie de l'inoculation présente également quelques limites. Elle est encore entravée par plusieurs facteurs tels que la faible persistance des souches inoculées, la meilleure compétitivité des souches natives du sol, la qualité de l'inoculum (nombre de cellules rhizobiennes) ou la méthode d'inoculation. Par exemple, chez l'arachide, Bogino *et al.* (2006) ont montré que les souches inoculées étaient moins compétitives que les souches natives des sols argentins. Seulement 9% des nodules ont été formés par les souches inoculées (Bogino *et al.*, 2008). L'analyse de 18 inoculums destinés à la culture du soja en Argentine a montré que quatorze ne contenaient pas suffisamment de cellules rhizobiennes viables (Gomez *et al.*, 1997). Pour comprendre, les facteurs qui conditionnent la réussite ou l'échec de l'inoculation dans la culture de soja, Thilakarathna & Raizada, (2017) ont réalisé une méta-analyse de 28 études précédentes. Ils ont mis en évidence une grande variabilité de l'efficacité des inoculums sur le rendement en grain (-34% à +109%) et le nombre de nodules (-6 à +179%). Cette variabilité a été associée à la diversité des *rhizobia*, au génotype du soja et son interaction avec les *rhizobia*, la formulation de l'inoculum et la faible persistance des *rhizobia* inoculées dans le sol. D'autres études rapportent également la persistance des souches inoculées dans le sol comme un facteur limitant dans l'inoculation des légumineuses (McDermott & Graham, 1989; Carter *et al.*, 1995; Deaker *et al.*, 2004).

IV.2. Amélioration variétale : sélection de variétés performantes

IV.2.1. Stratégies pour améliorer la performance symbiotique

IV.2.1.1. Sélection de la tolérance symbiotique aux nitrates

La suppression de la nodulation due à l'azote minérale (nitrates) est bien documentée chez les légumineuses cultivées (Eskew *et al.*, 1989; O'Hara, 2001; Murray *et al.*, 2017). La tolérance symbiotique aux nitrates (TSN) correspond à l'aptitude de la légumineuse à noduler et à fixer l'azote sur un sol riche en nitrates. Cette aptitude a été considérée comme une cible importante dans les programmes de sélection, car elle permettrait d'augmenter considérablement les gains en azote des légumineuses en présence de l'azote minérale (Eskew *et al.*, 1989). Généralement pour cibler la TSN, les sélectionneurs exploitent une variation naturelle au sein d'une population ou une variation induite chez des mutants super- ou hypernodulants (Herridge & Rose, 2000). Par exemple, chez le soja, le screening en serre d'une population de 489 génotypes a permis d'identifier en présence de 2.5 mM de nitrates, 32 génotypes présentant une fixation

d'azote élevée par rapport aux cultivars sensibles (Betts & Herridge, 1987). L'évaluation en champ de ces 32 génotypes sur des sols enrichis en nitrates a révélé que les génotypes les plus tolérants aux nitrates fixent en moyenne 20 fois plus d'azote, forment 8 à 14 fois plus de nodules, et montrent une réduction de 30% du rendement en grains par rapport aux variétés commerciales qui sont sensibles aux nitrates (Herridge & Betts, 1988; Herridge *et al.*, 1990). Les analyses de sol post-récolte ont révélé que par rapport aux variétés commerciales, ~34 kg/ha d'azote ont été conservés dans les parcelles où les génotypes tolérants ont été cultivées (Herridge & Betts, 1988). Ces observations indiquent que l'augmentation de la fixation d'azote chez les génotypes tolérants a réduit leur dépendance à l'azote minérale du sol. L'analyse de la matrice de corrélation a montré que la perte de rendement observée chez ces génotypes est indépendante de la TSN, ce qui suggère que les génotypes tolérants pourraient être des parents donneurs permettant de transférer la TSN aux variétés commerciales (Herridge & Rose, 2000). La sélection par filiation unipare a été utilisée pour générer des populations F_5 et F_6 à partir de 849 descendants F_2 eux-mêmes issus, de 11 croisements entre des génotypes tolérants et des variétés commerciales à fort potentiel agronomique. L'évaluation de la TSN de ces populations a révélé que, si certaines lignées ont produit des rendements en grains supérieurs à ceux des variétés commerciales, aucun avantage symbiotique significatif n'a pu être ciblé dans ce programme de sélection (Herridge & Rose, 2000). Une variation naturelle de TSN a été également mise en évidence chez d'autres légumineuses cultivées telles que le pois (Jensen, 1987), le pois bambara (Dakora, 1998) ou le niébé (Singh & Usha, 2003). Néanmoins, son apport pour l'amélioration de la fixation d'azote des légumineuses demeure marginal.

IV.2.1.2. Induction de l'hypernodulation

L'hypernodulation est une autre alternative envisagée pour améliorer la fixation biologique d'azote des légumineuses. Elle consiste à la formation d'une quantité anormale de nodules, induite par une mutation qui perturbe le mécanisme d'autorégulation de la nodulation chez la légumineuse (Oka-Kira & Kawaguchi, 2006; Magori & Kawaguchi, 2009). L'objectif est d'augmenter les sites de nodulation. Cependant, cette alternative de sélection n'a pas connu un franc succès. En effet, l'abondance de nodule s'accompagne généralement d'une diminution significative de la croissance et de la productivité de la plante, car elle exige un apport accru en photosynthétats. De nombreuses études ont montré une forte réduction du rendement en grains et de la biomasse des mutants hypernodulants en comparaison à ceux des cultivars sauvages chez le soja et le pois (Wu & Harper, 1991; Pracht *et al.*, 1994; Sidorova *et al.*, 2005; Voisin *et al.*, 2013, 2015). Une sélection récurrente sur une population F_6 réalisée à partir des croisements

hypernodulant-cultivar chez le pois a montré une perte de rendement et une diminution de la croissance chez les descendants présentant le phénotype hypernodulant (Sidorova *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'hypernodulation pourrait être également associée à la TSN. Une augmentation de 10 à 20 fois du nombre de nodules et de l'activité de la nitrogénase a été observée chez des mutants hypernodulants de soja par rapport aux cultivars sauvages (Day *et al.*, 1986; Gremaud & Harper, 1989).

IV.2.1.3. Optimisation de la compatibilité légumineuse-*rhizobia*

La compatibilité légumineuse-*rhizobia* est une composante essentielle pour une fixation d'azote efficace. Deux approches globales de sélection ont été employées pour gérer la compatibilité légumineuse-*rhizobia* (Herridge & Rose, 2000) :

- La première approche consiste à cibler la haute promiscuité légumineuse-*rhizobia*. Il s'agit de sélectionner les génotypes capables de noduler et de fixer efficacement l'azote atmosphérique avec un large panel de *rhizobia* indigènes (Kueneman *et al.*, 1984). Chez le soja par exemple, la découverte en Afrique tropicale et en Asie du Sud-Est de plusieurs génotypes à haute promiscuité, a permis aux sélectionneurs de l'International Institute of Tropical Agriculture (IITA) d'introduire ce caractère de promiscuité dans le patrimoine génétique des variétés à haut rendement (Pulver *et al.*, 1982, 1985; Kueneman *et al.*, 1984). Ce programme de sélection a abouti au développement de nouvelles variétés dénommées « Tropical Glycine cross (TGx)», qui ont montré des performances symbiotiques et agronomiques prometteuses dans de nombreux pays africains (Mpepereki *et al.*, 2000; Tefera *et al.*, 2009). L'omniprésence des *rhizobia* dans les sols africains favorise la vulgarisation des cultivars à haute promiscuité, étant donné que ces derniers ne nécessitent pas la production et l'application d'inoculum à grande échelle (Dwivedi *et al.*, 2015). La pertinence du caractère de promiscuité a été également mis en évidence chez d'autres légumineuses cultivées comme le haricot commun, l'arachide et le niébé. Guimarães *et al.* (2012) ont montré que le niébé s'associe avec 62 des 119 *rhizobia* isolés de sols agricoles dans l'Ouest de l'Amazonie au Brésil. Ils ont aussi trouvé que 68% de ces *rhizobia* augmentaient significativement la croissance des plantes de niébé inoculées par rapport au témoin non inoculé. Toutefois, l'information génétique disponible sur le caractère de promiscuité et son utilisation dans les programmes de sélection des légumineuses cultivée restent limités (Gwata *et al.*, 2005).
- La seconde approche cible la spécificité légumineuse-*rhizobia*, on parle de nodulation sélective. Contrairement aux génotypes à haute promiscuité, d'autres génotypes ne fixent efficacement l'azote qu'avec des *rhizobia* spécifiques. Ils nodulent préférentiellement avec les

rhizobia les plus efficaces en excluant les moins efficaces. Généralement, cette approche est avantageuse dans la mesure où les *rhizobia* natifs du sol sont inefficaces et l'inoculation d'une souche efficace est indispensable. Une étude a été menée aux États-Unis sur le criblage de 1600 génotypes de soja pour leur capacité à noduler préférentiellement avec les *rhizobia* indigènes ou avec une souche efficace inoculée USDA110 (Kvien *et al.*, 1981). Cette étude a permis d'identifier plusieurs génotypes, qui ne formaient des nodules et amélioraient leurs rendements en grains que lorsqu'ils étaient inoculés. Yates *et al.* (2008) ont démontré la nodulation sélective chez le trèfle (*Trifolium* sp.), et ont suggéré que la légumineuse limiterait le développement des nodules formés par des *rhizobia* inefficaces. Chez le soja, la nodulation sélective est contrôlée par les gènes *Rj*, et a été exploitée en sélection variétale pour favoriser la nodulation des souches efficaces (Herridge & Rose, 2000). L'identification de génotypes qui recrutent préférentiellement les *rhizobia* très efficaces constitue la principale limite de cette approche. Par ailleurs, la forte prévalence des engrais chimiques dans l'agriculture moderne et les programmes de sélection semble avoir affectée la capacité des cultivars modernes à discriminer les souches efficaces et inefficaces (Goyal *et al.*, 2021).

IV.2.1.4. Techniques moléculaires : sélection assistée par marqueurs et SFA

IV.2.1.4.1. Variabilité génétique des caractères associés à la SFA, héritabilité et relation avec les composantes du rendement

L'étude de la diversité génétique pour un caractère donné, est fondamentale en amélioration variétale. L'estimation de la quantité totale d'azote fixée et d'autres caractères associés à la SFA (activité de la nitrogénase, nombre et poids de nodules, teneur en azote total, teneur en protéines, teneur en chlorophylle, biomasse, etc.) est un préalable essentiel à la détection de la variabilité génétique liée à la SFA chez les légumineuses (Dwivedi *et al.*, 2015). La proportion d'azote total issue de la SFA varie considérablement entre les espèces de légumineuses : en moyenne 40% chez le haricot commun, 63% chez le niébé, et 68% chez l'arachide et le soja (Herridge *et al.*, 2008). Par ailleurs, la contribution potentielle de la SFA à la nutrition azotée des légumineuses pourrait être améliorée de 300% à travers l'amélioration variétale et un meilleur management des exploitations agricoles (Vance, 1998). Certaines études ont mis en évidence la présence d'une variabilité génétique pour les caractères associés à la SFA dans un germoplasme ou entre différents cultivars chez l'arachide cultivée (Tableau II). Ces recherches ont suggéré la possibilité d'exploiter cette diversité génétique afin de sélectionner des cultivars avec un fort potentiel symbiotique. Néanmoins, la SFA est un caractère difficile à cibler dans les programmes d'amélioration variétale. Une sélection récurrente de trois cycles réalisée à

partir d'une population de 200 individus F_2, dérivés d'un croisement entre deux variétés présentant des performances symbiotiques contrastées, n'a pas permis de sélectionner différents caractères liés à la SFA tels que l'activité de la nitrogénase, le nombre et le poids de nodules (Arrendell *et al.*, 1988). La forte dépendance de la SFA aux conditions environnementales pourrait expliquer la faible réponse à la sélection.

La sélection variétale efficace pour un caractère quantitatif donné dépend de son héritabilité, qui se traduit par la variance phénotypique due aux effets additifs de tous les allèles à tous les loci qui contrôlent ce caractère. L'héritabilité au sens large représente la part de variance phénotypique d'origine génétique et elle est estimée en coefficient compris entre 0 et 1. Des études sur la nature héréditaire des caractères liés à la SFA de nombreuses légumineuses cultivées ont révélé des coefficients d'héritabilité élevés, suggérant ainsi que la sélection pour ces caractères serait possible (Provorov & Tikhonovich, 2003). Chez l'arachide, quelques études ont été conduites sur l'héritabilité au sens large des caractères associés à la SFA. Des coefficients d'héritabilité modérés à élevés ont été rapportés pour des caractères comme l'activité de la nitrogénase, la teneur totale en azote, la teneur en azote fixé, la couleur des feuilles (qui traduit la teneur en chlorophylle), le nombre et le poids de nodule (Arrenddell *et al.*, 1985; Pimratch *et al.*, 2004a; Sikinarum *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'analyse des populations F_1 ou F_2 a montré une prédominance de variance génétique additive et non additive pour l'activité de la nitrogénase, le nombre et le poids de nodules, la biomasse, et la teneur en azote totale chez l'arachide (Isleib *et al.*, 1980; Nigam *et al.*, 1985; Phudenpa *et al.*, 2006). Tandis que des interactions épistatiques significatifs ont été rapportées pour le nombre et le poids de nodules, l'activité de la nitrogénase et la biomasse (Phillips *et al.*, 1989). Les aspects génétiques des caractères liés à la SFA varient en fonction du fond génétique de la population ou du germoplasme évalué(e) et des conditions environnementales. La compréhension de la nature des corrélations, d'une part entre les caractères liés à la SFA, et d'autre part avec les composantes du rendement peut fournir des informations utiles en amélioration variétale (Dwivedi *et al.*, 2015). Des coefficients de corrélations positifs et élevés indiquent que la sélection simultanée de plus d'un caractère peut être réalisée en amélioration variétale. Chez l'arachide, plusieurs études ont rapporté des coefficients de corrélations positifs et significatifs entre la quantité d'azote fixé, la teneur en azote total, le nombre et le poids de nodules, l'activité de la nitrogénase, la biomasse et le poids de 100 grains (Arrenddell *et al.*, 1985; Nigam *et al.*, 1985; Phudenpa *et al.*, 2004; Pimratch *et al.*, 2004b). Il serait donc possible de sélectionner simultanément pour les caractères liés à la SFA et les composantes du rendement.

Tableau II. Variabilité des caractères associés à la symbiose fixatrice d'azote chez l'arachide

Germoplasme/cultivars	Réponse à l'inoculation	Références
30 familles dérivées $F_{2:5}/F_{2:6}/F_{2:7}$ et leurs parents NC-6 (Virginia) et 922 (Spanish)	Variation significative de l'activité réductrice de l'acétylène (µmol C_2H_4/plante/h), de la biomasse, du nombre et poids de nodules, avec des coefficients d'héritabilité élevés.	(Arrenddell *et al.*, 1985 ; Arrendell *et al.*, 1986)
6 génotypes parents et 30 descendants F_1	Variation significative de l'activité réductrice de l'acétylène, de la teneur en N total, biomasse aérienne et racinaire, nombre et poids de nodules et surface foliaire. Le génotype NCAc 2821 est le plus performant pour tous les caractères étudiés.	(Nigam *et al.*, 1985)
7 génotypes	Les quantités de N_2 fixé et de N total varient respectivement de 24,14 à 132,20 et de 30,18 à 162,4 mg/plante. Le poids de nodules, la biomasse varient également entre les génotypes.	(Pimratch *et al.*, 2004b)
16 génotypes avec 29 souches de *Bradyrhizobium*	L'activité réductrice de l'acétylène, la biomasse, le nombre, la taille et le poids des nodules varient significativement suivant la spécificité Génotype × *Bradyrhizobium*. Le groupement taxonomique des 16 génotypes en 4 morphotypes reflète la réponse à l'inoculation.	(Alwi *et al.*, 1989)
20 génotypes (diploïdes et tétraploïdes)	Différences significatives de l'activité réductrice de l'acétylène, de la biomasse, du nombre et poids de nodules. Les espèces tétraploïdes (*A. hypogaea* et *A. monticola*) sont plus performantes que les espèces diploïdes.	(Stalker *et al.*, 1994)

IV.2.1.4.2. Identifier les régions du génome associés à la symbiose fixatrice d'azote

La SFA est un processus complexe, qui serait gouverné par plusieurs gènes avec des effets variables (Dwivedi *et al.*, 2007, 2015), et dont la compréhension du mécanisme génétique fournirait des informations importantes aux sélectionneurs. La SFA a été souvent négligée dans les programmes de sélection des légumineuses à cause de sa nature polygénique et de la demande importante en main d'œuvre et en temps nécessaire pour son phénotypage. Cependant, la sélection assistée par marqueurs à travers la cartographie des QTL pourrait être une alternative prometteuse permettant de cibler la SFA dans les programmes de sélection des légumineuses cultivées et d'améliorer les rendements (Dwivedi *et al.*, 2015). Les QTL contrôlant les caractères liés à la SFA ont été identifiés chez plusieurs légumineuses cultivées telles que le soja, le haricot commun, le pois, le niébé et l'arachide (Tableau III). Le soja et le haricot commun sont parmi les légumineuses les plus étudiées, tandis que d'autres légumineuses tropicales comme l'arachide et le niébé sont très peu étudiées, et communément qualifiées « d'orphelines ». Les marqueurs microsatellites (SSR) ont été utilisés dans de nombreuses études chez le soja, pour construire des cartes génétiques et cartographier les QTL associés aux caractères liés à la SFA (la teneur totale en azote, le poids frais et sec de nodules, le poids sec de la plante et l'activité réductrice de l'acétylène) et expliquant 6.5 à 18% des variations phénotypiques (Tanya *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006, 2013; Nicolás *et al.*, 2006). Cependant, ces études ont indiqué la nécessité d'améliorer la faible couverture du génome ~5-50% fournie par les marqueurs SSR, pour une meilleure compréhension des variation phénotypiques de la SFA. Les marqueurs moléculaires SNP qui sont plus dense à travers le génome, ont permis de construire des cartes génétiques hautement résolutives et d'identifier des nouveaux QTL majeurs liés à la SFA (Hwang *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017b, 2019; Huo *et al.*, 2019). Yang *et al.* (2019) ont identifié dans 04 environnements un QTL stable sur le chromosome 16 expliquant jusqu'à 16-59% des variations phénotypiques du nombre et de la taille des nodules. La cartographie de QTL a permis à Zhang *et al.* (2021) d'identifier le locus du *GmNNL1* qui régule la compatibilité soja-*Bradyrhizobium* et de fournir des informations importantes sur le moyen de concevoir de nouvelles interactions légumineuse-*rhizobia* pour une SFA efficace. Chez le haricot commun, les informations disponibles sur la cartographie des régions du génomes impliquées dans le processus de nodulation et leur potentiel utilisation en sélection variétale sont limitées à quelques études (Nodari *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2000; Ramaekers *et al.*, 2013; Kamfwa *et al.*, 2015, 2019; Diaz *et al.*, 2017). Le nombre de nodule a été l'un des premiers caractères de nodulation, à être cartographié chez le haricot commun (Nodari *et al.*, 1993). Ramaekers *et al.* (2013) ont identifié

deux QTL majeurs contribuant à 19-21% des variations phénotypiques du pourcentage et de la quantité totale d'azote fixé. Chaque QTL contient un gène sous-jacent qui code pour un facteur de transcription : le premier est lié aux différences de croissance et d'accumulation d'azote entre les haricots nains et rampants, tandis que le second (domaine AP2/ERF) régule la quantité totale d'azote fixé en champ. La colocalisation des QTL associés au pourcentage d'azote fixé, au poids et à la taille des nodules a été observée chez le haricot commun cultivé en serre et au champ (Kamfwa *et al.*, 2019). Bourion *et al.* (2010) ont également observé une corrélation positive et significative, ainsi qu'une colocalisation des QTL associés aux caractères de croissance racinaire, de nodulation et de pourcentage d'azote fixé chez pois. Des régions du génome impliquées à la fois dans l'architecture racinaire et le processus de nodulation ont été également détectées chez le soja (Yang *et al.*, 2017b). Ces résultats suggèrent que le ciblage des caractères qui favorisent la croissance racinaire pourrait servir à une sélection indirecte de la SFA. L'approche moléculaire a été également investiguée chez les légumineuses modèles *M. truncatula* et *L. japonicus* (Tominaga *et al.*, 2012; Sandal *et al.*, 2012; Stanton-Geddes *et al.*, 2013).

Tous ces travaux de cartographie de QTL/marqueurs moléculaires étroitement associés à des caractères liés à la SFA fournissent des informations essentielles aux sélectionneurs, et peuvent être utilisées pour orienter efficacement les programmes de sélection conventionnelle et augmenter le potentiel symbiotique des nouveaux cultivars par une sélection de l'association *QTL-phénotype de fixation d'azote* dans la descendance. Ces informations contribuent également à la compréhension du mécanisme génétique de SFA et son potentiel transfert aux cultures non légumineuses comme les céréales (Bloch *et al.*, 2020).

Tableau III. QTL associés aux caractères de symbiose fixatrice d'azote chez les principales légumineuses cultivées

Légumineuse	Germoplasme	QTL associés aux caractères de SFA	Références
***Soja** (Glycine max)*	136 RILs (Sj2 × Suwon157) inoculées avec *Bradyrhizobium japonicum* DASA 01026	5,3,4 et 2 QTL associés respectivement au nombre de nodules, au poids sec de nodules, à la biomasse sèche de la plante et l'activité de la nitrogénase	(Tanya *et al.*, 2005)
	157 RILs (Bossier × Embrapa20) inoculées avec *B. japonicum* SEMIA 5079 et *B. elkanii* SEMIA 587	12 QTL liés au nombre de nodules, à la biomasse sèche de la plante et au poids sec de nodules sur les groupes de liaison (GLs) B1, C2, D1b et H	(Santos *et al.*, 2006)
	160 RILs (Embrapa20 × BRS133)	02 QTL contribuant à 7-10% de la variation phénotypique du nombre et du poids sec de nodules	(Nicolás *et al.*, 2006)
	157 RILs (Bossier × Embrapa20) inoculées avec *B. japonicum* SEMIA 5079 et *B. elkanii* SEMIA 587	02 QTL associés au poids sec de la plante sur les GLs E et L, 03 QTL pour le nombre de nodule sur les GLs B1, E et I, et 01 QTL pour le ratio poids/nombre de nodules sur le GL1	(Santos *et al.*, 2013)
	97 RILs (KS4895 × Jackson)	08 QTL liés au nombre de nodule et 05 QTL pour le pois sec de nodules	(Hwang *et al.*, 2014)
	96 RILs [C08 × W05 (soja sauvage)] inoculées avec *B. diazoefficiens* USDA110 et *Sinorhizobium fredii* CCBAU45436	01 QTL associé au poids frais de nodules sur le chromosome 12 et 01 QTL associé à la teneur en uréides sur le chromosome 18	(Muñoz *et al.*, 2016)

Soja (*Glycine max*)	175 RILs (JD12 × NF58) inoculées avec un mélange de 03 souches de *B. elkanii*	24 QTL liés aux caractères de nodulation tels que le nombre, le poids et la taille de nodules sur les chromosomes 6, 10 et 11	(Yang *et al.*, 2017b)
	168 RILs (FC1 × FC2) inoculées avec un mélange de 03 souches de *B. elkanii*	12 QTL associés aux caractères de SFA, dont 02 QTL majeurs (15 à 59 % de la variation phénotypique) qui contrôlent la taille et le nombre de nodules sur les chromosomes 16 et 17	(Yang *et al.*, 2019)
	267 accessions (56 variétés traditionnelles et 211 variétés améliorées) inoculées avec *S. fredii* CCBAU45436	20 QTL associés aux caractères de SFA, dont 03 QTL pour la teneur en azote fixé et 02 QTL pour le poids frais et sec de nodules sur le chromosome 17	(Huo *et al.*, 2019)
	10 variétés cultivées, 150 RILs (Charleston × Dongnong594), et 124 CSSL (Suinong14 × ZYD00006) inoculées avec *S. fredii* HH103	02 QTL associés au nombre et au poids de nodules sur le chromosome 19. Ces QTL contrôlent la reconnaissance des effecteurs bactériens (NopD) qui conditionne la spécificité d'hôte.	(Wang *et al.*, 2020)
	496 accessions (280 variétés traditionnelles et 216 variétés améliorées) inoculées avec *B. diazoefficiens* USDA110	01 QTL sur le chromosome 02 contenant le locus du gène *GmNNL1* qui interagit avec l'effecteur bactérien NopP et régule la compatibilité soja-*Bradyrhizobium*	(Zhang *et al.*, 2021)

Haricot Commun (*Phaseolus vulgaris*)	70 RILs (BAT93 × Jalo EEP558) inoculées avec *R. tropici*	04 QTL associés au nombre de nodules distribués sur les GLs D1, D3 et D7, et contribuant à 50-75% de la variation phénotypique.	(Nodari *et al.*, 1993)
	70 RILs (BAT93 × Jalo EEP558) inoculées avec *R. tropici*	03 QTL liés au nombre de nodules dans des environnements à faible et haute teneur en azote.	(Tsai *et al.*, 1998)
	51 RILs (BAT93 × Jalo EEP558) inoculées avec *R. tropici*	03 et 05 QTL associés au nombre de nodules respectivement dans des conditions de faible et haute teneur en azote. 04 de ces QTL co-localisent avec la résistance au *Xanthomonas axonopodis*	(Souza *et al.*, 2000)
	83 RILs (G2333 × G19839) inoculées avec *R. tropici* CIAT839	04 QTL distribués sur les GLs b01, b04 et b10 ont contribué à une variation phénotypique de 17 à 21 % du pourcentage d'azote fixé en serre. En conditions de champ, 01 QTL a été identifié pour le pourcentage d'azote fixé sur le GL b04 et 01 QTL pour la quantité totale d'azote fixé sur le GL b01 expliquant 19 à 21% variation phénotypique	(Ramaekers *et al.*, 2013)
	259 accessions inoculées avec *R. tropici* CIAT839	03 QTL associés à la quantité d'azote fixé (fanes et graines) identifiés sur les chromosomes Pv03, Pv07 et Pv09	(Kamfwa *et al.*, 2015)
	98 RILs (DOR364 × BAT477) avec *R. tropici* CIAT839	02 QTL liés à au pourcentage d'azote fixé et la teneur en azote des graines ont été identifié sur les chromosomes Pv07 et Pv02	(Diaz *et al.*, 2017)

Haricot Commun (*Phaseolus vulgaris*)	188 RILs (Solwezi × AO-1012-29-3-3A) inoculées avec *R. tropici* CIAT839	03 QTL distribués sur les chromosomes Pv01, Pv04 et Pv09 ont été associés au pourcentage d'azote fixé. 05 QTL pour la quantité d'azote fixé sur les chromosomes Pv04, Pv06, Pv07, Pv09 et Pv11.	(Kamfwa *et al.*, 2019a)
Pois (*Pisum sativum*)	180 $F_{6:8}$ et 153 $F_{6:9}$ RILs (Cameor × Ballet) inoculées avec *R. leguminosarum* bv. *viciea*	26 QTL repartis sur 05 GLs ont été associés aux caractères de nodulation. On dénombre 09, 08, 04 et 03 QTL respectivement pour le nombre de nodules, la taille du nodule, le poids sec de nodules et le ratio poids sec de nodules/poids sec racinaire. 11 des 26 QTL ont été détectés sur le GL I proche du locus du gène *Af* (responsable de la faible teneur en protéines des graines), et contribue pour 9 à 49% de la variation phénotypique	(Bourion *et al.*, 2010)
Niébé (*Vigna unguiculata*)	174 F_2 [BRS Maratoã (fix+) × IC-1 (fix-)] et 175 F_2 [BRS Pujante (fix+) × IC-1 (fix-)] inoculées avec un cocktail de *Bradyrhizobium* sp.	01 QTL majeur détecté sur le GL 4 est associé ~50% de la variation phénotypique du nombre de nodule, la teneur en azote, et la couleur des feuilles et du nodule. Tandis qu'un QTL mineur lié au poids frais de nodule est identifié sur le GL 6.	(Ohlson *et al.*, 2018)
Arachide (*Arachis hypogaea*)	516 F_2 [E5 (fix+) × E4 (fix-)] et 1223 F_2 [E6 (fix+) × E7 (fix-)] inoculées avec une souche de *Bradyrhizobium* sp.	20 QTL distribués sur 16 chromosomes ont été potentiellement associés à une perte de fonction de la nodulation	(Peng *et al.*, 2018)

V. Impact de la domestication et de la sélection variétale sur la symbiose fixatrice d'azote

La domestication est un processus de transformation d'une espèce sauvage en espèce cultivée afin de l'adaptée aux besoins de l'homme (Gross & Olsen, 2010). Les premières modifications visibles communément associées à la domestication sont la taille du fruit et de la graine, la perte de déhiscence du fruit, la perte de la dormance de la graine, la sensibilité à la photopériode ou encore la dormance apicale (Gepts, 2004; Hufford *et al.*, 2013, 2019). Cependant, les modifications sur l'architecture racinaire ou le microbiome de la rhizosphère qui impactent la partie souterraine de la plante sont généralement peu visibles et négligées durant le processus de domestication (Pérez-Jaramillo *et al.*, 2016).

A l'inverse des espèces sauvages des légumineuses qui se développent et envahissent facilement les environnements naturels, leurs variétés améliorées correspondantes sont adaptées aux environnements nécessitant des apports importants en intrants agricoles (Liu *et al.*, 2020). En effet, la transition drastique du milieu naturel aux systèmes de cultures modernes aurait réduit la dépendance des légumineuses cultivées vis-à-vis de la SFA et favorisant la sélection des génotypes plus dépendants de l'azote minéral du sol (Liu *et al.*, 2020; Porter & Sachs, 2020). Bien que la fonction symbiotique ait été conservée, la capacité des variétés cultivées à favoriser les symbiotes bactériens les plus efficaces semble avoir été altérée (Porter & Sachs, 2020). En présence d'un mélange de *rhizobia* efficaces et inefficaces, les espèces sauvages et les variétés traditionnelles ont montré une meilleure aptitude à fixer l'azote que les variétés cultivées, ce qui suggère un impact négatif de la domestication et de la sélection sur le choix du partenaire bactérien (Provorov & Tikhonovich, 2003; Kiers *et al.*, 2007). Cependant, Muñoz *et al.* (2016) ont analysé un panel de génotypes sauvages et cultivés de soja et ont montré que la capacité de fixation d'azote a été améliorée par le processus de domestication. L'impact de la domestication sur la compatibilité légumineuse-*rhizobia* a été étudié chez le soja, le pois et la fève (Mutch & Young, 2004; Kim *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2019). Ces études ont permis de montrer que les espèces sauvages ont une meilleure efficacité symbiotique et une haute promiscuité dans leur interaction avec les souches natives que les variétés cultivées. L'analyse des fréquences alléliques du gène *Rj* qui contrôle la compatibilité soja-*Bradyrhizobium* a révélé une perte de diversité chez le soja cultivé par rapport au soja sauvage (Tang *et al.*, 2014; Sugawara *et al.*, 2019). D'autres études ont mis en évidence la co-évolution entre les *rhizobia* et la domestication des légumineuses. Aguilar *et al.* (2004) ont analysé les souches de *Rhizobium etli* qui nodulent les haricots communs dans les trois centres de domestication potentiels, et ont identifié des polymorphismes dans le gène de nodulation *NodC* qui sont

corrélés avec l'origine géographique. Plus récemment, Greenlon *et al.* (2019) ont démontré la co-évolution des *rhizobia* avec la domestication et la diversification chez le pois chiche.

Bien qu'il soit communément admis que, la domestication associée aux pratiques agricoles modernes auraient considérablement réduit l'efficacité symbiotique des légumineuses cultivées, très peu d'études impliquent la diversité génétique des espèces sauvages afin d'améliorer la fixation biologique d'azote des variétés cultivées.

CHAPITRE 2 : CARTOGRAPHIE DE QTL ASSOCIÉS AUX CARACTÈRES DE SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE CHEZ L'ARACHIDE CULTIVÉE (*Arachis hypogaea* L.) EN UTILISANT UNE POPULATION DE CROISEMENTS INTERSPECIFIQUES

Ce chapitre a fait l'objet d'un article publié dans une revue scientifique, d'une communication orale, et deux posters.

Article :

Nzepang, D.T.; Gully, D.; Nguepjop, J.R.; Zaiya Zazou, A.; Tossim, H.-A.; Sambou, A.; Rami, J.-F.; Hocher, V.; Fall, S.; Svistoonoff, S.; Fonceka, D. **Mapping of QTL Associated with Biological Nitrogen Fixation Traits in Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) Using an Interspecific Population Derived from the Cross between the Cultivated Species and Its Wild Ancestors.** Genes 2023, 14, 797. https://doi.org/10.3390/genes14040797.

Communication orale et Posters :

Title: Mapping of QTL associated with biological nitrogen fixation traits in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using an interspecific population

Communication orale :

- 15ème Rencontre plantes-Bactéries du 24 au 28 janvier 2022 (En ligne).

Posters:

- Conférence Intensification Durable, CID du 23 au 28 novembre 2021, Dakar, Sénégal.
- PhDays/Agapiales du 23 au 25 mai 2022, Montpellier, France.

Résumé

L'arachide (*Arachis hypogaea* L.) est une légumineuse allotétraploïde à graines oléagineuses. En Afrique, elle est principalement cultivée par des petits producteurs, sur des sols dégradés et avec un faible apport en intrants agricoles, ce qui limite considérablement les rendements. Une meilleure compréhension des mécanismes génétiques de la symbiose fixatrice d'azote (SFA) pourrait être une option pertinente afin d'améliorer les rendements en absence d'engrais de synthèse. Nous avons évalué la variation des caractères liés à la symbiose fixatrice d'azote au sein d'une population de 83 lignées de substitution de segments chromosomiques (CSSL) issues du croisement entre un tétraploïde synthétique sauvage AiAd (*Arachis ipaensis* × *Arachis duranensis*)$^{4\times}$ et la variété cultivée Fleur11. Trois traitements ont été testés : sans azote, avec azote et sans azote + inoculé avec la souche *Bradyrhizobium vignae* ISRA400. La teneur en chlorophylle des feuilles et la biomasse totale ont été mesurées pour estimer la SFA. Nous avons identifié pour les deux caractères, des variations significatives spécifiquement liées à la SFA, et 04 QTL (locus de trait quantitatif) stables ont été cartographiés. À tous ces QTL, les allèles sauvages ont entraîné une forte diminution des caractères, indiquant un effet négatif sur l'efficacité symbiotique. Une caractérisation détaillée des CSSL portant ces QTL a montré que les QTL affectaient l'efficacité de la fixation de l'azote, la colonisation et le développement des nodules. Nos résultats fournissent de nouvelles informations sur la génétique de la nodulation de l'arachide, et pourraient être utilisés pour cibler les caractères liés à SFA dans les programmes de sélection de cette espèce.

I. Introduction

L'azote est l'un des nutriments les plus limitants en agriculture. Les plantes de la famille des légumineuses peuvent s'associer avec des bactéries bénéfiques du sol appelées « *rhizobia*», qui réduisent l'azote atmosphérique (N_2) en azote assimilable par la plante en échange d'un apport en carbone (Udvardi & Poole, 2013). La symbiose légumineuse-*rhizobia* aboutie à la fixation biologique de l'azote à l'intérieur d'un nouvel organe, appelé nodule. Cette symbiose fournit environ 40 millions de tonnes d'azote/an dans les systèmes agricoles (Herridge *et al.*, 2008). Dans les exploitations agricoles qui utilisent de faibles quantités d'engrais synthétiques dérivés des combustibles fossiles (Haber-Bosh), la symbiose fixatrice d'azote (SFA) est essentielle à la croissance et la productivité de la légumineuse, mais constitue également de source importante d'azote pour les cultures céréalières associées ou subséquentes (Brooker *et al.*, 2015). Une meilleure compréhension des mécanismes génétiques qui régulent ce processus symbiotique est capitale pour son optimisation et le développement d'une agriculture durable. Cependant, bien

que la SFA soit un processus largement étudié et décrit chez les légumineuses modèles et quelques cultures, les programmes de sélection ont rarement ciblé ce caractère.

La domestication est la sélection, la modification et l'adoption d'espèces de plantes sauvages présentant des caractères d'intérêt pour l'homme (Gepts, 2004). Durant de nombreuses années, environ12 000 espèces de plantes sauvages ont été transformées en plantes cultivées améliorées (Hufford *et al.*, 2019). La domestication associée aux pratiques de l'agriculture moderne a permis d'augmenter considérablement les rendements, mais a également conduit à une forte réduction de la diversité génétique des plantes cultivées par rapport aux plantes sauvages apparentées (Muñoz *et al.*, 2017; Porter & Sachs, 2020). Une conséquence majeure de cette pression de sélection humaine est l'altération des associations plantes-microorganismes bénéfiques du sol, et par conséquent, l'augmentation de la dépendance des cultures aux engrais de synthèse, couteux pour les agriculteurs et néfastes pour l'environnement (Pérez Jaramillo *et al.*, 2016). Mutch & Young (2004) ont montré que chez le pois (*Pisum sativum* L.) et la fève (*Vicia faba* L.), les espèces cultivées ont une faible promiscuité par rapport aux espèces sauvages, dans l'interaction avec les *rhizobia* indigènes. La réduction de la gamme d'hôte a également été observée entre les espèces cultivées et sauvages chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) (Kim *et al.*, 2014) et le soja (*Glycine max* L.) (Chang *et al.*, 2019), ce qui suggère que le processus domestication et la sélection humaine ont affecté la compatibilité de l'interaction légumineuse-*rhizobia*. Kiers *et al.* (2007) ont montré que les anciens cultivars de soja produisent plus de graines que les nouveaux cultivars lorsqu'ils sont infectés par un mélange de *rhizobia* efficaces et inefficaces, ce qui indique que les cultivars plus anciens ont la capacité de sélectionner les partenaires les mieux adaptés à partir d'un pool de *rhizobia* compatibles. Chez le pois, la luzerne (*Medicago sativa* L.) et le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.), les espèces sauvages et les variétés locales ont une meilleure performance symbiotique que les variétés améliorées (Provorov & Tikhonovich, 2003). Ces résultats suggèrent que les espèces sauvages des légumineuses pourraient être utilisées comme réservoirs d'allèles favorables, pour améliorer le potentiel symbiotique de leurs homologues cultivées (Hufford *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2020). En revanche, Muñoz *et al.* (2016) ont rapporté un effet bénéfique de la domestication et de la sélection humaine sur la SFA chez le soja. Ils ont montré que les sojas cultivés ont une meilleure performance symbiotique que les sojas sauvages, et ont observé une faible diversité génétique aux QTL associés à la SFA chez les sojas cultivés. L'impact global de la domestication sur la capacité symbiotique des légumineuses cultivées est difficile à évaluer, car très peu d'informations sont disponibles pour la majorité des espèces.

L'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.) est une légumineuse à graines oléagineuses, qui peut satisfaire jusqu'à 55 à 68% de ses besoins en azote via la SFA (Hardarson, 1993; Herridge *et al.*, 2008), grâce à son interaction avec les *rhizobia* du sol appartenant au genre *Bradyrhizobium* (Jaiswal *et al.*, 2017; Zaiya *et al.*, 2018). Malgré sa faible diversité génétique (Janila *et al.*, 2013), plusieurs études ont rapporté des variations phénotypiques au sein de l'arachide cultivée pour des composantes du rendement et des caractères liés à la SFA tels que le poids et le nombre de nodules, la biomasse, l'activité de la nitrogénase, la teneur en azote total et la quantité d'azote fixé (Wynne *et al.*, 1980; Arrenddell *et al.*, 1985; Nigam *et al.*, 1985; Pimratch *et al.*, 2004a). Ces travaux suggèrent que le potentiel symbiotique de l'arachide cultivée pourrait être amélioré en exploitant la variabilité génétique des caractères associés. Cependant, étant donné que la SFA se produit dans les nodules qui sont des organes souterrains, cela rend son phénotypage fastidieux pour le sélectionneur, et par conséquent, difficile à cibler dans les programmes de sélection. De plus, la SFA est soumise à des variations environnementales, ce qui signifie que des essais sur plusieurs années et dans différentes localités sont nécessaires pour mieux saisir la variation des caractères associés à la SFA. Ces contraintes contribuent à une connaissance limitée des mécanismes génétiques liés à la nodulation chez l'arachide et d'autres espèces de légumineuses. Une caractérisation génétique et morphologique des lignées d'arachide non nodulantes et nodulantes a révélé que, le processus de nodulation est contrôlé par plusieurs gènes (Dutta & Reddy, 1988; Gallo-Meagher *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2018). Des analyses phylogénétiques et de transcriptomes ont montré que les orthologues de presque tous les gènes symbiotiques décrits chez les légumineuses modèles sont présents chez *Arachis* sp. (Griesmann *et al.*, 2018; Karmakar *et al.*, 2018; Roy *et al.*, 2020; Raul *et al.*, 2022). L'arachide appartient au clade des Dalbergioïdes, où les *rhizobia* infectent les racines des plantes de manière intercellulaire par des fissures naturelles appelées «crack», situées à la base des racines latérales (Sprent & James, 2007; Ibáñez *et al.*, 2017b; Quilbé *et al.*, 2022). Les bases moléculaires de ce mode d'infection intercellulaire restent mal connues.

L'arachide est apparue il y a environ 9400 ans à partir d'une hybridation interspécifique entre deux espèces diploïdes sauvages *A. duranensis* (génome A) et *A. ipaensis* (génome B), suivie d'une duplication de chromosomes (Bertioli *et al.*, 2016). Les effets combinés de cet événement unique de tétraploïdisation, de la domestication et de la sélection humaine ont considérablement réduit sa base génétique. Les progrès de la génétique et de la génomique offrent la possibilité, d'exploiter la diversité génétique des espèces sauvages apparentées à l'arachide pour sélectionner de nouveaux allèles favorables pour l'amélioration variétale (Fonceka *et al.*, 2009; Mallikarjuna *et al.*, 2011). Plusieurs populations de croisements interspécifiques ont été

développées et utilisées chez l'arachide pour identifier des QTL liés aux composantes du rendement, à la résistance aux maladies, à la qualité de l'huile et à la morphologie de la plante (Fonceka *et al.*, 2012a; b; Khera *et al.*, 2019; Tossim *et al.*, 2020). Cependant, à notre connaissance, les populations de croisements interspécifiques n'ont pas été exploitées pour étudier l'apport des allèles d'espèces sauvages sur la SFA.

Dans ce chapitre, nous avons utilisé une population de lignées substitutions de segments chromosomiques (CSSL) issue du croisement entre une variété d'arachide cultivée, et un tétraploïde synthétique sauvage combinant les génomes des ancêtres diploïdes sauvages les plus probables de l'arachide cultivée pour cibler les caractères liés à la SFA. Les associations génotype × phénotype ont permis d'identifier des QTL associés aux caractères de SFA. Nos résultats fournissent de nouvelles informations sur la génétique de la nodulation de l'arachide et des informations utiles pour les programmes de présélection variétale.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal

Un sous-ensemble de 83 CSSL a été sélectionné parmi une population de 122 CSSL (BC_4F_3) développée au centre d'études régional de recherche pour l'amélioration de l'adaptation à la sécheresse (CERAAS). Ces CSSL dérivent d'un croisement interspécifique entre la variété cultivée Fleur11, utilisée comme parent femelle et le tétraploïde synthétique sauvage AiAd qui combine les génomes de [*A. ipaensis* KG30076 (génome BB) × *A. duranensis* V14167 (génome AA)]$^{4\times}$, utilisé comme parent mâle (Fonceka *et al.*, 2012b). Fleur11 est une variété de type Spanish de cycle court (90 jours) cultivée en Afrique de l'Ouest pour ses performances agronomiques et sa tolérance modérée à la sécheresse. Les CSSL sélectionnées constituent l'ensemble minimal de lignées qui offrent une couverture génomique optimale. Les introgressions sauvages ont une longueur moyenne d'environ 39,2 cM et couvrent environ 88,7 % de la carte génétique. Les informations concernant le génotypage et les marqueurs moléculaires utilisés dans le développement de cette population sont déjà publiées et disponibles (Fonceka *et al.*, 2012b).

II.2. Phénotypage de la population CSSL pour les caractères liés à la SFA

L'efficacité symbiotique de 83 CSSL et leur parent récurrent Fleur11 (utilisé comme référence) a été évaluée sous ombrière en décembre 2017 et mars 2018 au Sénégal. Les graines ont été désinfectées à l'hypochlorite de calcium, et mises en germination sur milieu eau gélosée dans des boîtes de Pétri à l'obscurité. Les graines germées ont été transférées manuellement dans des

pots contenant environ 350 g de terreau lessivé, stérile et pauvre en azote comme décrit par Zaiya *et al.* (2018). Trois traitements ont été appliqués : (i) sans azote (témoin négatif ou -N), où aucun apport externe d'azote n'a été ajouté au substrat ; (ii) avec de l'azote (témoin positif ou +N), où l'équivalent de 100 kg/ha d'urée a été appliqué en deux temps (à une et six semaines) dans chaque pot ; (iii) sans azote + inoculé, où 5 ml d'un inoculum de la souche *Bradyrhizobium vignae* ISRA400 (-N + ISRA400) ont été ajoutés à chaque pot. ISRA400 est une souche bactérienne efficace, isolée des nodules d'arachide cultivée au Sénégal (Zaiya *et al.*, 2018). L'inoculum a été produit en cultivant les bactéries dans un milieu mannitol-extrait de levure (Vincent, 1970) à l'obscurité pendant 4 jours à 28°C, et sous agitation à 250 rpm, jusqu'à l'obtention d'une suspension cellulaire avec une absorbance d'environ 0,7 à 600 nm. L'inoculum a été appliqué une semaine après le transfert des graines germées en pots. Le dispositif expérimental utilisé était un alpha-lattice avec, 3 répétitions et 06 blocs de 15 génotypes par répétition. Le facteur étudié était le « génotype » avec 90 niveaux (83 CSSL et le parent récurrent Fleur11 répété 7 fois), soit 270 plantes par traitement.

Dans chaque traitement, la teneur en chlorophylle des feuilles et la biomasse sèche totale ont été évaluées. La teneur en chlorophylle a été indirectement estimée chaque semaine, sur la troisième feuille la plus jeune, à l'aide d'un SPAD (soil plant analysis development; Konica-Minolta). Après neuf semaines, les plantes ont été récoltées et séchées à 65°C pendant 72 heures avant de peser la biomasse sèche totale.

II.3. Analyses statistiques et cartographie de QTL

Les statistiques descriptives (moyenne et écart-type) ont été calculées pour chaque caractère et chaque traitement dans les deux expérimentations. La normalité et l'homogénéité de la variance ont été vérifiées respectivement avec les tests de Kolmogorov-Smirnov et de Levene. Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée pour chaque expérimentation afin d'estimer les effets génotype et répétition sur chaque caractère à l'aide d'un modèle linéaire standard :

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + r_j + b_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

où Y_{ijk} = valeur observée du génotype i, dans la répétition j et le bloc k ; μ = valeur moyenne de la population ; G_i = effet du génotype i ; r_j = effet de la répétition j ; b_{jk} = effet du bloc k dans la répétition j ; ε_{ijk} = erreur résiduelle.

Les estimations de l'héritabilité au sens large ont été calculées pour chaque traitement dans chaque environnement à l'aide de la formule :

$$h^2 = 1- (1 / F)$$

où F est la F-value associée à l'effet génotype dans l'ANOVA (Kung & Bey, 1977).

Lorsqu'un effet génotype significatif a été trouvé pour un caractère donné, chaque CSSL a été comparée au parent récurrent Fleur11 en utilisant le test de comparaisons multiples de Dunnett au seuil de 5% avec le package multcomp du logiciel R (Hothorn *et al.*, 2008), comme décrit par Fonceka *et al.* (2012b). Lorsqu'une CSSL donnée qui porte un seul segment chromosomique sauvage (c'est-à-dire le segment sauvage cible), a montré une différence significative par rapport à Fleur11, nous avons supposé que la différence soit liée à la présence du segment sauvage et par conséquent qu'au moins un QTL est situé dans le segment sauvage. Lorsqu'une lignée donnée porte le segment sauvage cible et d'autres segments ailleurs dans le génome, l'attribution de QTL a été effectuée en deux étapes. Nous avons d'abord comparé le phénotype de la lignée avec les lignées voisines qui ont des fragments qui se chevauchent. Si les phénotypes sont similaires, le QTL a été affecté au segment de chromosome sauvage cible. Si les phénotypes sont différents, la comparaison a été faite avec des lignées qui portent des régions similaires ailleurs dans le génome. Dans certains cas particuliers, la comparaison génotype-phénotype n'a pas permis d'attribuer sans ambiguïté le QTL dans un fragment sauvage, donc le QTL a été considéré comme putatif et a été associé à tous les fragments de chromosomes sauvages présents dans cette lignée.

L'effet QTL pour un caractère donné a été calculé suivant la formule ci-dessous (Fonceka *et al.*, 2012b) :

$$Effet\ QTL\ (\%) = \frac{Moyenne\ (CSSL) - Moyenne\ (Fleur11)}{Moyenne\ (Fleur11)} \times 100$$

II.4. Analyses cytologiques des nodules

Une analyse cytologique a été réalisée afin de décrire l'effet QTL sur la forme, la structure et le fonctionnement des nodules. Des nodules frais obtenus en conditions contrôlées, ont été prélevés et inclus dans de la gélose à 4%, avant d'être coupés à une épaisseur de 80 µm à l'aide d'un vibratome (Leica Biosystems VT1000S, Allemagne). Les coupes obtenues ont été incubées successivement dans les solutions de colorations live/dead (5 µM SYTO 9 et 30 µM iodure de propidium dans 50 mM de tampon Tris pH 7.0; live/dead BacLight, Invit-rogen, Carlsbad, CA, USA) pendant 15 min, et de calcofluor white M2R (0,01 % wt/vol dans 10 mM tampon de phosphate salin, Sigma, Munich, Allemagne) pendant 15 min à l'obscurité (Nagata & Takebe, 1970). Par la suite, les sections colorées ont été montées entre lames et lamelles dans une goutte de tampon phosphate salin-glycérol (vol/vol), avant d'être observées à l'aide d'un

microscope confocal à balayage laser LSM 700 (Carl Zeiss, Allemagne). Le SYTO9 et l'iodure de propidium ont été excités à 488 et 555 nm respectivement, pour une gamme d'émission de 490-522 nm et 555-700 nm. Pour le calcofluor, l'excitation a été réalisée à 405 nm et la gamme d'émission a été de 405 à 470 nm. Pour décrire la structure des nodules, les sections de nodules ont été également observées au microscope à contraste interférentiel AZ (Nikon, Japon), équipé d'une caméra DS-Ri2.

III. Résultats

III.1. Variations phénotypiques des caractères liés à la SFA au sein de la population CSSL en conditions semi-contrôlées

Afin d'étudier les variations phénotypiques associées spécifiquement à la SFA, la population CSSL a été cultivée sous ombrière suivant trois traitements (-N : sans azote, +N : avec azote et -N+ISRA400 : sans azote + inoculé avec *B. vignae* ISRA400), et deux caractères liés à SFA, à savoir la teneur en chlorophylle des feuilles et à la biomasse totale, ont été évalués. L'expérimentation a été menée dans deux environnements consécutifs (décembre 2017 et mars 2018). Nous avons observé une diminution progressive de la teneur moyenne en chlorophylle des feuilles dans le traitement témoin négatif (-N), tandis que la teneur en chlorophylle est restée quasiment constante dans le traitement témoin positif (+N) (Figure 12). Dans le traitement inoculé (-N + ISRA400), la teneur en chlorophylle des feuilles a diminué au cours des trois premières semaines et a commencé à augmenter 4 semaines après l'inoculation, indiquant l'établissement d'une interaction symbiotique efficace, qui a fourni de l'azote aux plantes (Figure 12). Les plantes fertilisées et inoculées ont produit plus de biomasse par rapport aux plantes du traitement -N (Tableau IV). Les résultats de l'ANOVA ont montré un effet génotype significatif pour la teneur en chlorophylle uniquement dans les traitements +N et -N+ISRA400, tandis que pour la biomasse totale, un effet génotype significatif a été observé dans tous les traitements (Tableau IV). L'héritabilité au sens large a été estimée pour chaque caractère, et dans chaque environnement. Nous avons observé des estimations d'héritabilité au sens large nulles, modérées et élevées pour la teneur en chlorophylle, respectivement dans les traitements -N, +N et -N+ISRA400, dans les deux environnements. Pour la biomasse totale, une héritabilité modérée a été trouvée dans tous les traitements dans les deux environnements (Tableau IV).

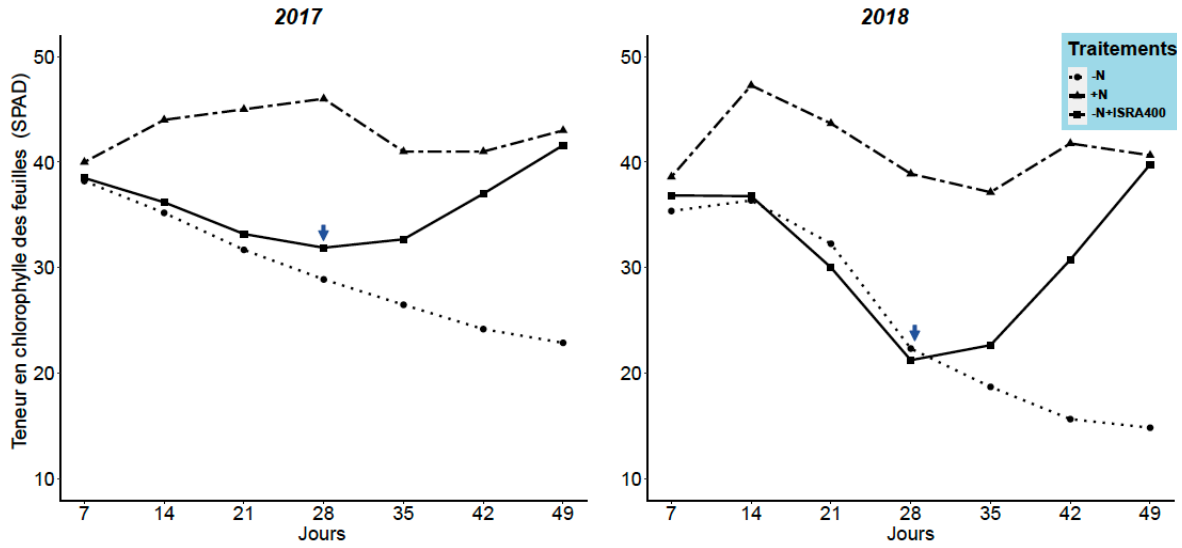


Figure 12. Cinétique de la teneur en chlorophylle des feuilles au sein de la population CSSL Les traitements -N et +N sont respectivement des témoins négatifs (sans azote) et positifs (avec urée). Le traitement inoculé -N+ISRA400 : sans azote + *B. vignae* ISRA400. La flèche indique le début de la symbiose fixatrice d'azote efficace.

Tableau IV : Statistiques descriptives et héritabilité au sens large dans les expérimentations 2017 et 2018 pour les caractères liés à la SFA : teneur en chlorophylle et biomasse totale

Caractère	Traitement	2017				2018			
		Moy±SD	F	Pr	h^2	Moy±SD	F	Pr	h^2
SPAD	-N	26.2±7.82	1.017	0.456	0	14.8±5.10	1	0.583	0
	+N	43.5±3.79	1.742	0.001**	0.43	40.6±2.06	2	<0.001***	0.50
	-N+ISRA400	41.6±6.42	3.843	<0.001***	0.74	39.8±6.48	11.358	<0.001***	0.91
TB	-N	2.88±1.26	1.611	0.005**	0.38	2.69±0.96	2.486	<0.001***	0.60
	+N	5.75±1.62	1.310	0.073	0.24	7.98±2.07	1.446	0.023*	0.30
	-N+ISRA400	4.36±1.63	2.324	<0.001***	0.57	3.90±1.47	1.979	<0.001***	0.49

SPAD : Teneur en chlorophylle des feuilles 49 jours après inoculation ; TB : Biomasse totale (g) ; -N : sans azote ; +N : avec de l'azote ; -N+ISRA400 : sans azote + inoculé avec *B. vignae* ISRA400 ; Moy : moyenne ; SD : écart type ; F : F-value associée à l'effet génotype : Pr : *p*-value associée à l'effet fixe génotype, h^2 : héritabilité au sens large. *, **, et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$.

III.2. Cartographie de QTL

III.2.1. Significativité des associations génotype × phénotype

Pour identifier les associations génotype × phénotype significatives dans chaque environnement, les CSSL ont été comparées à Fleur11. Nous avons considéré qu'une

association génotype × phénotype significative était spécifiquement liée à la symbiose fixatrice d'azote, lorsqu'elle n'a pas été observée dans les traitements témoins.

III.2.1.1. Teneur en chlorophylle

Dans l'environnement 2017, le test de Dunnett a révélé que 06 lignées, qui ont montré une teneur en chlorophylle des feuilles significativement inférieure à celle de Fleur11 dans le traitement inoculé (-N+ISRA400), tandis que dans les traitements témoins négatif (-N) et positif (+N), aucune différence significative a été observée (Figure 13). Les différences relatives entre ces lignées et Fleur11 variaient entre -24.61 et -65.29 % (Tableau V). Lorsque l'expérimentation a été répétée en 2018, un total de 08 lignées a montré une teneur en chlorophylle des feuilles significativement inférieure à celle de Fleur11 dans le traitement inoculé (Figure 14). Les différences relatives entre ces lignées et Fleur11 étaient comprises entre -15.17 et -73.49 %. Une lignée (12CS_010) avait une teneur en chlorophylle significativement plus élevée par rapport à Fleur11 dans le traitement +N (Tableau VI).

III.2.1.2. Biomasse totale

La comparaison de la biomasse totale entre les CSSL et Fleur11 en 2017, a montré que 06 lignées avaient une biomasse significativement plus petite que celle de Fleur 11 dans le traitement -N, et 26 lignées dans le traitement inoculé (Figure 15). Cependant, parmi les lignées détectées dans le traitement inoculé, trois lignées (12CS_004, 12CS_042, 12CS_098) ont également été retrouvées dans le traitement sans azote. Enfin, un total de 23 lignées a été identifié uniquement dans le traitement inoculé, avec des différences relatives comprises entre -39.73 et -71.51 % (Tableau V). En 2018, des différences significatives ont également été constatées entre plusieurs lignées et Fleur11 : 23 lignées dans le traitement -N, 01 lignée dans le traitement +N et 09 lignées dans le traitement inoculé (Figure 16). Parmi les 09 lignées détectées dans le traitement inoculé, quatre (12CS_004, 12CS_034, 12CS_118, 12CS_081) ont également été identifiées dans le traitement -N. Finalement, 05 lignées ont été identifiées uniquement dans le traitement inoculé, avec des différences relatives comprises entre -55.10 et -60.58% (Tableau VI).

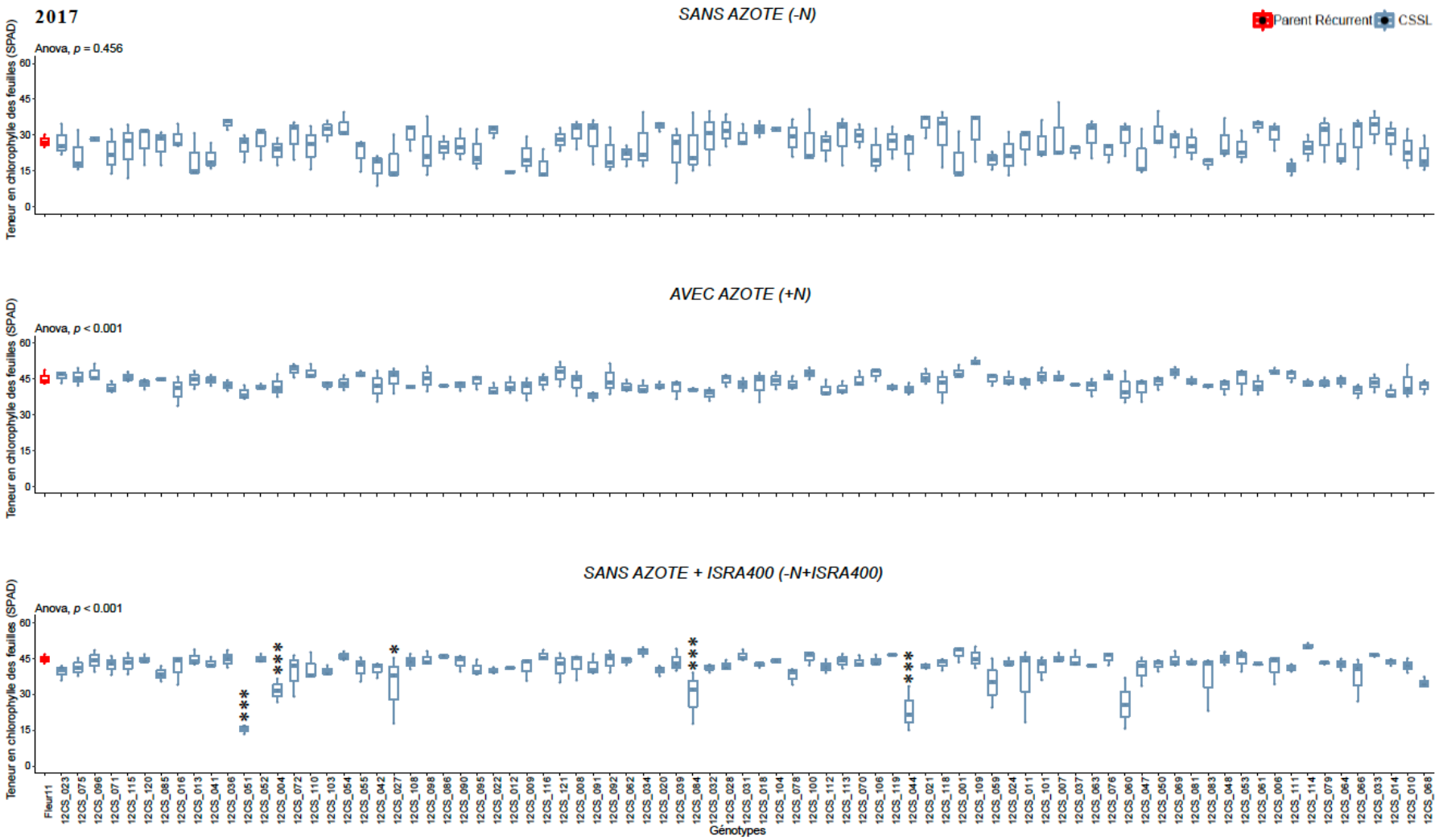


Figure 13. Comparaisons des associations génotype × teneur en chlorophylle entre Fleur11 et les CSSL dans l'environnement de 2017 -N et +N et avec azote indiquent respectivement des témoins négatifs et positifs. -N+ISRA400 correspond au traitement inoculé avec la souche *Bradyrhizobium vignae* ISRA400. *, **, et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$ avec le test de comparaisons multiples de Dunnett.

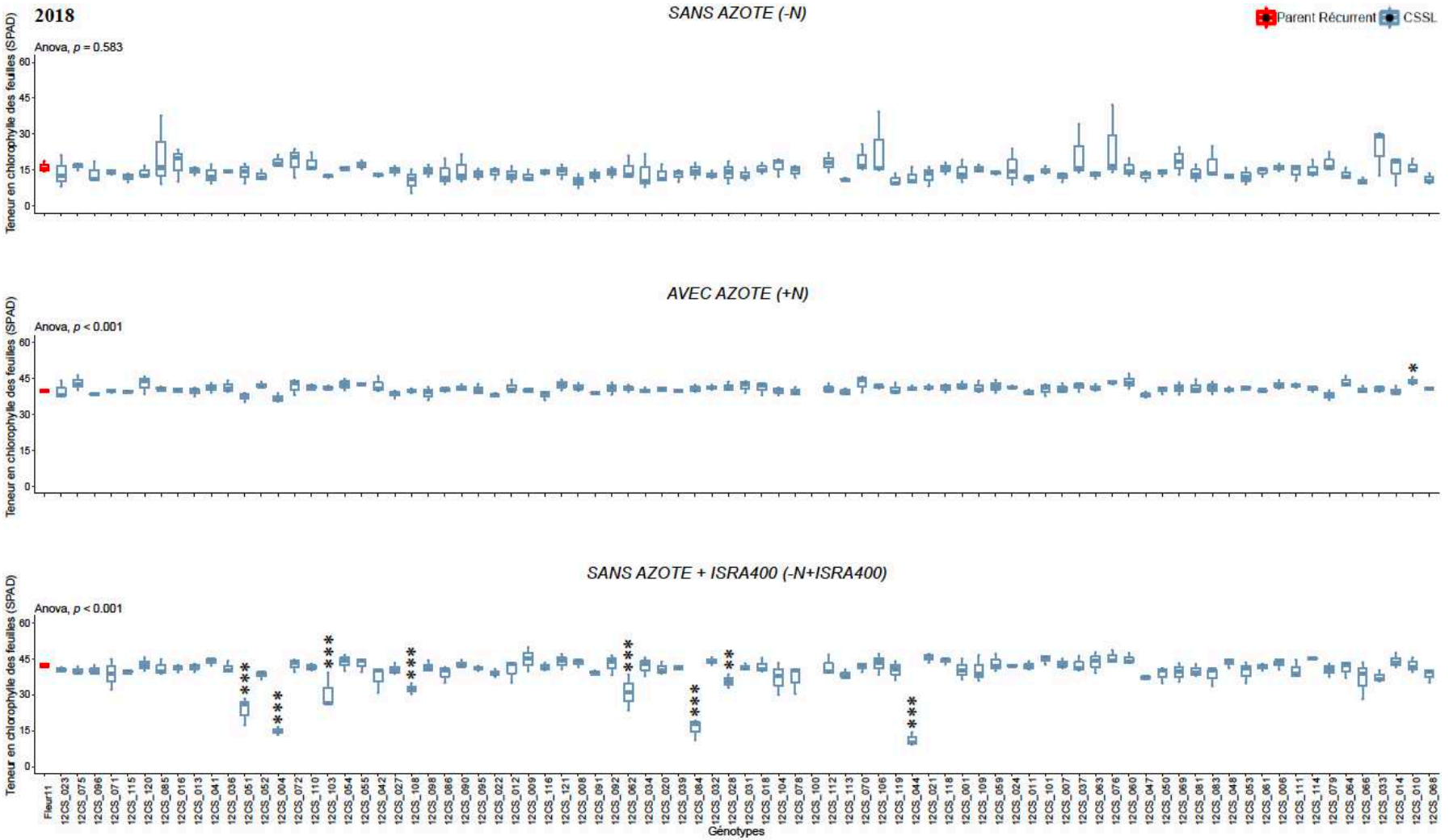


Figure 14. Comparaisons des associations génotype × teneur en chlorophylle observées entre Fleur11 et les CSSL dans l'environnement de 2018 -N et +N et avec azote indiquent respectivement des témoins négatifs et positifs. -N+ISRA400 correspond au traitement inoculé avec la souche *Bradyrhizobium vignae* ISRA400. *, **, et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$ avec le test de comparaisons multiples de Dunnett.

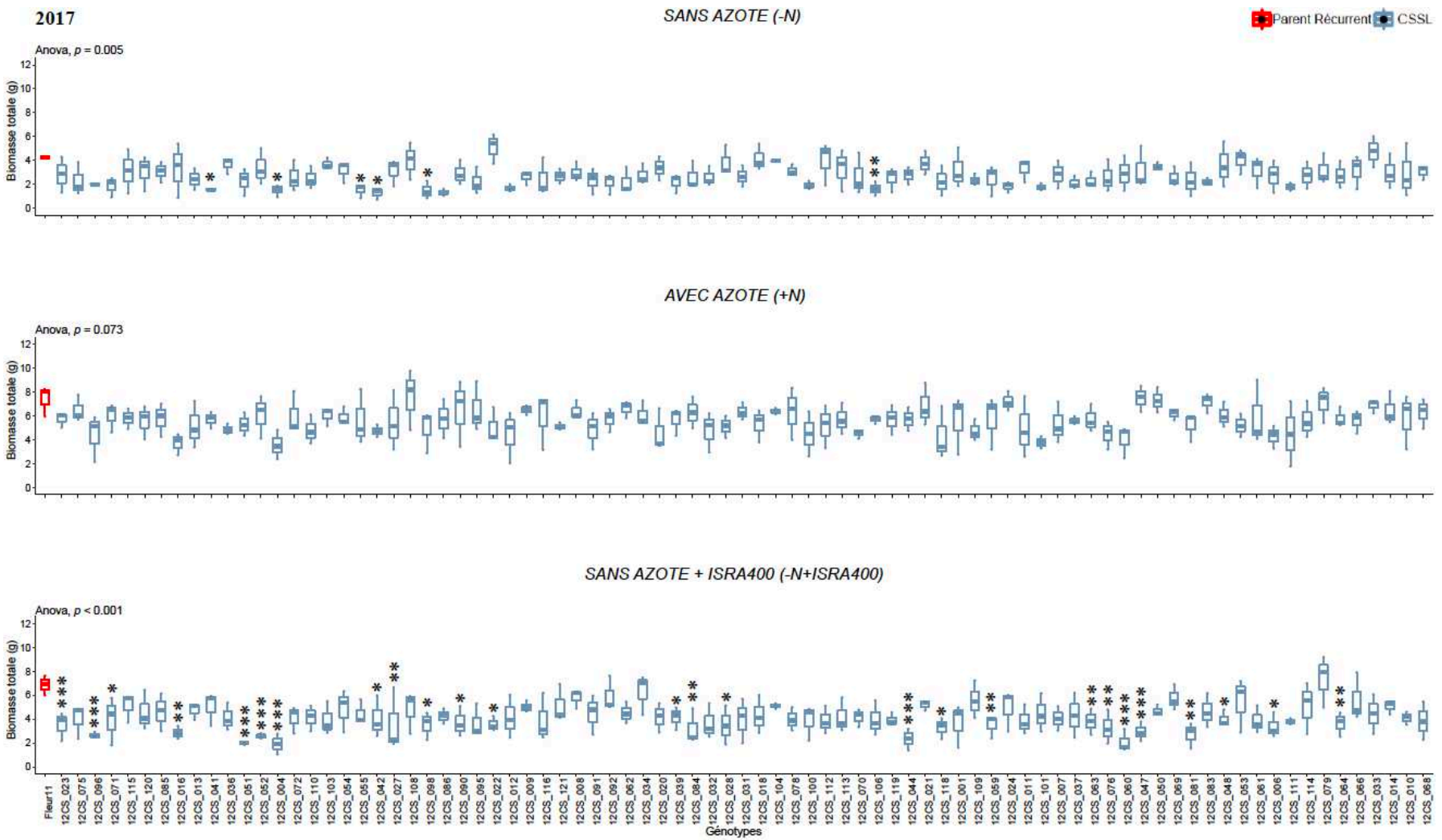


Figure 15. Comparaisons des associations génotype × biomasse totale observées entre Fleur11 et les CSSL dans l'environnement de 2017 -N et +N et avec azote indiquent respectivement des témoins négatifs et positifs. -N+ISRA400 correspond au traitement inoculé avec la souche *Bradyrhizobium vignae* ISRA400. *, **, et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$ avec le test de comparaisons multiples de Dunnett.

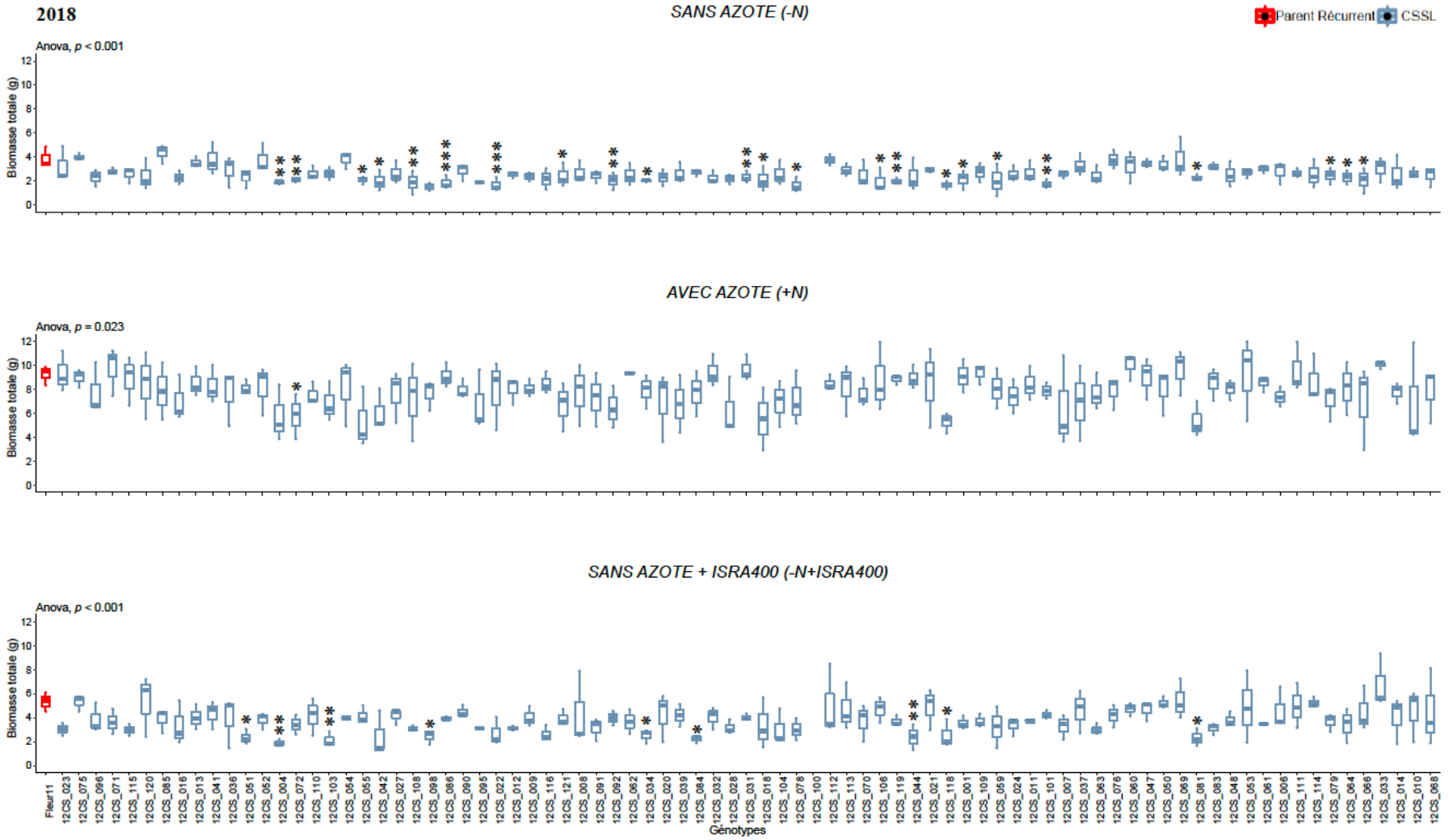


Figure 16. Comparaisons des associations génotype × biomasse totale observées entre Fleur11 et les CSSL dans l'environnement de 2018 -N et +N et avec azote indiquent respectivement des témoins négatifs et positifs. -N+ISRA400 correspond au traitement inoculé avec la souche *Bradyrhizobium vignae* ISRA400. *, **, et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$ avec le test de comparaisons multiples de Dunnett.

Tableau V : Associations génotype × phénotype significatives identifiées dans tous les traitements dans l'environnement de 2017

CSSL	GL	SPAD			TB		
		Effet QTL (%)			Effet QTL (%)		
		-N	+N	-N+ISRA400	-N	+N	-N+ISRA400
12CS_023	A01	ns	ns	ns	ns	ns	-48.76**
12CS_096	A01	ns	ns	ns	ns	ns	-61.13***
12CS_071	A01	ns	ns	ns	ns	ns	-41.65*
12CS_016	A01, **B10**	ns	ns	ns	ns	ns	-58.32**
12CS_041	A02	ns	ns	ns	-63.18*	ns	ns
12CS_051	A02, **A08**, **B02**	ns	ns	-65.29***	ns	ns	-71.51***
12CS_052	A02, **B11**	ns	ns	ns	ns	ns	-62.55***
12CS_004	A03	ns	ns	-29.23***	-64.24*	ns	-71.95***
12CS_055	A03	ns	ns	ns	-64.46*	ns	ns
12CS_042	A03	ns	ns	ns	-69.46*	ns	-41.04*
12CS_027	A04, **A07**, **B01**, **B02**	ns	ns	-24.61*	ns	ns	-47.38**
12CS_098	A04	ns	ns	ns	-65.18*	ns	-48.53*
12CS_090	A04, **A09**	ns	ns	ns	ns	ns	-45.74*
12CS_022	A05	ns	ns	ns	ns	ns	-47.87*
12CS_039	A08, **B11**	ns	ns	ns	ns	ns	-39.73*
12CS_084	A08, **A01**	ns	ns	-33.79***	ns	ns	-53.28**
12CS_028	A09, **B10**	ns	ns	ns	ns	ns	-49.2*
12CS_106	B01	ns	ns	ns	-61.4**	ns	ns
12CS_044	B02	ns	ns	-47.89***	ns	ns	-66.09***
12CS_118	B03, **A06**, **A09**	ns	ns	ns	ns	ns	-52.02*
12CS_059	B04	ns	ns	ns	ns	ns	-49.12**
12CS_063	B06, **B10**	ns	ns	ns	ns	ns	-44.63**
12CS_076	B06	ns	ns	ns	ns	ns	-52.02**
12CS_060	B06, **B08**, **A07**	ns	ns	-41.77***	ns	ns	-69.63***
12CS_047	B06	ns	ns	ns	ns	ns	-57.13***
12CS_081	B07	ns	ns	ns	ns	ns	-60.27**
12CS_048	B07	ns	ns	ns	ns	ns	-41.04*
12CS_006	B08, **A01**, **B03**	ns	ns	ns	ns	ns	-50.57*
12CS_064	B10	ns	ns	ns	ns	ns	-47.1**

Les effets QTL de SPAD (teneur en chlorophylle des feuilles) et de TB (biomasse totale) représentent la différence relative entre les CSSL et Fleur11. GL indique le groupe de liaison qui porte le segment de chromosome sauvage responsable du phénotype. *, ** et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$ en utilisant le test de comparaisons multiples de Dunnett, ns : non significatif.

Tableau VI : Associations génotype × phénotype significatives identifiées dans tous les traitements dans l'environnement de 2018

CSSL	GL	SPAD			TB		
		Effet QTL (%)			Effet QTL (%)		
		-N	+N	-N+ISRA400	-N	+N	-N+ISRA400
12CS_051	A02, **A08**, **B02**	ns	ns	-43.26***	ns	ns	-56.43*
12CS_004	A03	ns	ns	-64.77***	-52.79**	ns	-64.68**
12CS_072	A03	ns	ns	ns	-47.01**	-37.21*	ns
12CS_103	A03, **A08**	ns	ns	-26.76***	ns	ns	-60.58**
12CS_055	A03	ns	ns	ns	-47.11*	ns	ns
12CS_042	A03	ns	ns	ns	-49.57*	ns	ns
12CS_098	A04	ns	ns	ns	ns	ns	-55.10*
12CS_108	A04, **B01**	ns	ns	-22.79***	-52.34**	ns	ns
12CS_086	A04	ns	ns	ns	-53.54***	ns	ns
12CS_022	A05	ns	ns	ns	-57.96***	ns	ns
12CS_121	A06, **A10**, **B03**, **B08**	ns	ns	ns	-38.63*	ns	ns
12CS_092	A07	ns	ns	ns	-48.64**	ns	ns
12CS_062	A07, **B10**	ns	ns	ns	ns	ns	-26.32***
12CS_034	A07, **A03**	ns	ns	ns	-48.37*	ns	-52.76*
12CS_084	A08, **A01**	ns	ns	-61.67***	ns	ns	-58.35*
12CS_028	A09, **B10**	ns	ns	-15.17**	ns	ns	ns
12CS_031	A09, **B10**	ns	ns	ns	-41.45**	ns	ns
12CS_018	A09	ns	ns	ns	-46.44*	ns	ns
12CS_078	A10, **B03**	ns	ns	ns	-58.57***	ns	ns
12CS_106	B01	ns	ns	ns	-49.52*	ns	ns
12CS_119	B02, **A01**	ns	ns	ns	-49.9**	ns	ns
12CS_044	B02	ns	ns	-73.49***	ns	ns	-55.36**
12CS_118	B03, **A06**, **A09**	ns	ns	ns	-57.93*	ns	-53.04*
12CS_001	B03, **B01**	ns	ns	ns	-45.65*	ns	ns
12CS_059	B04	ns	ns	ns	-48.5*	ns	ns
12CS_101	B05, **A08**	ns	ns	ns	-55.69**	ns	ns
12CS_081	B07	ns	ns	ns	-41.91*	ns	-57.06*
12CS_079	B09, **A10**, **B03**	ns	ns	ns	-37.94*	ns	ns
12CS_064	B10	ns	ns	ns	-41.47*	ns	ns
12CS_066	B10	ns	ns	ns	-47.23*	ns	ns
12CS_010	B11	ns	0.1*	ns	ns	ns	ns

Les effets QTL de SPAD (teneur en chlorophylle des feuilles) et de TB (biomasse totale) représentent la différence relative entre les CSSL et Fleur11. GL indique le groupe de liaison qui porte le segment de chromosome sauvage responsable du phénotype. *, ** et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$ en utilisant le test de comparaisons multiples de Dunnett, ns : non significatif.

III.2.2. Cartographie de QTL

Toutes les associations significatives détectées uniquement dans le traitement inoculé (-N+ISRA400) ont été utilisées pour la cartographie de QTL dans chaque environnement. Dans l'environnement de 2017, 08 QTL ont été associés à la teneur en chlorophylle des feuilles (Tableau VII). Un QTL a été localisé sans ambiguïté sur chacun des groupes de liaison (GL) A02, A03, A04, A08 et B02 (Figure 17). Dans certains cas particuliers, nous n'avons pas été en mesure d'associer sans ambiguïté le QTL à un seul segment de chromosome sauvage, par conséquent, le QTL a été considéré comme putatif, et a été associé à tous les fragments présents dans cette lignée. C'est par exemple le cas de la lignée 12CS_060 qui possède des fragments de chromosomes sauvages qui se chevauchent avec ceux d'autres lignées sur les GLs A07, B06 et B08 (Figure 17). En 2018, onze régions génomiques réparties sur 09 GLs ont été identifiées (Tableau VII). Un QTL a été clairement cartographié sur chacun des GLs A02, A03, A07, A08 et B02 (Figure 17). Six QTL sur les GLs A03, A04, A08, A09, B01 et B10 ont été considérés comme putatifs. Finalement, 04 QTL situés sur les GLs A02, A03, A08 et B02 ont été cartographiés de manière constante dans les deux environnements. Concernant la biomasse totale, les associations génotype × biomasse dans l'environnement de 2017 ont permis d'identifier 20 QTL localisés sur quinze groupes de liaison (Tableau VII). Trois QTL ont été cartographiés sur le GL A01, deux sur le GL B07 et un QTL sur chacun des GLs A02, A05, A08, B02, B02, B04, B06, B08, B10 et B11 (Figure 17). 06 QTL ont été considérés comme putatifs, deux QTL putatifs sur le GL A09 et un QTL sur chacun des GLs A04, A06, B03 et B10. Dans l'environnement de 2018, 06 QTL localisés sur 05 GLs ont été identifiés (Tableau VII). Un QTL a été cartographié sans ambiguïté sur chacun des GLs A02, A08 et B02 (Figure 17). Tandis que 03 QTL situés sur les GLs A03, A04 et A08 ont été considérés comme putatifs. Finalement, 03 QTL sur les GLs A02, A08 et B02 ont été systématiquement identifiés dans les deux environnements.

Au total, 15 QTL ont été détectés pour la teneur en chlorophylle des feuilles, et 25 QTL pour la biomasse totale dans les deux expérimentations (Tableau VII).

Tableau VII : Récapitulatif des associations génotype × phénotype significatives et des QTL identifiés pour le traitement inoculé dans les environnements de 2017 et 2018

Caractère	CSSL	GL	2017		2018	
			Effet QTL (%)	Int. Conf. (cM)	Effet QTL (%)	Int. Conf. (cM)
SPAD	12CS_051	A02	-65.29***	43.85-55.35	-43.26***	43.85-55.35
	12CS_004	A03	-29.23***	0-16.6	-64.77***	0-16.6
	12CS_103	A03	ns	.	-26.76***	57.2-74.2
	12CS_027	A04	-24.61*	0-48.975	ns	.
	12CS_108	A04	ns	.	-22.79***	48.975-90.975
	12CS_060	A07	-41.77***	12.1-28.525	ns	.
	12CS_062	A07	ns	.	-26.32***	28.525-60.0
	12CS_084	A08	-33.79***	75.525-85.375	-61.67***	75.525-85.375
	12CS_103	A08	ns	.	-26.76***	46.15-75.525
	12CS_028	A09	ns	.	-15.17**	7.125-49.375
	12CS_108	B01	ns	.	-22.79***	66.725-87.525
	12CS_044	B02	-47.89***	24.55-43.25	-73.49***	24.55-43.25
	12CS_060	B06	-41.77***	16.275-50.95	ns	.
	12CS_060	B08	-41.77***	5.25-21.25	ns	.
	12CS_028	B10	ns	.	-15.17**	48.025-55.525
TB	12CS_023	A01	-48.76**	0-9.675	ns	.
	12CS_096	A01	-61.13***	42.325-47.7	ns	.
	12CS_071	A01	-41.65*	42.325-47.7	ns	.
	12CS_016	A01	-58.32**	111.125-119.975	ns	.
	12CS_051	A02	-71.51***	55.35-63.125	-56.43*	43.85-55.35
	12CS_052	A02	-62.55***	55.35-63.125	ns	.
	12CS_103	A03	ns	.	-60.58**	57.2-74.2
	12CS_027	A04	-47.38**	90.975-113.15	ns	.
	12CS_090	A04	-45.74*	90.975-113.15	ns	.
	12CS_098	A04	ns	.	-55.10*	57.625-90.975
	12CS_022	A05	-47.87*	0-46.8	ns	.
	12CS_118	A06	-52.02*	29.825-43.925	ns	.
	12CS_084	A08	-53.28**	75.525-85.375	-58.35*	75.525-85.375
	12CS_103	A08	ns	.	-60.58**	46.15-75.525
	12CS_028	A09	-49.2*	7.125-49.375	ns	.
	12CS_118	A09	-52.02*	72.1-96.1	ns	.
	12CS_044	B02	-66.09***	24.55-43.25	-55.36**	24.55-43.25
	12CS_118	B03	-52.02*	1.725-22.575	ns	.
	12CS_059	B04	-49.12**	40.875-57.225	ns	.

12CS_076	B06	-52.02**	31.3-50.95	ns	.
12CS_060	B06	-69.63***	31.3-50.95	ns	.
12CS_047	B06	-57.13***	31.3-50.95	ns	.
12CS_081	B07	-60.27**	0-2.05	ns	.
12CS_048	B07	-41.04*	14.5-21.275	ns	.
12CS_006	B08	-50.57*	26.95-29.8	ns	.
12CS_063	B10	-44.63**	0-8.5	ns	.
12CS_064	B10	-47.1**	0-8.5	ns	.
12CS_028	B10	-49.2*	48.025-55.525	ns	.
12CS_039	B11	-39.73*	0-15.1	ns	.

Les effets QTL de SPAD (teneur en chlorophylle des feuilles) et de TB (biomasse totale) représentent la différence relative entre les CSSL et Fleur11 dans chaque environnement (2017 ou 2018). GL indique le groupe de liaison qui porte le segment de chromosome sauvage responsable du phénotype. Int Conf. représente l'intervalle de confiance du QTL sur le groupe de liaison. *, ** et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$ en utilisant le test de comparaisons multiples de Dunnett, ns : non significatif.

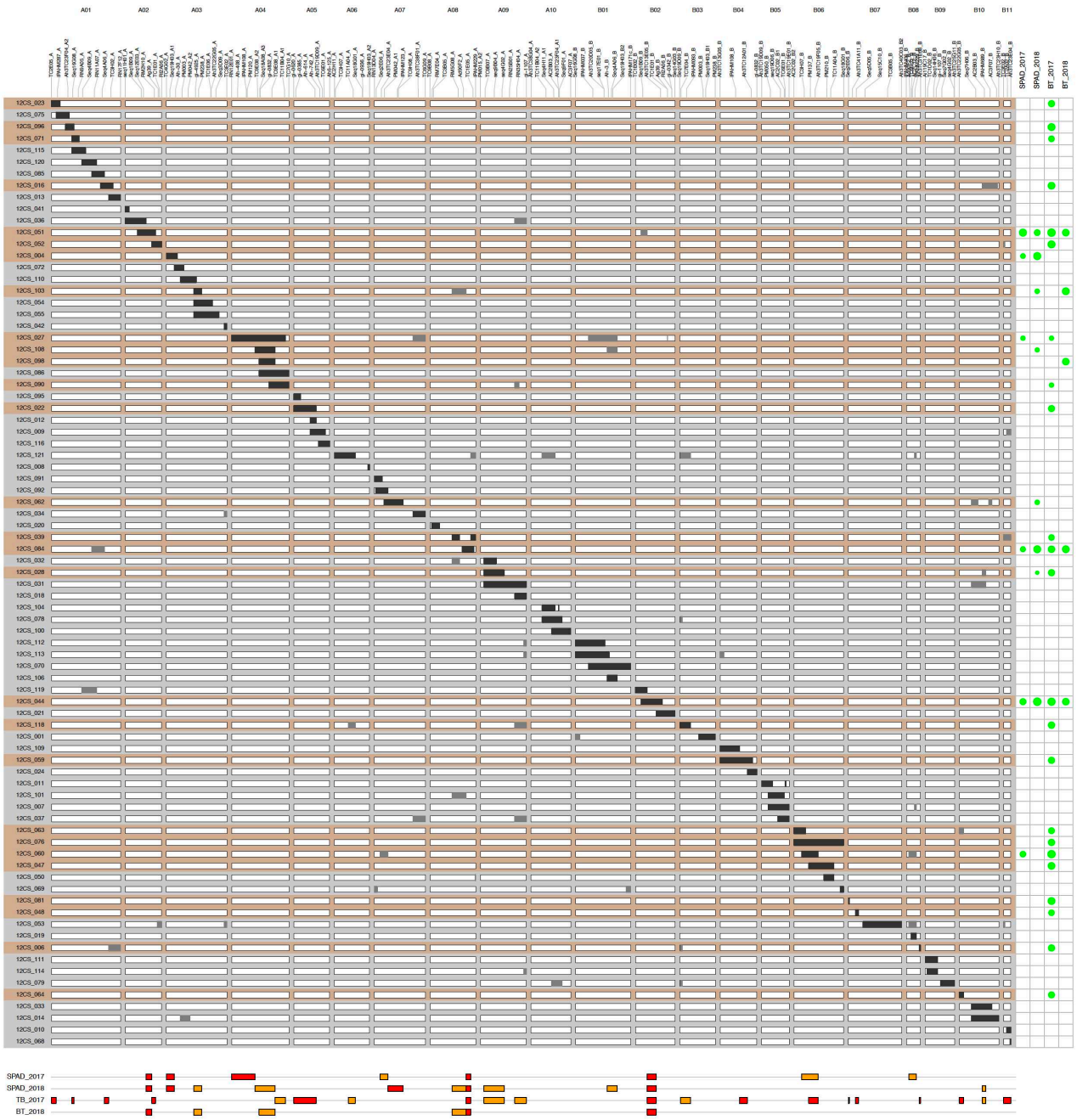


Figure 17. cartographie des QTL liés à la SFA chez l'arachide cultivée

Chaque colonne correspond à un groupe de liaison nommé de A01 à A10 (génome A) et B01 à B11 (génome B). Chaque ligne indique une CSSL. Les bandes blanches représentent le fond génétique du parent récurrent Fleur11. Les bandes noires représentent les segments de chromosomes sauvages ciblés pendant le développement de la population, tandis que les bandes grises représentent les segments chromosomes sauvages surnuméraires (non ciblés). Les CSSL présentant des différences significatives par rapport à Fleur11 sont surlignés en orange. Les cercles verts à droite de la figure représentent l'effet relatif sur le QTL. La taille du cercle est proportionnelle à l'effet relatif du QTL. SPAD et TB correspondent respectivement à la teneur en chlorophylle des feuilles et à la biomasse totale, évaluées en 2017 et 2018. Tous les QTL identifiés ont un effet négatif sur les caractères mesurés. Les localisations des QTL sont indiquées par des rectangles situés en bas de la figure. Rouge = QTL avec une localisation connue, orange = QTL putatif.

III.3. Validation des QTL en conditions contrôlées

Cinq CSSL ayant présenté des phénotypes contrastés par rapport à Fleur11 en conditions semi-contrôlées, ont été sélectionnées pour la validation de QTL. Parmi ces lignées, 04 (12CS_004, 12CS_044, 12CS_051, 12CS_084) ont montré une teneur en chlorophylle des feuilles et une biomasse totale significativement inférieures à celle de Fleur11 dans le traitement inoculé. La lignée 12CS_114 a montré des valeurs plus élevées pour tous les caractères par rapport à Fleur11, bien que ces différences ne soient pas statistiquement significatives (Figures 13-16).

III.3.1. Analyse détaillée de la réponse à l'inoculation avec *B. vignae* ISRA400

Des différences de croissance des plantes entre Fleur11 et les CSSL ont été observées 35 jours après l'inoculation. Pour la teneur en chlorophylle des feuilles, aucune différence n'a été trouvée entre Fleur11 et les CSSL dans le traitement -N, tandis que dans le traitement inoculé, nous avons observé une diminution significative de la teneur en chlorophylle (environ 53 - 75%) pour les lignées 12CS_004, 12CS_044, 12CS_051, 12CS_084 dans les deux expérimentations (Figure 18). Concernant la biomasse totale, à l'exception de la lignée 12CS_004 dans la première expérimentation, aucune différence n'a été trouvée entre Fleur11 et les CSSL dans traitement -N (Figure 19). Dans le traitement inoculé, nous avons constaté que 12CS_114 produisait plus de biomasse par rapport à Fleur11, mais cette différence n'était statistiquement significative que dans une seule expérimentation. Trois lignées (12CS_004, 12CS_044 et 12CS_051) ont montré une diminution significative de biomasse totale (23 à 43 %) par rapport à Fleur11 dans les deux expérimentations (Figure 19). Bien que la diminution de la biomasse ait été moins prononcée dans des conditions contrôlées, ces résultats confirment globalement les observations faites en conditions semi-contrôlées, en fournissant une preuve supplémentaire que les QTL correspondants sont potentiellement impliqués dans l'interaction symbiotique avec *B. vignae* ISRA400.

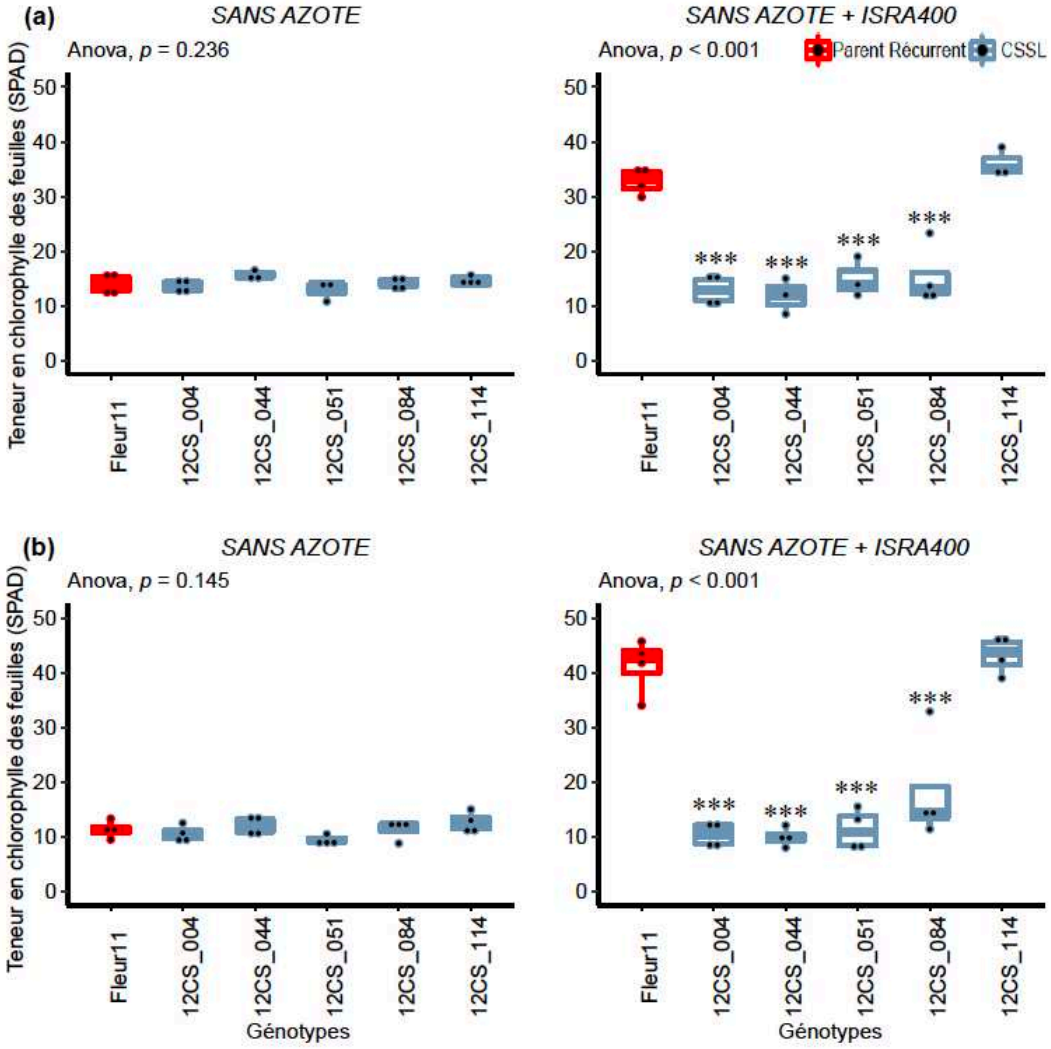


Figure 18. Variation de la teneur en chlorophylle des feuilles entre Fleur11 et 05 CSSL à 35 jours après inoculation en conditions contrôlées

(a) et (b) : première et seconde expérimentation respectivement. Sans azote et sans azote + ISRA400 indiquent respectivement des plantes non inoculées (témoin négatif) et des plantes inoculées avec *B. vignae* ISRA400. *, ** et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$ en utilisant le test de comparaisons multiples de Dunnett.

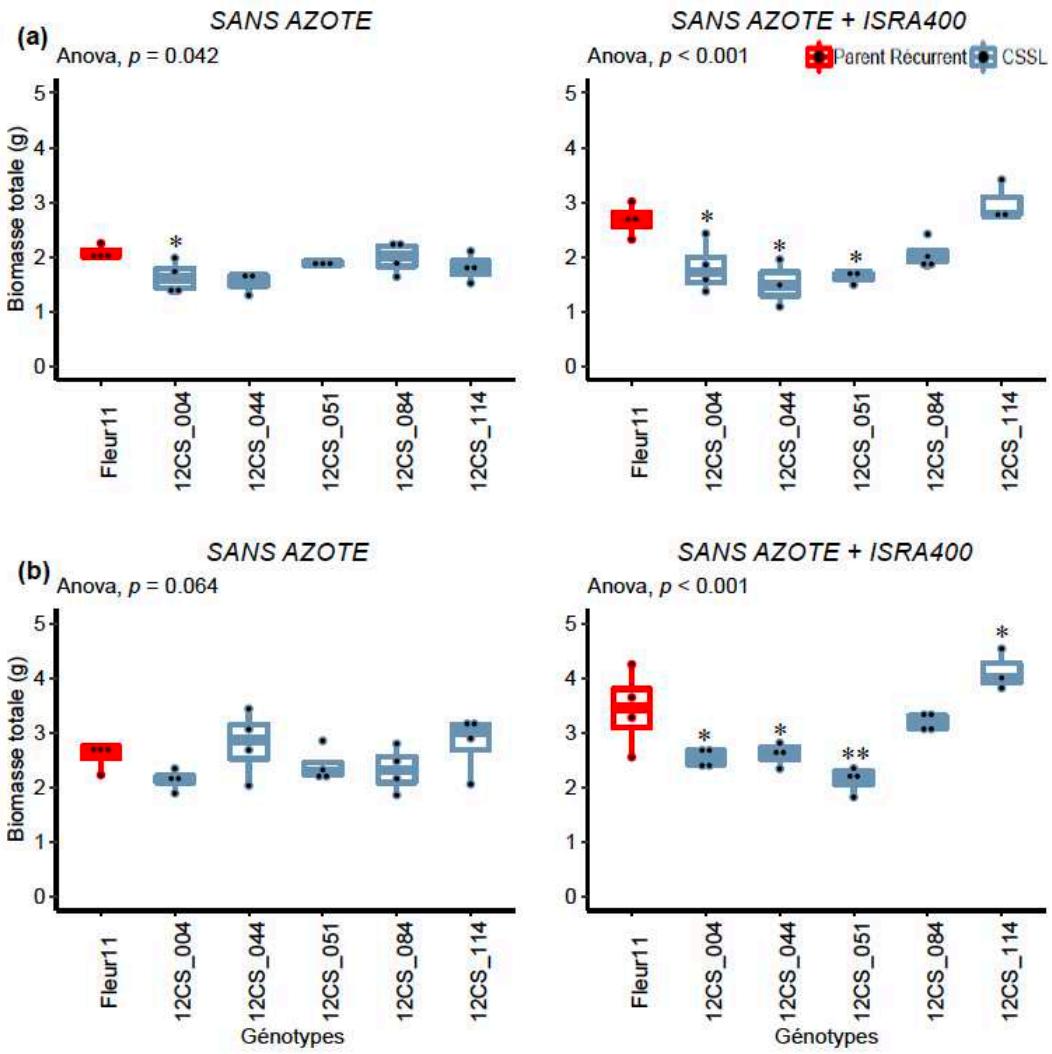


Figure 19. Variation de la biomasse totale entre Fleur11 et 05 CSSL 35 jours après inoculation en conditions contrôlées

(a) et (b) : première et seconde expérimentation respectivement. Sans azote et sans azote + ISRA400 indiquent respectivement des plantes non inoculées (témoin négatif) et des plantes inoculées avec *B. vignae* ISRA400. *, ** et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$ en utilisant le test de comparaisons multiples de Dunnett.

Pour décrire plus finement le phénotype de chaque lignée, nous avons évalué la performance symbiotique en mesurant des caractères directement liés à la nodulation tels que : l'activité nitrogénase à l'aide d'un test de réduction de l'acétylène (activité de la nitrogénase), le nombre de nodules, le poids sec des nodules et le ratio entre le poids sec et le nombre de nodules (Figure 20). Pour chaque plante, l'activité de la nitrogénase a été mesurée en utilisant la plante entière comme décrit par Bonaldi *et al*. (2010b). La matrice de corrélation a montré des coefficients de Pearson positifs et significatifs entre les caractères de nodulation, la teneur en chlorophylle des

feuilles et la biomasse totale (Tableau VIII), suggérant une forte relation entre le développement des nodules et la croissance générale des plantes.

Tableau VIII : Relations entre les caractères associés à la SFA

Caractère 1	Caractère 2	Coef. corr.
Teneur en chlorophylle	Activité de la nitrogénase	0.92***
	Poids sec de nodules	0.89***
	Nombre de nodules	0.81**
	Poids sec/nombre de nodules	0.72**
Biomasse totale	Activité de la nitrogénase	0.84***
	Poids sec de nodules	0.80**
	Nombre de nodules	0.74**
	Poids sec/nombre de nodules	0.62*

Coef. Corr. : Coefficients de corrélation de Pearson obtenus en utilisant les moyennes des 05 CSSL et Fleur11. *, ** et *** indiquent des valeurs significatives à $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$.

Les deux expérimentations indépendantes réalisées dans des conditions contrôlées ont révélé que, la lignée 12CS_004 a montré une diminution significative pour tous les caractères de nodulation par rapport à Fleur11 (Figure 20). Des résultats similaires ont également été observés avec la lignée 12CS_044, à l'exception du nombre de nodules. La lignée 12CS_084 a produit autant de nodules que Fleur11, mais avec une diminution significative du poids sec des nodules et de l'activité de la nitrogénase. La lignée 12CS_051 a montré une activité de la nitrogénase significativement plus faible que celle de Fleur11 dans les deux expérimentations. De plus, dans une expérimentation, nous avons trouvé une diminution significative du poids sec des nodules chez la lignée 12CS_051 et du ratio entre le poids sec et le nombre de nodules chez la lignée 12CS_084. Aucune différence significative n'a été trouvée entre Fleur11 et la lignée 12CS_114 pour tous les caractères de nodulation.

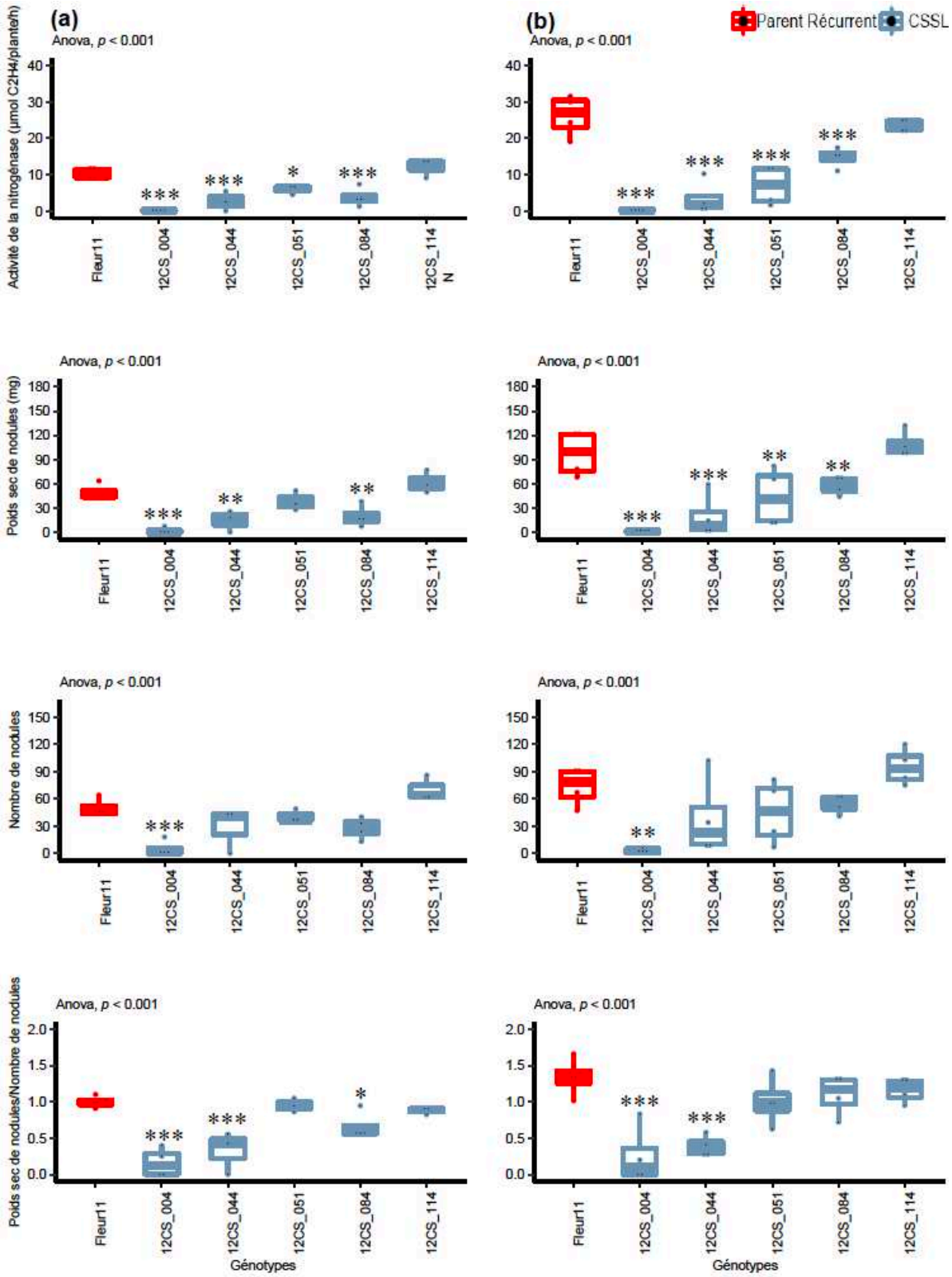


Figure 20. Variation des traits de nodulation entre Fleur11 et 05 CSSL à 35 jours après inoculation en conditions contrôlées

(a) et (b) : première et seconde expérimentation respectivement. Sans azote et sans azote + ISRA400 indiquent respectivement des plantes non inoculées (témoin négatif) et des plantes inoculées avec *B. vignae* ISRA400. *, ** et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$ en utilisant le test de comparaisons multiples de Dunnett.

Lors de l'interaction légumineuse-*rhizobia*, l'efficacité symbiotique est tributaire de la colonisation du nodule par la bactérie, mais aussi du développement et du fonctionnement du nodule. Pour mieux caractériser les effets QTL, nous avons examiné des coupes histologiques des nodules à 35 jours après l'inoculation. Chez Fleur11, nous avons observé des nodules sphériques et déterminés de type aeschynomenoïde présentant un tissu infecté central correspondant à la zone de fixation, entouré de cellules non infectées correspondant au cortex interne ou parenchyme nodulaire, aux vaisseaux conducteurs, et au cortex externe (Planche 4a). Des caractéristiques anatomiques similaires ont été observées chez toutes les CSSL, y compris les lignées 12CS_004 et 12CS_044. Bien que, les nodules de ces lignes ont été plus petits que ceux formés par Fleur11 (Planche 4b-f). Pour analyser les caractéristiques fonctionnelles des nodules, les bactéries ont été colorées avec un protocole de coloration live/dead (vivant/mort), avant d'être examinées au microscope confocale. Chez Fleur11, nous avons observé de nombreuses cellules infectées dans la zone de fixation. Ces cellules étaient densément remplies par des bactéroïdes sphériques marqués en vert, et donc indicateurs de la fonctionnalité des nodules (Planche 4g, m) comme décrit par Sinharoy & DasGupta (2009). Des caractéristiques similaires ont été observées pour la lignée 12CS_114 qui est capable de fixer des quantités d'azote équivalentes à celles de Fleur11 (Planche 4l, r). Les lignées avec des niveaux de fixation d'azote inférieurs ont également montré de nombreuses cellules infectées contenant des bactéroïdes sphériques, mais celles-ci étaient généralement moins denses et présentaient une proportion plus élevée de bactéroïdes morts marqués en rouge par rapport à Fleur11 (Planche 4j, o, p, q). Chez la lignée 12CS_051, nous avons détecté dans la zone de fixation d'azote des collapses, qui correspondent à une dégénérescence spontanée du tissu nodulaire, qui pourrait être associée à des réactions de défense de la plante comme décrit par (Gully *et al.*, 2016; Songwattana *et al.*, 2021). Ces observations indiquent que les allèles sauvages présents au niveau des QTL identifiés peuvent réduire le nombre et/ou la taille des nodules et également affecter le maintien des bactéroïdes fonctionnels dans les cellules infectées de la zone de fixation d'azote.

Nous avons analysé les séquences des régions génomiques correspondantes aux QTL en utilisant les databases de PeanutBase (https://peanutbase.org/gbrowse_peanut1.0) et Orthofinder (https://davidemms.github.io/), et nous avons trouvé 17 orthologues de gènes de nodulation précédemment décrits chez les légumineuses modèles (Tableau IX).

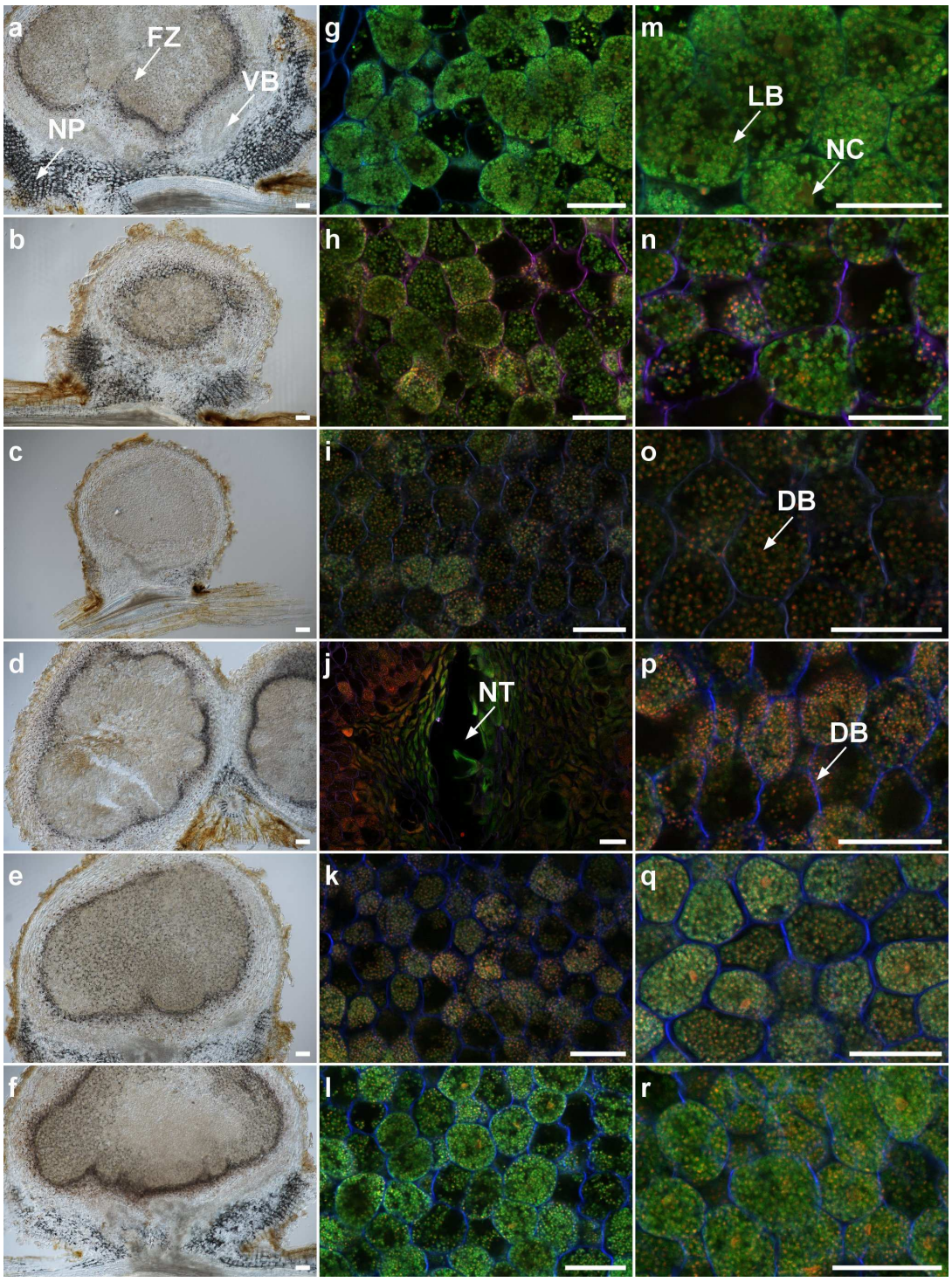


Planche 4. Coupes longitudinales des nodules Fleur11 et de 05 CSSL 35 jours après inoculation avec *B. vignae* ISRA400

(a-f) Images microscopiques à contraste interférentiel montrant la structure des nodules ; (g-r) images prises au microscope confocale montrant la colonisation des cellules. Fleur11 (a, g, m) ; 12CS_004 (b, h, n); 12CS_044 (c, i, o); 12CS_051 (d, j, p); 12CS_084 (e, k, q) et 12CS_114 (f, l, r). FZ : zone de fixation ; NP : parenchyme nodulaire ; VB : vaisseaux conducteurs ; NC : noyau cellulaire ; NT : tissu nécrosé ou collapse ; LB : bactéroïdes vivants ; DB : bactéroïdes morts. Barre d'échelle = 50 µm.

Tableau IX : Identification des orthologues des gènes symbiotiques situés dans les QTL

CSSL	Description du phénotype	Position du QTL			
		Chromosome : (début-fin bp)	Nom du gène	Orthologues	Rôle symbiotique
12CS_004	Diminution de SPAD, TB, ARA, PSN, NN, et PSN/NN	A03: 121100027 - 127945426	*Aradu.51WYZ*	*MtGS1-2*	Inconnu
			Aradu.WG73C	*LjSIE3*	Signalisation précoce
			Aradu.P8MSW	*LjSYMRK*	Signalisation précoce
			Aradu.J0SGA	*LjEPR3*	Signalisation précoce
			Aradu.L8SVN	*MtNAC969*	Senescence
			Aradu.JZT13	*GmINS1*	Organogénèse du nodule
			Aradu.UYZ93	*MtCRE1*	Organogénèse du nodule
12CS_044	Diminution de SPAD, TB, ARA, et PSN/NN	B02: 41413540 - 77881439	*Araip.QVW26*	*GmPT5/7*	Fonctionnement du nodule
			Araip.5U4XM	*MtVAMP721d/e*	Symbiosome formation
			Araip.RJS33	*MtNOOT*	Organogénèse du nodule
			Araip.X1RXQ	*LjFEN1*	Fonctionnement du nodule
12CS_051	Diminution de SPAD, TB, et PSN, et formation de collapse dans les nodules	A02: 30278634 - 66574828	*Aradu.ZC0SW*	*GmPT5/7*	Fonctionnement du nodule
			Aradu.Q6WYU	*MtVAMP721d/e*	Symbiosome formation
			Aradu.31ZLJ	*MtNOOT*	Organogénèse du nodule
			Aradu.F9JCM	*LjFEN1*	Fonctionnement du nodule
12CS_084	Diminution de SPAD et TB	A08: 35192648 - 40925213	*Aradu.GZF8P*	*MtPNO1*	Organogénèse du nodule
			Aradu.3LM76	*LjMATE1*	Fonctionnement du nodule

SPAD : teneur en chlorophylle des feuilles ; TB : biomasse totale ; PSN : poids sec de nodules ; NN : nombre de nodules.

IV. Discussion

La symbiose fixatrice d'azote (SFA) est une composante essentielle de l'agriculture durable. la compréhension des mécanismes génétiques de l'interaction plante-*rhizobia* peut faciliter l'amélioration de la SFA dans les légumineuses à graines. Dans cette étude, 83 lignées de substitutions de segments chromosomiques (CSSL) ont été utilisées pour cartographier les QTL associés à la teneur en chlorophylle des feuilles, et à la biomasse totale, et pour explorer la contribution des espèces sauvages à l'amélioration du potentiel symbiotique de l'arachide cultivée.

IV.1. Variabilité des caractères liés à la SFA et cartographie des QTL

Des variations génétiques et phénotypiques ont été trouvées pour la teneur en chlorophylle et/ou la biomasse totale au sein de la population CSSL (Tableau IV). Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle, ces variations pourraient être liées à une variabilité de l'efficacité d'utilisation de l'azote (absorption et transport de l'azote minéral disponible ou résiduel) dans les traitements témoins (-N et +N), et de l'efficacité de fixation d'azote dans le traitement inoculé (-N + *B. vignae* ISRA400). Sahrawat *et al.* (1988) ont montré qu'une lignée d'arachide incapable de former des nodules, est moins efficace dans l'absorption de l'azote par rapport aux génotypes nodulants, suggérant une relation étroite entre la nodulation et les capacités d'absorption de l'azote. En ce qui concerne le phénotypage de la SFA, la teneur en chlorophylle des feuilles a été utilisée avec succès comme un indicateur efficace de la SFA chez de nombreuses légumineuses à graines, y compris l'arachide (Pimratch *et al.*, 2004b; Vollmann *et al.*, 2011; Ramaekers *et al.*, 2013; Hamawaki & Kantartzi, 2018; Peng *et al.*, 2018)

Nos résultats ont montré que certaines lignées telles que 12CS_055 et 12CS_106 avaient une biomasse totale significativement plus faible que celle de Fleur11 dans le traitement -N. Cependant, dans le traitement -N+ISRA400, ces lignées présentaient une biomasse totale similaire à celle de Fleur11 (Tableaux V et VI). Ces résultats pourraient s'expliquer par une forte sensibilité à la carence en azote, ou encore par un effet positif des fragments sauvages sur les performances symbiotiques de ces lignées. Ainsi, pour la Cartographie des QTL, nous avons supposé qu'une association génotype × phénotype significative est spécifiquement liée à la SFA, lorsque la (les) variation (s) phénotypique (s) qu'elle induit n'est pas observée dans les traitements témoins. Le test de Dunnett a permis d'identifier un total de 24 et 09 lignées significativement différentes de Fleur11 dans le traitement -N+ISRA400 dans respectivement dans les l'expérimentation de 2017 et 2018 (Tableau VII). La variabilité dans la réponse à l'inoculation observée entre les deux expérimentations est peut-être due à des différences de

température ou d'intensité lumineuse dans l'ombrière (températures plus élevées en 2017 par rapport à 2018). Plusieurs facteurs environnementaux, notamment la température, la teneur en azote minéral dans la rhizosphère, la teneur en eau du sol, ou encore la disponibilité des éléments nutritifs pour la plante peuvent considérablement affecter la symbiose légumineuse-*rhizobia* (Liu *et al.*, 2011). Malgré les variations environnementales entre 2017 et 2018, quatre lignées (12CS_051, 12CS_004, 12CS_084 et 12CS_044) ont montré des phénotypes stables pour la teneur en chlorophylle et/ou la biomasse totale (Tableaux V et VI).

Dans les environnements de 2017 et 2018, les associations génotype × phénotype ont permis d'identifier 15 et 25 QTL, respectivement pour la teneur en chlorophylle des feuilles et la biomasse totale (Tableau VII). Des QTL stables de la teneur en chlorophylle des feuilles et/ou de biomasse totale ont été cartographiés les GLs A02, A03, A08 et B02 (Figure 17, Tableau VII). Une colocalisation des deux caractères a été détectée sur les GLs A02, A08 et B02. Des études antérieures ont démontré qu' une carence en azote réduit simultanément la synthèse de la chlorophylle indispensable à la photosynthèse des feuilles, et l'accumulation de la biomasse chez les légumineuses (Herridge *et al.*, 2005) et d'autres plantes (Nguyen *et al.*, 2003). Comme d'autres caractères importants sur le plan économique et agronomique, la SFA est un caractère complexe régulé par plusieurs gènes avec des effets variables. De nombreux QTL impliqués dans SFA sont décrits chez d'autres légumineuses à graines telles que le haricot commun (Souza *et al.*, 2000; Ramaekers *et al.*, 2013), le pois (Bourion *et al.*, 2010), et le soja (Nicolás *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2016; Ni *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022). Le génotypage à l'aide des marqueurs microsatellites (SSR), combiné au phénotypage de deux paires de lignées recombinées (RILs) nodulantes et non-nodulantes, ainsi que de leurs parents, a conduit à l'identification de 20 QTL associés à la perte de la capacité de nodulation chez l'arachide (Peng *et al.*, 2018). Récemment, les approches de QTL-seq et de clonage de gènes à partir d'une population F_2, ont permis d'identifier des régions homéologues sur les chromosomes A08 et B07, contenant une paire du gène NSP2 (Nodulation Signaling Pathway 2) codant pour un facteur de transcription, impliqué dans la reconnaissance des *rhizobia* durant le processus de nodulation chez l'arachide (Peng *et al.*, 2021). En raison des différences liées aux types de populations, de croisements et de marqueurs moléculaires utilisés, il est difficile de faire correspondre avec précision les résultats de notre étude, avec ceux des études précédentes de cartographie génétique sur la nodulation de l'arachide.

De manière intéressante, nous avons détecté un QTL sur le GL A03 associé à une diminution de la biomasse totale dans les traitements inoculé et sans azote (témoin négatif). Ce QTL est porté par la lignée 12CS_004 (Tableaux V et VI). Ces résultats suggèrent que deux gènes

indépendants situés dans la même région seraient respectivement impliqués dans l'absorption/le transport de l'azote minéral du sol et la SFA, ou alors qu'un seul gène pourrait être impliqué dans les étapes en aval comme le transport, le métabolisme, la remobilisation de l'azote ou la détection des faibles teneur d'azote. Des exemples de tels gènes ont été rapportés dans la littérature. C'est par exemple le cas du gène de la nitrate réductase qui joue un rôle à la fois dans l'absorption d'azote du sol (Good *et al.*, 2004), et dans les premières étapes de nodulation (Damiani *et al.*, 2016). Les interactions entre la SFA et la réduction des nitrates et l'assimilation de l'ammonium dans les légumineuses sont bien décrites (Murray *et al.*, 2017).

IV.2. Effet QTL sur les caractères de nodulation

Globalement, les expérimentations en conditions contrôlées ont permis de confirmer les résultats obtenus en ombrière (Figures 18 et 19), et ont mis en évidence une corrélation positive et significative entre la teneur en chlorophylle des feuilles, la biomasse totale et les caractères directement liés à la nodulation (Tableau VIII). Nous avons observé que les allèles sauvages aux QTL portés par les lignées pouvaient entraîner une réduction significative du nombre, de la taille, du poids sec des nodules et/ou une altération du fonctionnement des nodules. Cependant, tous les nodules, même les plus petits, présentaient une structure anatomique similaire à celle observée chez la variété cultivée Fleur11. De plus, tous les génotypes ont formé des nodules déterminés de type aeschynomenoïde, comme décrit précédemment chez l'arachide (Chandler, 1978; Boogerd & van Rossum, 1997; Guinel, 2009) et chez *Aeschynomene indica* (Bonaldi *et al.*, 2010a). De manière intéressante, nous avons observé que ces nodules contiennent de nombreuses cellules infectées par des bactéries différenciées en bactéroïdes (en forme arrondie), indiquant que les étapes de reconnaissance bactérienne, d'organogenèse des nodules, d'infection des cellules, et de différenciation des bactéries sont fonctionnelles. Cependant, les bactéroïdes étaient généralement moins denses dans les cellules de certaines lignées, et très souvent marqués en rouge, indiquant ainsi la présence de bactéroïdes morts. De nombreuses études ont montré que durant la symbiose légumineuse-*rhizobia*, la plante peut sanctionner les bactéries qui ne parviennent pas à fixer suffisamment d'azote à l'intérieur des nodules, en réduisant l'allocation des ressources (hydrates de carbone), ce qui affecte considérablement la viabilité et le maintien des bactéroïdes dans les cellules (Kiers *et al.*, 2003; Oono *et al.*, 2009, 2011). De plus, chez la lignée 12CS_051, nous avons observé la formation de collapse dans la zone de fixation, qui est souvent associé à une incompatibilité entre les deux symbiotes, et peut être assimilé à une sénescence précoce du nodule induite par des mécanismes de défense des plantes. Les incompatibilités symbiotiques ont abouti à une nécrose des tissus

nodulaires, une diminution de la viabilité des bactéroïdes, et de la fixation d'azote chez *A. indica* (Teulet *et al.*, 2019) et *Vigna unguiculata* (Songwattana *et al.*, 2021). Ces incompatibilités symbiotiques ont été associées à des mutations de gènes codant pour le système de sécrétion de type III (T3SS), qui est un mécanisme connu et bien décrit chez les bactéries pathogènes (Hueck, 1998), mais aussi également conservé chez les *rhizobia*, et qui joue un rôle essentiel dans la suppression des mécanismes de défense des plantes (Songwattana *et al.*, 2021). Gully *et al.* (2016) ont observé la formation de collapse dans les nodules inefficaces de *A. indica*, qui serait due à une absence de différenciation des bactéries.

Quelques effets QTL décrits dans cette étude sont similaires à ceux précédemment observées, dans des études de fonctions des gènes symbiotiques chez l'arachide basée sur la technique de l'ARN interférence, qui consiste à inhiber l'expression du gène ciblé et à décrire le phénotype obtenu. Sinharoy & DasGupta (2009) ont montré que l'inhibition de la protéine kinase dépendante Ca^{2+}/calmoduline (CCaMK) réduit l'activité de la nitrogénase d'environ 90%, et affecte l'infection bactérienne durant l'organogénèse des nodules. De même, l'absence d'expression de la cytokinine Histidine Kinase1 (HK1) aboutie à une réduction considérable du nombre de nodules, de la taille des nodules, et de l'activité de la nitrogénase (Kundu & DasGupta, 2018). Dans notre étude, 17 orthologues de gènes de nodulation ont été dénombrés dans les QTL identifiés (Tableau IX). Cependant, à ce stade il est difficile d'identifier le (s) gène (s) responsable (s) du (des) phénotype (s) observé, à cause de la large taille moyenne (environ 39 cM) des segments chromosomiques sauvages introgressés au sein cette population CSSL. Une analyse transcriptomique et une cartographie fine des principaux QTL seront nécessaire pour l'identification de gène (s) candidat (s).

IV.3. Espèces sauvages, domestication et SFA

À tous les QTL identifiés dans cette étude, les allèles sauvages ont causé un effet dépressif sur la croissance des plantes et les caractères de nodulation, ce qui suppose que dans l'interaction avec la souche sénégalaise efficace ISRA400, *A. ipaensis* et *A. duranensis* n'apporteraient pas de nouveaux allèles favorables à l'amélioration de la performance symbiotique de l'arachide cultivée. Ces résultats suggèrent un potentiel impact positif de la domestication et/ou du processus de sélection variétale sur l'amélioration de la SFA, ou alors une perturbation du processus symbiotique aboutissant à une incompatibilité entre les espèces sauvages et la souche ISRA400 à la suite l'introduction et l'adaptation de l'arachide au Sénégal. Bouznif *et al.* (2019) ont montré que les variétés cultivées d'arachide auraient acquis leurs *rhizobia* efficaces actuels par un mécanisme d'adaptation aux nouveaux symbiotes présents dans leurs zones

d'introductions. Les espèces sauvages apparentées à l'arachide sont originaires d'Amérique du Sud, et ont montré une meilleure performance symbiotique lorsqu'elles étaient inoculées avec des *rhizobia* natifs des sols d'Argentine, que lorsqu'elles sont inoculées avec la bactérie sénégalaise *B. vignae* ISRA400 (Zaiya, 2018). La SFA pourrait être le résultat d'un processus de co-évolution et/ou de co-adaptation entre des partenaires symbiotiques situés dans une même zone géographique. Les *rhizobia* associés au pois chiche cultivé sont phylogénétiquement différents de ceux isolés des nodules de leurs parents sauvages, ce qui indique une co-adaptation de la légumineuse et des *rhizobia* durant la domestication (Greenlon *et al.*, 2019). Chez le haricot commun, les différents génotypes ont été capables d'établir une symbiose efficace exclusivement avec les *rhizobia* isolées dans leurs centres de domestication (Aguilar *et al.*, 2004). De plus, Aguilar *et al.* (2022) ont démontré que la compétitivité des *rhizobia* et la diversification des gènes symbiotiques chez le haricot commun, seraient liées à des facteurs évolutifs et adaptatifs locaux. En revanche, aucune preuve de l'adaptation aux *rhizobia* indigènes n'a été trouvée chez *Medicago lupulina* (Harrison *et al.*, 2017).

Par ailleurs, l'évaluation d'une population de lignées recombinantes (RILs) issue du croisement entre un soja cultivé et un soja sauvage a permis de cartographier des QTL liés à la SFA, et de montrer un impact positif de la domestication sur l'amélioration de la capacité à fixer l'azote (Muñoz *et al.*, 2016). Le phénotypage des caractères de nodulation dans une collection de 310 accessions de soja (10 sojas sauvages, 71 variétés locales et 229 variétés améliorées) et une population de 207 CSSL a permis d'identifier des SNP associés à une amélioration de la nodulation, et sélectionnés durant la domestication (Wang et al., 2022). Ces SNP ont été identifiés dans les exons du gène *GmCRP*, qui régule la reconnaissance de l'effecteur NopC du T3SS de la bactérie durant la symbiose (Wang *et al.*, 2022). Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle, l'apport des allèles sauvages de *A. duranensis* et *A. ipaensis* dans le fond cultivé Fleur11 a négativement affecté l'association symbiotique avec ISRA400, en raison du manque de co-évolution ou de co-adaptation entre la souche sénégalaise et ces espèces sauvages. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser la réponse à l'inoculation de la population CSSL avec des *rhizobia* provenant d'Amérique du Sud, la région d'origine l'arachide cultivée.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, une population interspécifique de 83 lignées de substitutions de segments chromosomiques a été utilisée pour cartographier les régions génomiques contrôlant les caractères liés à la symbiose fixatrice d'azote chez l'arachide. Nous avons détecté 04 QTL

stables associés à la performance symbiotique. À tous ces QTL, les allèles sauvages ont montré un effet négatif sur tous les caractères de SFA. L'analyse de ces régions génomiques a permis l'identification de 17 orthologues de gènes de nodulation. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin identifier le (s) gène (s) candidat (s) responsable (s) du (es) phénotype (s) observé (s). Nos résultats ont fourni des informations supplémentaires sur les aspects génétiques de la nodulation chez l'arachide et contribueront à une meilleure connaissance de l'impact de la domestication sur l'amélioration de la capacité de fixation de l'azote de l'arachide.

CHAPITRE 3 : CARTOGRAPHIE DE QTL ASSOCIÉS AUX CARACTÈRES LIÉS À LA SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE ET AUX COMPOSANTES DU RENDEMENT CHEZ L'ARACHIDE CULTIVÉE (*Arachis hypogaea* L.), À PARTIR D'UNE POPULATION DE CROISEMENTS INTERSPECIFIQUE EVALUÉE EN CHAMPS PAYSANS

Les principaux résultats de ce chapitre de thèse ont fait l'objet de 02 communications orales.

Title: QTL mapping associated of biological nitrogen fixation and agronomic traits in peanut (*Arachis hypogaea* L.**) using an interspecific population**.

- 19ème Congrès de l'Association Africaine pour la Fixation Biologique de l'Azote, AABNF du 28 novembre au 02 décembre 2022, Dakar, Sénégal.
- Atelier du Peanut Innovation Lab, du 06 au 08 septembre 2022, Saly, Sénégal.

Résumé

La sélection de nouvelles variétés à haut potentiel agronomique et symbiotique est d'une importance à la fois socio-économique et écologique en Afrique subsahélienne. Dans ce chapitre, nous présentons une analyse génétique de la symbiose fixatrice d'azote (SFA) et de certaines composantes du rendement dans une perspective d'amélioration variétale de l'arachide cultivée au Sénégal. Une population de 83 lignées substitutions de segments chromosomiques et leur parent récurrent la variété cultivée Fleur11, ont été évalués durant trois années consécutives dans des parcelles paysannes, dans des conditions pauvres en azote. Les variations phénotypiques des caractères liés à la SFA (teneur en azote total et pourcentage en azote fixé des fanes) et des composantes du rendement (poids de fanes et de gousses) ont été évalués. La quantification à haut débit de la SFA en champ, étant couteuse et fastidieuse, nous avons dans un premier temps utilisé la spectrométrie proche infrarouge, pour développer un modèle prédictif robuste et précis ($r^2 = 0.89$), qui permet de déterminer la teneur en azote total des fanes. Les résultats d'analyses de variance ont montré un effet génotype significatif pour tous les caractères évalués dans chaque environnement. Les valeurs d'héritabilité au sens large ont été moyennes pour les caractères liés à la SFA et élevés pour les composantes du rendement. Les associations génotype × phénotype ont permis d'identifier 04 QTL (quantitative trait loci) associés au pourcentage d'azote fixé et 05 QTL à la teneur en azote total des fanes. Au total, 31 QTL ont été associés aux composantes du rendements. Parmi ces 31 QTL, 03 QTL avaient été précédemment associés à la SFA dans des conditions contrôlées et semi-contrôlées. Globalement, les allèles sauvages présents aux QTL identifiés dans cette étude ne permettent pas d'améliorer le potentiel symbiotique et agronomique de la variété Fleur11 dans les conditions de faible fertilité du sol. Nos résultats apportent de nouvelles informations intéressantes sur les aspects génétiques de la SFA en conditions de culture paysanne et contribuent à la compréhension de l'impact de la sélection variétale sur le potentiel symbiotique de l'arachide cultivée au Sénégal.

I. Introduction

Dans de nombreux pays africains, les rendements d'arachide sont faibles à cause de la sécheresse, du manque de semences de qualité, de la faible utilisation d'intrants agricoles, des moyens techniques pour intensifier la production, etc. (Variath & Janila, 2017). Au Sénégal par exemple, la culture de l'arachide est essentiellement assurée par des petits producteurs, dans des systèmes agricoles sans ou avec un faible apport en engrais de synthèse. Les sols du bassin arachidier du Sénégal sont caractérisés par une carence en nutriments (azote, phosphore, etc.) et en matière organique (McClintock & Diop, 2005b), qui affecte considérablement les rendements. Dans ces agrosystèmes, l'azote fixé à travers la symbiose par l'arachide cultivée, constitue la principale source d'azote pour la croissance de la légumineuse, et celle du mil ou du sorgho associé ou subséquent. Par conséquent, la prise en compte des pratiques agricoles paysannes est essentielle pour la sélection des cultivars adaptés à leurs agrosystèmes. La symbiose fixatrice d'azote (SFA) est un caractère peu ciblé dans l'amélioration variétale des légumineuses cultivées, à cause des difficultés liées à sa quantification en champ, sa forte dépendance aux conditions environnementales et sa nature polygénique. De plus, la SFA se produit au niveau des parties souterraines de la plante qui sont généralement négligées durant le processus de sélection variétale (Pérez-Jaramillo *et al.*, 2016).

De nombreuses études ont rapporté des coefficients de corrélations positifs et significatifs entre les composantes du rendement et les trais liés à la SFA tels que le poids et le nombre de nodules, l'activité de la nitrogénase, la teneur en azote total, la teneur en protéines, la teneur en azote fixé, le poids de fanes, le poids de gousses, le poids de 100 gousses ou de 100 grains chez des légumineuses cultivées comme le soja (Liyanage *et al.*, 2023) et l'arachide (Arrenddell *et al.*, 1985; Pimratch *et al.*, 2004b). Ce qui suggère qu'il serait possible d'améliorer le potentiel agronomique des variétés de légumineuses cultivées en optimisant leur capacité symbiotique en conditions naturelles. Par ailleurs, pour comprendre les mécanismes génétiques de SFA et les intégrer en amélioration variétale, des études ont été largement menées sur l'identification de QTL (quantitative trait loci) associées aux caractères de SFA chez les légumineuses cultivées comme le soja (Santos *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017b, 2019; Huo *et al.*, 2019) et le haricot commun (Ramaekers *et al.*, 2013; Kamfwa *et al.*, 2015, 2019; Diaz *et al.*, 2017). En revanche, chez d'autres légumineuses cultivées comme l'arachide peu d'informations sont disponibles sur la génétique de la SFA. Parmi les études réalisées, Peng *et al.* (2018) ont rapportés 20 QTL impliqués dans la perte de la capacité à former des nodules chez l'arachide, à partir de populations F_2, dérivées du croisement entre des lignées consanguines nodulantes et non-nodulantes. Par ailleurs, à notre connaissance, aucune étude

d'identification de QTL de SFA chez l'arachide (Peng *et al.*, 2018, 2021), n'a impliqué l'utilisation de population de croisements de interspécifiques. En conséquence, la contribution des espèces sauvages à l'amélioration de la SFA de l'espèce cultivée est largement inconnue. Dans le chapitre 2 de cette thèse, nous avons cartographié 04 QTL de SFA chez l'arachide cultivée au Sénégal, en évaluant l'interaction symbiotique entre une population de 83 lignées substitutions de segments chromosomiques (CSSL) et la bactérie *Bradyrhizobium vignae* ISRA400 en conditions semi-contrôlées. Nos résultats ont montré que, les allèles sauvages aux QTL induisaient une diminution de la SFA. Cependant, (Zaiya *et al.*, 2018) ont montré, qu'il existe une diversité de bactéries natives des sols du bassin arachidier du Sénégal, capables d'établir la SFA avec l'arachide cultivée. Ainsi, il serait intéressant d'analyser l'apport des allèles sauvages en présence d'une diversité de *rhizobia*.

Dans ce présent chapitre, nous avons évalué une population de 83 CSSL et leur parent récurent la variété Fleur11, durant trois années successives dans des parcelles paysannes, en des conditions de carence en azote. Les variations des caractères liés à la SFA et les composantes du rendement ont été évaluées, et les associations génotype × phénotype ont permis d'identifier des QTL associés aux variations observées. Nos résultats ont montré d'une part qu'il n'y a pas de relation significative entre les caractères liés à la SFA et les composantes du rendement et d'autre part que les espèces sauvages n'apportent pas de nouveaux allèles favorables à l'amélioration du potentiel symbiotique de Fleur11 en champ paysan.

II. Matériel et méthodes

II.1. Site d'étude

Nos expérimentations en champ ont été réalisées dans des parcelles paysannes choisies dans le village Diohine, situé dans le bassin arachidier de la région de Fatick au Sénégal (Figure 21) et dans la zone agroécologique du bassin arachidier. Le choix de 03 parcelles a été fait à partir d'une base de données d'un réseau de parcelles, où l'historique de la fertilisation et de la succession des cultures est suivi depuis 2009 par le laboratoire mixte international intensification écologique des sols cultivés en Afrique de l'Ouest (IESOL). Sur la base de ces informations, nous avons sélectionné des parcelles qui ont été très peu ou pas fertilisées, et régulièrement utilisées pour la culture de l'arachide suivant la rotation culturale mil-jachère-arachide. Dans chaque parcelle, des prélèvements de sols ont été effectués à 20 cm de profondeur pour une analyse chimiques au laboratoire.

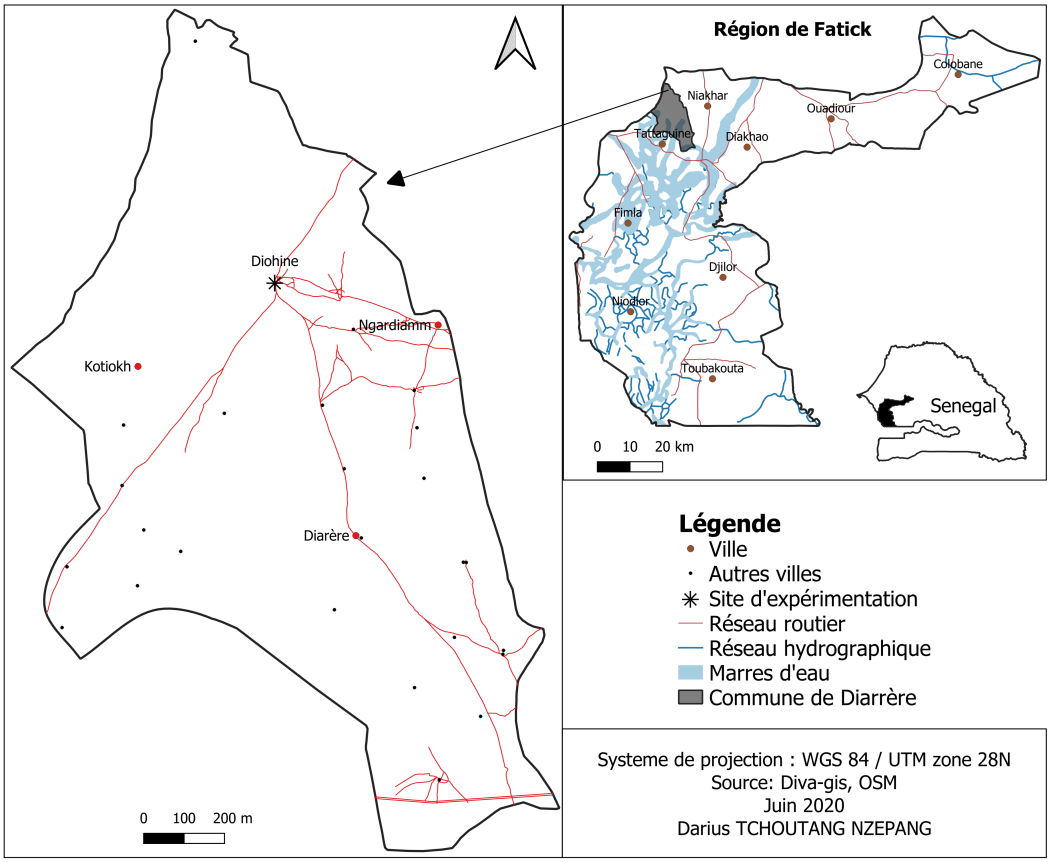


Figure 21. Localisation du village Diohine sur la carte du Sénégal

Les caractéristiques chimiques du sol de la parcelle sélectionnée en 2019 étaient de 0.25% de carbone, 0.02% de teneur en azote (0.43 mg/kg de nitrates et 4.15 mg/kg d'ammonium assimilables), et 40.53 mg/kg de phosphore total dont 1.35 mg/kg sont assimilables. Les analyses de chimiques du sol des parcelles de 2020 et 2021 sont en cours au laboratoire.

II.2. Matériel végétal

Le matériel végétal était constitué d'une population de 83 lignées de substitutions de segments chromosomiques (CSSL) issue du croisement entre la variété cultivée Fleur11, utilisée comme parent femelle et le tétraploïde synthétique AiAd qui combine les génomes des espèces sauvages *Arachis ipaensis* KG30076 (génome BB) et *Arachis duranensis* V14167 (génome AA), utilisé comme parent mâle (Fonceka *et al.*, 2012b). Fleur11 est une variété de type Spanish à cycle court (90 jours) cultivée en Afrique de l'Ouest pour ses performances agronomiques et sa tolérance modérée à la sécheresse.

II.2. Mise en place de l'expérimentation

Les 83 CSSL et la variété Fleur11 ont été évaluées en champs paysans entre juillet et octobre en 2019, 2020 et 2021, désignés respectivement environnements DH19, DH20 et DH21. Le dispositif expérimental a été un alpha-lattice avec 4 répétitions, et 4 blocs par répétition (Figure 22). La géométrie du semis a été de 1,5 m pour chaque de ligne de semis, avec des espacements de 15 cm entre les poquets sur une même ligne, et de 50 cm entre les lignes adjacentes. Les espacements entre les blocs et les répétitions ont été respectivement de 1 m et 1,5 m. Le facteur étudié a été le « génotype » avec 92 niveaux, soit les 83 CSSL et Fleur11 répété 9 fois dans chaque répétition. La répartition aléatoire des génotypes dans les blocs a été réalisée à l'aide du logiciel CropStat. Étant donné que les parcelles avaient comme précédent cultural la jachère, elles ont été nettoyées avant le semis, en éliminant les pailles de mauvaises herbes et les déjections d'animaux. Les graines ont été traitées avec du Caïman Rouge P (Perméthrine 25 g/kg + Thirame 250 g/kg) afin de limiter les fontes de semis. Le semis a été effectué manuellement à la suite d'une pluie utile (au moins 40 mm). Ensuite, un labour superficiel a été réalisé pour de faciliter la levée. Pour limiter les effets de la carence en phosphore (teneur inférieure au seuil de 15 mg/kg) dans nos parcelles, nous avons appliqué le quart de la dose en phosphore recommandée par l'institut sénégalais de recherche agricoles (ISRA) pour la culture de l'arachide, en utilisant des engrais phosphatés tels que le DAP (18-46-00) ou NPK (05-15-36). Le désherbage et les relevés pluviométriques ont été effectués durant toute la durée de l'expérimentation.

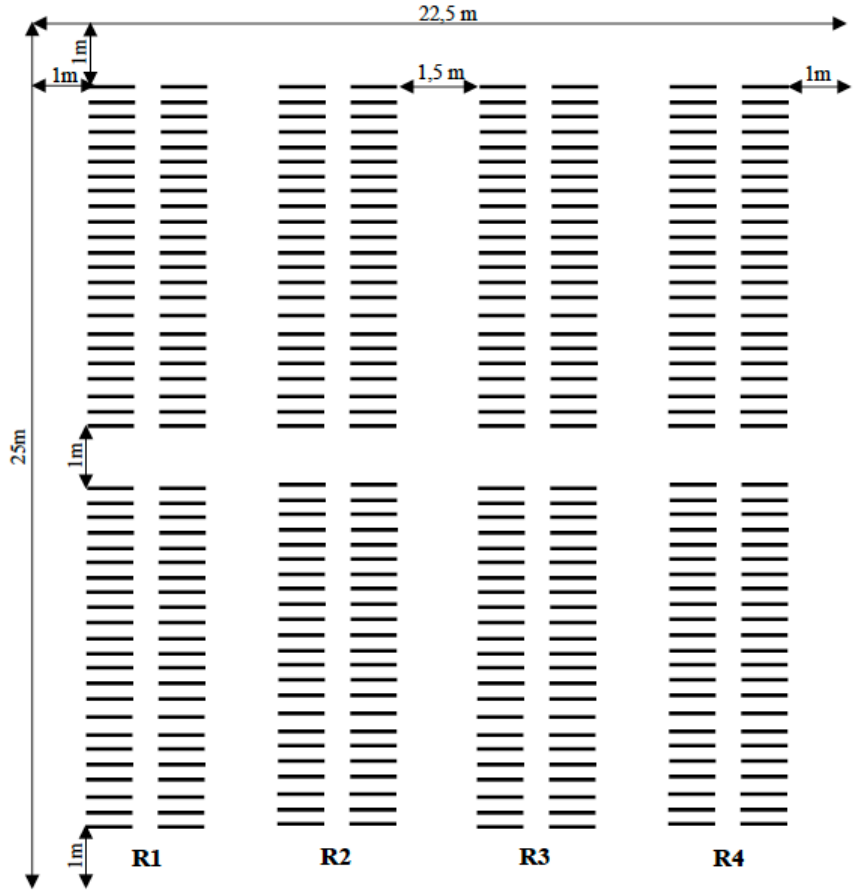


Figure 22. Dispositif expérimental en alpha-lattice
Chaque bande horizontale correspond à une ligne de semis de 1,5 m comprenant 10 plantes.
R1, R2, R3 et R4 correspondent aux répétitions comprenant chacune 04 blocs.

II.3. Phénotypage de la population CSSL

La mesure des caractères de SFA et des composantes du rendement a été réalisée à la récolte (100 et 103 jours après le semis), après séchage des plantes à température ambiante pendant 03 semaines. La récolte a consisté au prélèvement de 4 à 5 plantes consécutives sur chaque ligne de semis. Par la suite, ces plantes ont été utilisées pour mesurer les caractères associés à la SFA tels que la teneur en azote total (TN) et le pourcentage en azote fixé (%Ndfa) des fanes, et les composantes du rendement tels que le poids de fanes/plante et le poids de gousses/plante ont été évalués. Des échantillons de plantes non légumineuses utilisées comme « plante référence non fixatrice d'azote » ont été également récoltés dans 6 à 8 placettes non désherbées durant toute la durée de l'expérimentation. Ces placettes ont été reparties aléatoirement entre tous les blocs de la parcelle. Les échantillons séchés (fanes de d'arachide et non légumineuses) ont été broyés à l'aide d'un broyeur à végétaux muni d'un tamis de maille 0,75 mm. La poudre

obtenue a été analysée pour déterminer la TN et l'abondance en azote isotopique ^{15}N ($\delta^{15}N$). Le pourcentage en azote fixé a été déterminé suivant la formule :

$$\%\text{Ndfa} = \frac{\delta 15\text{N}_{\,référence} - \delta 15\text{N}_{\,légumineuse}}{\delta 15\text{N}_{\,référence} - B} \times 100$$

Avec :

$\delta^{15}N_{référence}$ = abondance isotopique ^{15}N de la non légumineuses

$\delta^{15}N_{légumieuse}$ = abondance isotopique ^{15}N de la légumineuse

B = abondance isotopique ^{15}N lorsque la légumineuse dépend uniquement de la fixation d'azote. Communément, chez l'arachide B = -2,70 ‰ (Mokgehle *et al.*, 2014).

Au total 912 échantillons ont été produits au terme des trois expérimentations. Cependant, afin de réduire le coût des analyses chimiques, 296 échantillons ont été analysés à l'aide d'un spectromètre de masse, et nous avons utilisé la spectrométrie proche infrarouge (SPIR) pour construire un modèle de prédiction sur la teneur en azote des fanes d'arachide. Par la suite, le modèle, nous a permis de prédire les teneurs en azote pour le reste des échantillons. Le SPIR est une méthode peu coûteuse, qui consiste à déterminer les propriétés physico-chimiques d'un échantillon à partir de sa signature spectrale. Elle est basée sur les vibrations des molécules d'un échantillon, causées par l'excitation les liaisons chimiques C-H, O-H et N-H à l'aide d'une source lumineuse infrarouge (Blanco & Villarroya, 2002). Cette vibration crée un signal spectrale mesurable, qui traduit l'absorption de la lumière par les molécules de l'échantillon, où leur concentration est directement proportionnelle à la quantité de longueurs d'ondes infrarouges absorbées.

II.3.1. Acquisition et analyse des données spectrales

Pour chaque échantillon, la poudre issue du broyage a été utilisée pour l'acquisition des données spectrales. Les spectres sont constitués par des absorbances (A) calculées suivant la formule :

$$A = \log\frac{1}{\text{R}}$$

Avec R = réflectance.

La mesure des absorbances a été réalisée dans une gamme de longueurs d'ondes comprises entre 350 et 2500 nm avec 1 nm d'intervalle, en utilisant un spectromètre Labspec ASD. Cependant, la région du proche infrarouge allant de 1100-2500 nm, qui correspond à la région d'absorption de la lumière par les molécules azotées telles que les protéines (Gislum *et al.*, 2004), a été ciblée dans le développement du modèle. Le traitement et l'analyse des données spectrales ont été effectués avec le package rchemo du logiciel R.

Afin d'éliminer le bruit du signal et d'améliorer la qualité des spectres bruts, plusieurs prétraitements ont été testés parmi lesquels une transformation SNV (Standard Normal Variate), les dérivées 1 et 2 en 11 et 25 points (fenêtre lissage de 11 et 25 nm) de Savitzky-Golay (SG), et les différentes combinaisons entre la transformation SNV et toutes les transformations SG citées précédemment. Les spectres bruts et de quelques spectres prétraités sont présentés à la figure 23.

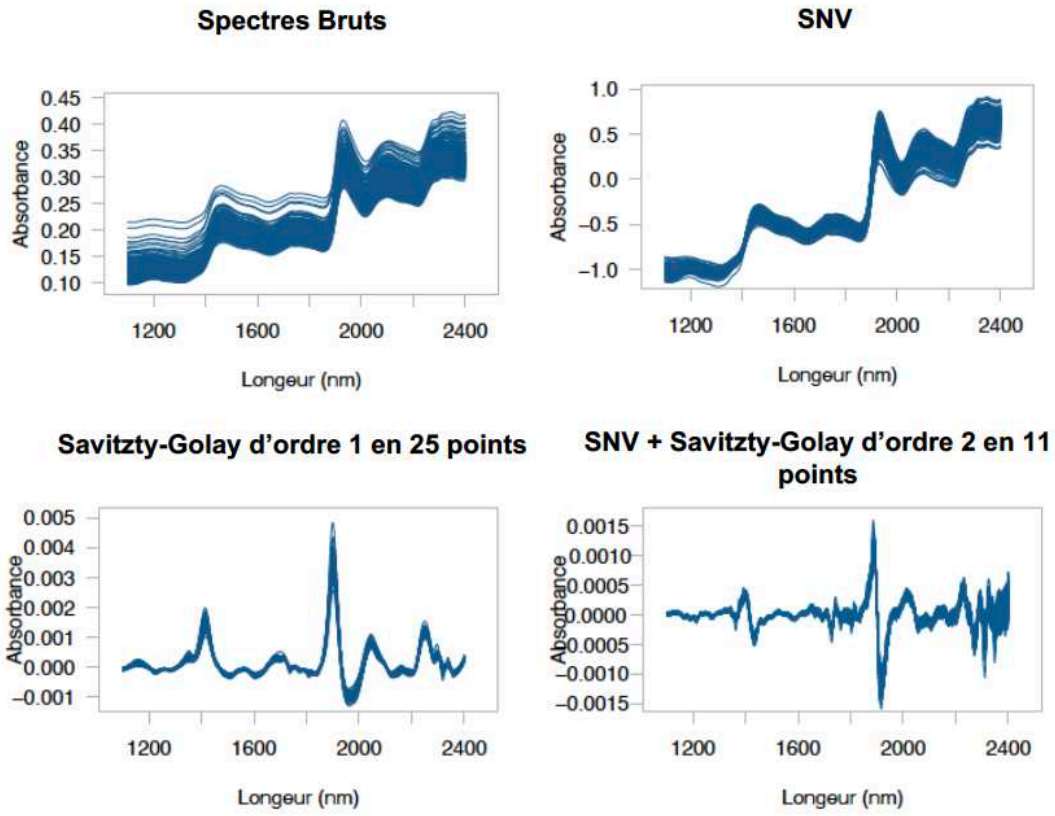


Figure 23. Spectres bruts et quelques spectres transformés

Les résultats d'analyses chimiques des 296 échantillons analysés en laboratoire, ont été associés aux signatures spectrales correspondantes afin de calibrer et de valider des modèles de régression. Brièvement, l'ensemble du jeu de données a été divisé en un groupe de calibration (n = 222 échantillons) et un groupe de validation (n = 74 échantillons). La constitution des groupes s'est faite en utilisant la procédure du « *Ygrowing* ». Elle a consisté à classer les échantillons suivant l'ordre croissant des valeurs d'analyses chimiques, et de sélectionner progressivement un échantillon après tous les quatre échantillons en partant du 2ème échantillon, pour constituer le groupe de validation. Une fois les modèles calibrés, une validation croisée a été réalisée en utilisant la méthode « *leave one out* ». Cette méthode consiste à prendre n-1

échantillons d'un jeu de données de n échantillons et à élaborer un modèle prédictif en considérant les n-1 échantillons. Par la suite, le modèle est utilisé pour prédire l'échantillon qui n'avait pas été pris en compte dans son élaboration. Cette procédure est répétée n fois de manière à prédire tous les échantillons qui constituent le jeu de données. L'évaluation de la précision du modèle a été faite en se basant sur des indicateurs statistiques calculés suivants les formules :

- Le RMSE (Root Mean Square Error)

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}$$

- Le coefficient de détermination r^2

$$r^2 = \sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2}}$$

- Le biais moyen

$$Biais = \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)}{n}$$

- Le RPD (ratio Performance to Deviation)

$$RPD = \frac{EC}{RMSE}$$

Avec

n = nombre d'échantillons

yi = valeur réelle

$\hat{y}_i$ = valeur prédite de l'échantillon i

$\bar{y}$ = valeur moyenne de toutes les valeurs connues

et EC = écart-type.

Un modèle est d'autant plus précis qu'il maximise le R^2 et minimise le RMSE et le Biais. Un Biais positif implique que le modèle tend à surestimer les valeurs observées, tandis qu'un biais négatif implique une sous-estimation des valeurs observées. Un RPD < 1,4 indique une mauvaise prédiction ou une absence de modèle ; un RPD compris entre 2 et 2,5 indique un bon modèle quantitatif, et un RPD > 2,5 indique un excellent modèle quantitatif (Viscarra Rossel *et al.*, 2006). Le modèle prédictif le plus précis a été utilisé pour estimer la teneur en azote de tous les échantillons qui n'ont pas été analysés au laboratoire.

II.4. Analyses statistiques et cartographie de QTL

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R. Le modèle linéaire standard utilisé, le calcul de l'héritabilité au sens large, et la cartographie de QTL ont été effectués comme décrit précédemment dans le chapitre 2 (voir paragraphe II.3). L'analyse en composante principales a été faite en utilisant le packages FactomineR et factoextra.

III. Résultats

III.1. Développement du modèle régression sur la teneur en azote des fanes d'arachide

Dix modèles prédictifs ont été évalués en prenant en compte les spectres bruts et les différentes transformations réalisées. Les caractéristiques de la validation croisée des différents modèles sont récapitulées dans le tableau X.

Le prétraitement Savitzky-Golay en dérivée 1 avec 25 points de lissage a permis d'élaborer le meilleur modèle. La figure 24a présente le modèle de régression retenu pour la prédiction de la TN des fanes d'arachide dans la suite de notre travail. La valeur positive du Biais indique que le modèle tend à légèrement surestimer les valeurs observées. L'analyse des coefficients de régression a révélé que les valeurs les plus importantes en valeurs absolues sont comprises entre les longueurs d'ondes 1600 et 2250 nm (Figure 24b). Ainsi, ces longueurs d'ondes seraient les plus indiquées pour discriminer nos échantillons sur la base de leur composition en azote. Les spectres des échantillons qui ont servi à la construction du modèle, et ceux des échantillons à prédire, ont été projetés dans les plans factoriels d'une analyse en composantes principales (ACP) (Figure 25). Les cinq premiers axes de l'ACP résument 83.7% de la variance totale. Cette analyse a révélé une bonne superposition des deux jeux de données, ce qui suggère que le modèle développé pourrait être utilisé pour prédire la TN des échantillons non analysés.

Tableau X : Caractéristiques de la validation croisée des modèles prédictifs

Prétraitements	Nombre de composantes	r^2	RMSE	Biais	RPD
Aucun	12	0.88	1.253	0.087	2.9
SNV	13	0.87	1.311	0.074	2.77
SG dérivée 1 en 11 points	8	0.88	1.246	0.018	2.92
SG dérivée 1 en 25 points	**8**	**0.89**	**1.212**	**0.083**	**3**
SG dérivée 2 en 11 points	8	0.78	1.693	-0.166	2.15
SG dérivée 2 en 25 points	6	0.87	1.295	-0.2	2.81
SNV+SG dérivée 1 en 11 points	8	0.88	1.249	0.029	2.92
SNV+SG dérivée 1 en 25 points	8	0.88	1.224	0.08	2.98
SNV+SG dérivée 2 en 11 points	8	0.81	1.592	-0.13	2.29
SNV+SG dérivée 2 en 25 points	6	0.87	1.295	-0.2	2.81

SNV: Standard Normal Variate; SG: Savitzky-Golay. Le modèle présentant les meilleures caractéristiques est indiqué en gras.

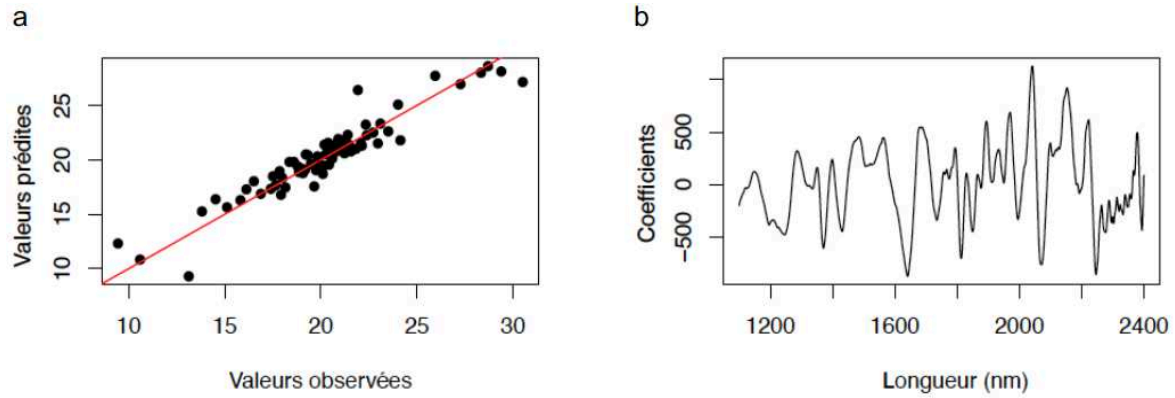


Figure 24. Modèle (a) et coefficients (b) de régression sur la teneur en azote des fanes d'arachide

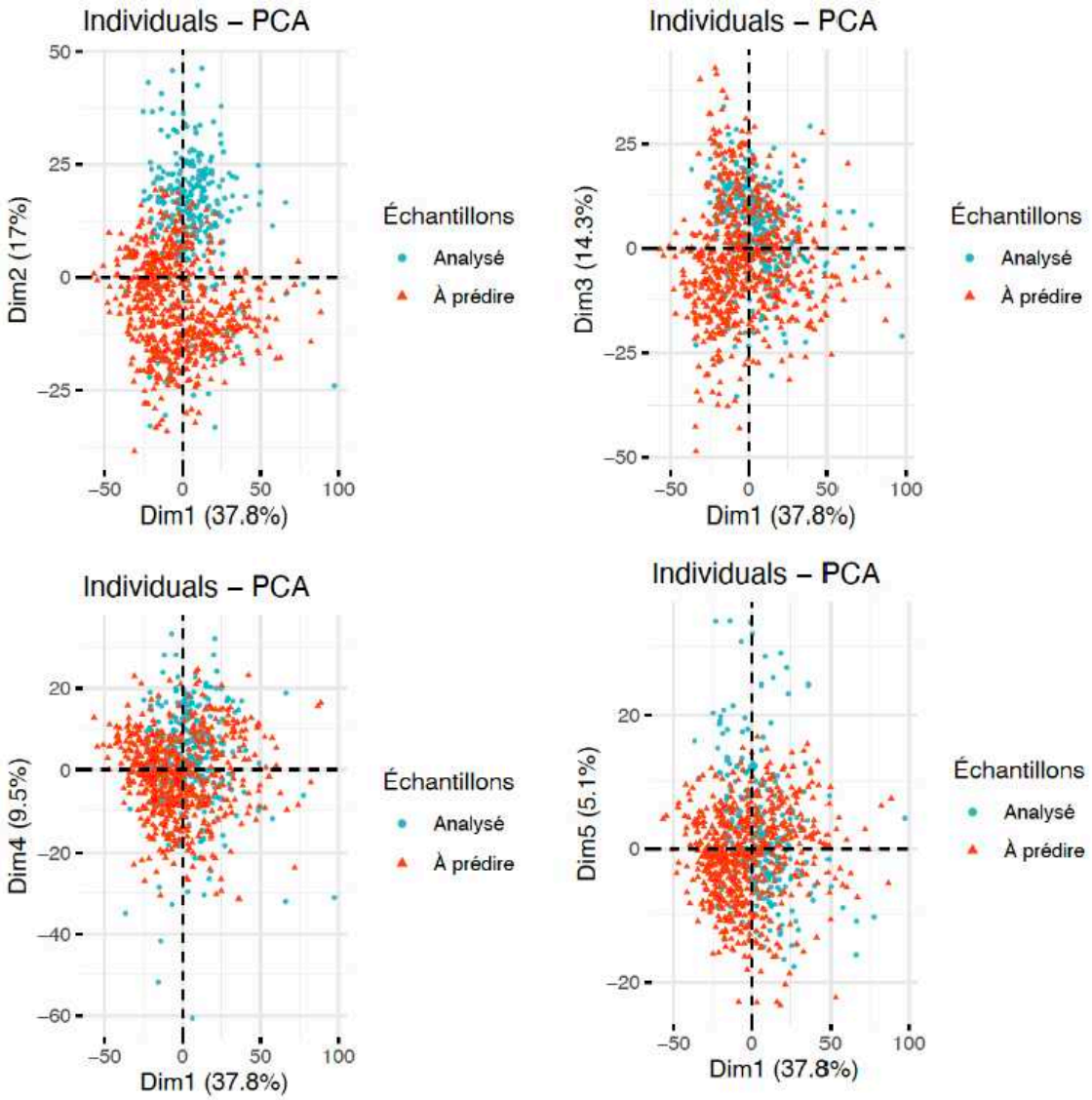


Figure 25. Plans factoriels montrant la superposition des échantillons utilisés pour la construction du modèle et les échantillons à prédire.

Bien qu'une relation significative ait été observée entre l'abondance en ^{15}N ($\delta^{15}N$) et la TN des échantillons analysés, les faibles coefficients de détermination et de corrélation obtenus ne permettent pas de prédire avec précision une variable à partir d'une autre (Figure 26). Par conséquent, nous n'avons pas pu déduire l'abondance en ^{15}N des échantillons non analysés à partir des TN prédits.

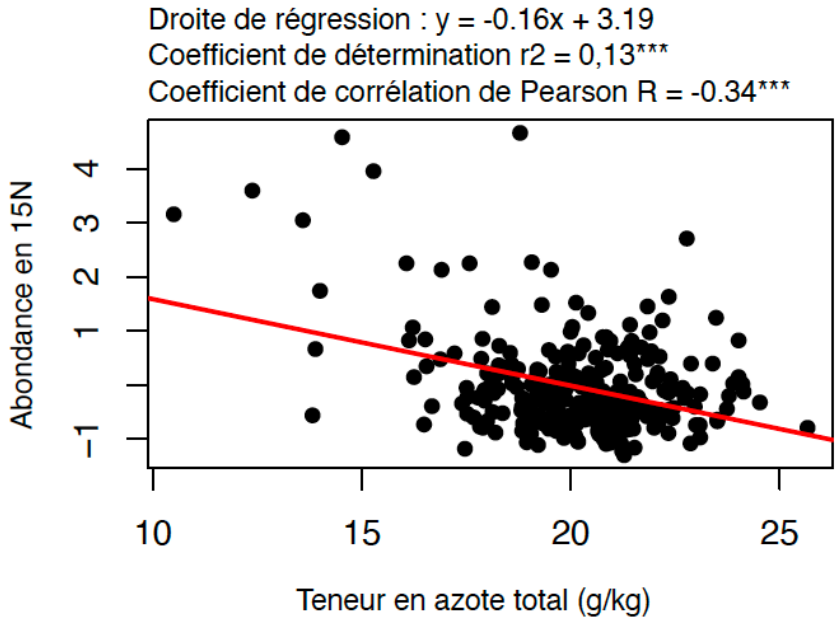


Figure 26. Relation statistique entre la teneur en azote total des fanes et l'abondance en azote ^{15}N des 296 échantillons analysés au laboratoire.
*** indique une significativité à $p < 0.001$.

III.2. Variations des caractères associés à la SFA et des composantes du rendement

Dans chaque environnement, les résultats de l'ANOVA ont montré un effet génotype significatif pour tous les caractères évalués (Tableau XI). Les différences de moyennes observées entre les trois environnements, pour tous les caractères, pourraient être expliquées par des facteurs climatiques tels que la répartition de la pluviométrie. La figure 27 présente la répartition pluviométrique des trois années durant le cycle de développement de la culture. L'environnement DH19 a obtenu le plus faible cumul pluviométrique, mais a montré une meilleure répartition des pluies durant l'ensemble du cycle de développement de la culture. En revanche, bien que l'environnement DH20 ait obtenu le cumul pluviométrique le plus élevé, il a été marqué par une interruption précoce des pluies durant la phase de remplissage, et de maturation des gousses. Des observations similaires ont été également faites dans l'environnement DH21. En outre, le semis tardif dans l'environnement DH21 pourrait également expliquer les faibles valeurs des composantes du rendement. Globalement, les valeurs de coefficients d'héritabilité au sens large ont été moyennes pour le %Ndfa et la TN, et élevées pour les composantes du rendement évalués (Tableau XI). À l'échelle de la population CSSL, en moyenne 60% de l'azote contenu dans les fanes d'arachide à la récolte ont été fournis par la SFA (Tableau XI). Le %Ndfa était compris entre 35% et 75%.

Tableau XI : Statistiques descriptives et héritabilité au sens large pour les caractères associés à la SFA et les composantes du rendement au sein de la population CSSL

Caractères	Env.	Moy±SD	F	*p*value	h^2
%Ndfa	DH19	60.76±8.09	2.49	<0.001***	0.60
TN (g/kg)	DH19	20.25±1.84	1.88	<0.001***	0.46
	DH20	19.87±1.8	2.19	<0.001***	0.54
	DH21	25.79±1.53	1.481	0.012*	0.32
Poids de gousses (g)	DH19	15.39±7.05	2.170	<0.001***	0.53
	DH20	12.29±4.42	4.043	<0.001***	0.75
	DH21	7.50±2.63	4.867	<0.001***	0.79
Poids de fanes (g)	DH19	35.17±14.7	2.575	<0.001***	0.61
	DH20	24.67±10.59	3.569	<0.001***	0.72
	DH21	20.27±5.92	2.870	<0.001***	0.65

%Ndfa : pourcentage en azote fixé des fanes ; TN : teneur en azote total des fanes ; Env. : Environnement ; DH19, DH20, DH21 désignent respectivement l'environnement de DIHIONE en 2019, 2020 et 2021 ; Moy : moyenne ; SD : écart type ; F : F-value associée à l'effet génotype : Pr : *p*-value associée à l'effet fixe génotype, h^2 : héritabilité au sens large. **, et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.01$ et $p < 0.001$.

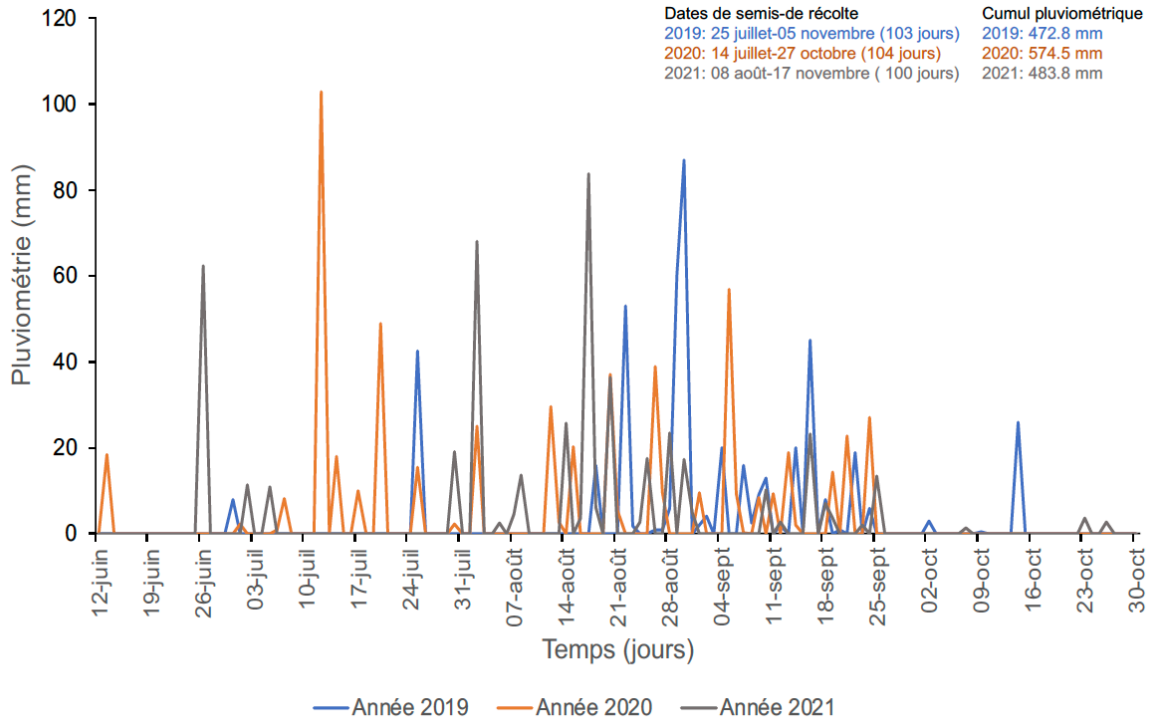


Figure 27. Répartition de la pluviométrie durant les campagnes agricoles de 2019, 2020 et 2021 à Diohine

Le tableau XII présente pour chaque environnement, l'analyse des corrélations entre les caractères associés à la SFA et les composantes du rendement. Aucune relation n'a été observée entre le %Ndfa et la TN des fanes. Tandis qu'une relation positive et significative a été observée entre le %Ndfa et le poids de gousses. Des coefficients de corrélation négatifs mais pas significatifs ont été observés entre la TN et le poids de gousses dans les trois environnements. Concernant le poids de fanes, les coefficients de corrélations positifs obtenus avec le %Ndfa et la TN sont ne sont pas significatifs.

Tableau XII : Corrélations entre les trais associés à la SFA et les composantes du rendement

Environnement	Caractère1	Caractère 2	Coef. corr.
Diohine 2019	%Ndfa	TN	0.09
		Poids de fanes	0.1
		Poids de gousses	0.26*
	TN	Poids de fanes	0.17
		Poids de gousses	-0.2
	Poids de fanes	Poids de gousses	0.55***
Diohine 2020	TN	Poids de fanes	0.15
		Poids de gousses	-0.15
	Poids de fanes	Poids de gousses	0.70***
Diohine 2021	TN	Poids de fanes	0.07
		Poids de gousses	-0.1
	Poids de fanes	Poids de gousses	0.33**

%Ndfa : pourcentage en azote fixé des fanes ; TN : teneur en azote total des fanes (g/kg) ; Coef. Corr. : Coefficients de corrélation de Pearson. *, ** et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$.

III.3. Significativité des associations génotype × phénotype

III.3.1. Caractères associés à la SFA : pourcentage en azote fixé et teneur en azote total

Dans chaque environnement et pour un caractère donné, chaque CSSL a été comparé au parent récurent Fleur11, afin d'identifier les associations génotype × phénotype significatives.

– Pour le pourcentage en azote fixé (%Ndfa), les analyses ont été réalisées uniquement pour l'expérimentation de 2019. Le test de comparaisons multiples de Dunnett a révélé que, 04 lignées avaient un %Ndfa des fanes significativement inférieur à celui de Fleur11 (Figure 28). Les différences relatives entre ces lignées et Fleur11 variaient entre -31.12 et -41.11%.

– Concernant la TN, la lignée 12CS_021 a montré une augmentation significative de la TN de 19.79% par rapport à Fleur11 dans l'environnement DH19 (Figure 29). En 2020, les lignées 12CS_090, 12CS_100 et 12CS_103, ont montré une diminution significative de la TN par rapport à Fleur11 (Figure 29). Les différences relatives entre ces lignées et Fleur11 étaient comprises entre -17 et -19%. Tandis que dans l'environnement DH21, aucune différence a été détectée entre Fleur11 et les CSSL (Figure 29).

III.3.2. Composantes du rendement : poids de gousses et poids de fanes

– Pour le poids de gousses, les analyses statistiques n'ont pas révélé de différences significatives entre les CSSL et Fleur11 dans l'environnement DH19. Dans l'environnement DH20, 09 lignées ont été significativement différentes de Fleur11 (Figure 30). Une lignée (12CS_031) a montré une augmentation significative du poids de gousses de 47.49% comparé à Fleur11, tandis que, 08 lignées ont présenté une diminution significative du poids total de -43 à -63.91% par rapport à Fleur11 (Figure 30). Dans l'environnement DH21, 16 lignées ont montré un poids de gousses significativement inférieur à celui de Fleur11. Les différences relatives entre ces lignées et Fleur11 étaient comprises entre -36.96 et -82.02% (Figure 30).

– Pour le poids de fanes, le test de Dunnett a permis d'identifier 08 CSSL significativement inférieures à Fleur11 dans l'environnement DH19, avec des différences relatives comprises en -51.12 et -81.45% (Figure 31). En 2020, quatre lignées ont été significativement différentes de Fleur11. Une lignée (12CS_092) a montré une augmentation significative du poids de fanes 66.36% par rapport à Fleur11, tandis que, 03 lignées ont présenté une diminution significative du poids fanes de -58.11 à -65.35% par rapport à Fleur11 (Figure 31). En 2021, 03 lignées ont montré un poids de fanes significativement inférieur à celui de Fleur11. Les différences relatives entre ces lignées et Fleur11 étaient comprises entre -43.17 et -57.56% (Figure 31).

Au total, 22 et 09 lignées significativement différentes de Fleur11 ont été identifiées respectivement pour le poids de gousses et le poids de fanes dans les trois environnements. Les lignées 12CS_004, 12CS_044 et 12CS_051 ont montré un poids de fanes inférieurs à celui de Fleur11 dans les trois environnements. Tandis que, les lignées 12CS_044, 12CS_051 et 12CS_110 ont montré un poids de gousses inférieur à celui de Fleur11 uniquement dans les environnements DH20 et DH21.

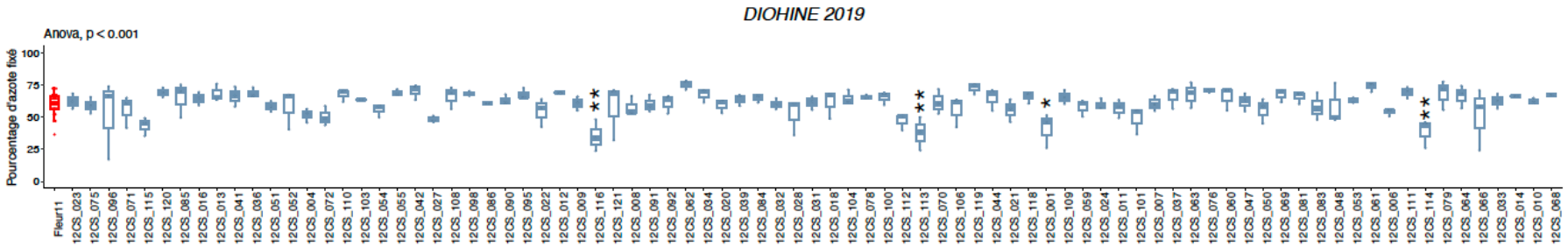


Figure 28. Comparaisons des associations génotype ×pourcentage en azote fixé des fanes entre Fleur11 et les CSSL dans l'environnement de 2019

* et ** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.01$ et $p < 0.001$ avec le test de comparaisons multiples de Dunnett



Figure 29. Comparaisons des associations génotype × teneur en azote total des fanes entre Fleur11 et les CSSL dans chaque environnement

* et ** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.01$ et $p < 0.001$ avec le test de comparaisons multiples de Dunnett

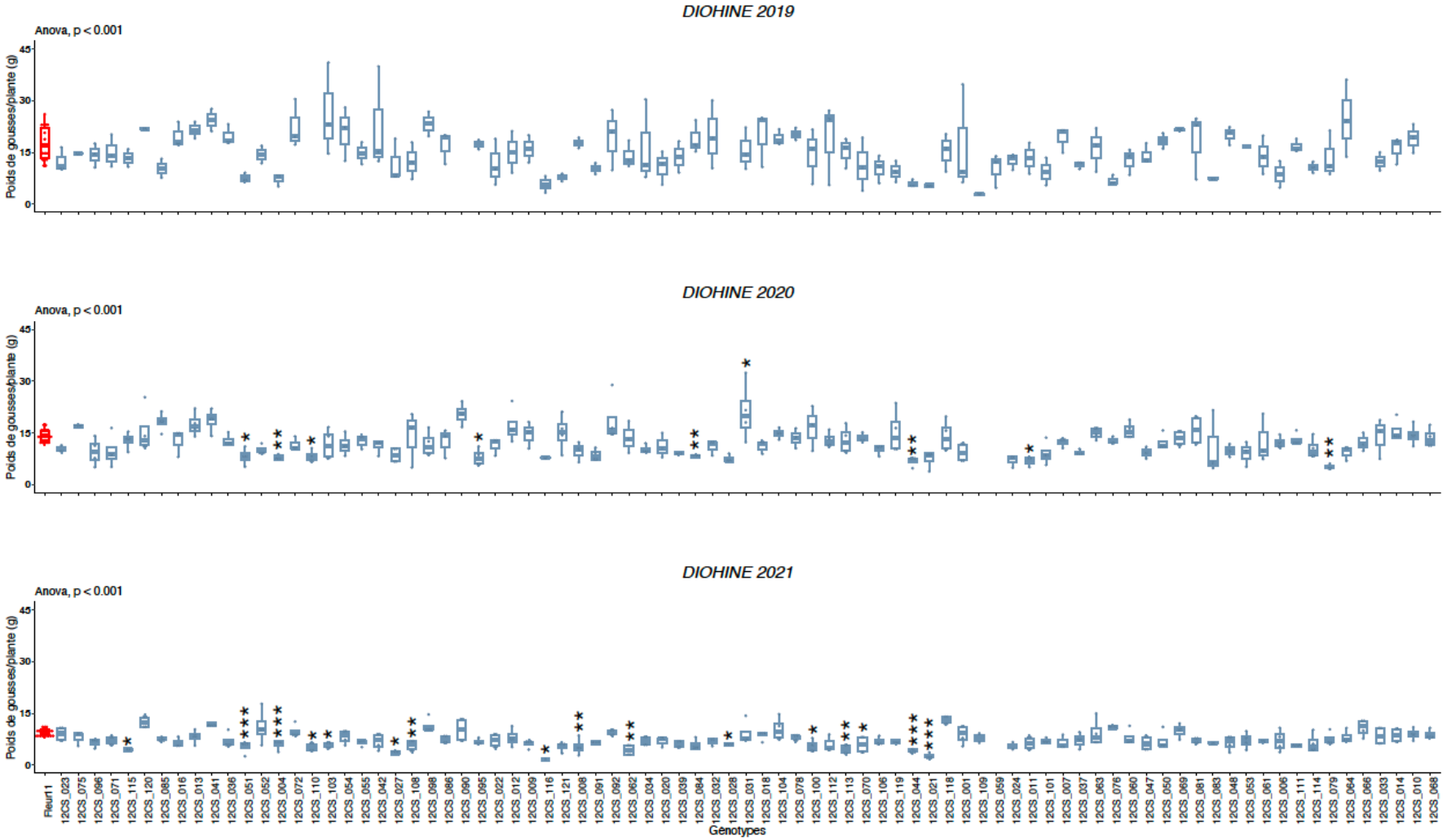


Figure 30. Comparaisons des associations génotype × poids de gousses entre Fleur11 et les CSSL dans chaque environnement

*, ** et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$ avec le test de comparaisons multiples de Dunnett

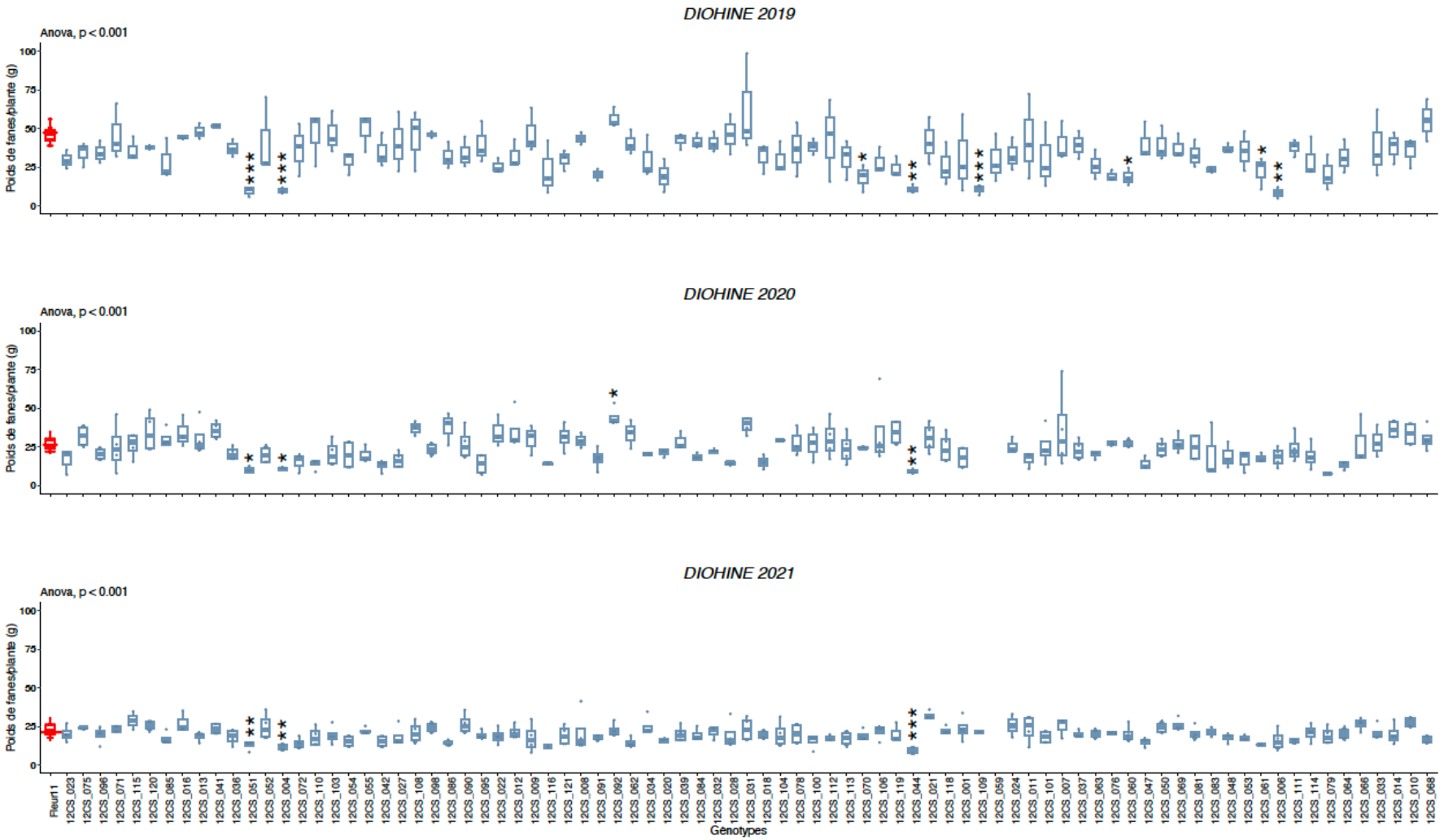


Figure 31. Comparaisons des associations génotype × poids de fanes entre Fleur11 et les CSSL dans chaque environnement

*, ** et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$ avec le test de comparaisons multiples de Dunnett

III.4. Cartographie de QTL

III.4.1. Caractères associés à la SFA

Pour chaque caractère, les lignées ayant montré des différences significatives par rapport à Fleur11, ont été utilisées pour la cartographie de QTL dans chaque environnement. Les QTL identifiés pour chaque caractère sont récapitulés dans le tableau XIII.

– Les associations génotype × %Ndfa ont permis d'identifier 04 QTL localisés sur 04 groupes de liaison (GL). Deux QTL ont été cartographiés sans ambiguïté sur les GLs A05 et B01. Cependant, pour certaines associations génotype × caractère significative, nous n'avons pas été en mesure d'associer sans ambiguïté le QTL à un seul segment de chromosome sauvage, par conséquent, le QTL a été considéré comme putatif, et a été associé à tous les fragments présents dans cette lignée. C'est par exemple le cas de la lignée 12CS_114, qui possède des fragments de chromosomes sauvages sur les GLs A09 et B09, qui se chevauchent avec ceux d'autres lignées similaires à Fleur11.

– Dans l'environnement DH19, un QTL a été associé sans ambiguïté à la TN sur le GL B02. Dans l'environnement DH21, un QTL a été localisé sans ambiguïté sur le GL A10. Tandis que, 03 QTL sur les GLs A03, A04 et A08 ont été considérés comme putatifs.

III.4.2. Composantes du rendement

– Pour le poids de gousses, 09 QTL ont été détectés dans l'environnement DH20. Deux QTL ont été cartographiés sans ambiguïté sur le GL A03, et un QTL sur chacun des GLs A02, A08, A09, B02, B05 et B09. En revanche, un QTL localisé sur le GL A05 a été considéré comme putatif. Dans l'environnement DH21, 16 QTL repartis sur 13 GLs ont été associés au poids de gousses. Deux QTL ont été cartographiés sans ambiguïté sur les GLs A06 et B02, et un QTL sur chacun des GLs A01, A02, A03, A04, A05, A07, A10 et B0. Tandis que, 04 QTL situés sur les GLs A03, A08, A09 et B10 ont été considérés comme putatifs.

– Pour le poids de fanes, 10 QTL ont été identifiés dans l'environnement DH19. Un QTL a été cartographié sans ambiguïté sur chacun des GLs A02, A03, B01, B02 et B08. En revanche, 05 QTL localisés sur les GLs A07, A10, B04, B06 et B08 ont été considérés comme putatifs. Dans l'environnement DH20, quatre QTL ont été cartographiés sans ambiguïté sur les GLs A02, A03, A07 et B02. Dans l'environnement DH21, 03 QTL ont été localisés sans ambiguïté sur les GLs A02, A03 et B02.

Au total 22 et 11 QTL ont été associés respectivement au poids de gousses et au poids de fanes dans les 03 environnements (Tableau XIII). Parmi ces QTL, certains ont été stables, i.e., détectés dans plus d'un environnement. C'est par exemple le cas, de 03 QTL sur les GLs A02, A03 et B02 associés au poids de fanes dans tous les environnements. De même, que les QTL sur les GLs A02, A03 et B02 associés au poids de gousses dans deux environnements.

A l'exception des QTL détectés sur les GLs A09 et B02, pour lesquels les allèles sauvages ont entraîné une augmentation du poids de gousses dans l'environnement DH20 et de la TN dans l'environnement DH19 respectivement, à tous les QTL, les allèles sauvages ont eu des effets dépressifs sur la valeur du caractère étudié.

Tableau XIII : Récapitulatif des associations génotype × caractère significatives et des QTL identifiés pour les caractères de SFA et les composantes du rendement

Caractère	CSSL	GL	Diohine 2019		Diohine 2020		Diohine 2021	
			EQ (%)	Int. Conf. (cM)	EQ (%)	Int. Conf. (cM)	EQ (%)	Int. Conf. (cM)
%Ndfa	12CS_116	A05	-41.11**	66.575-75.2				
	12CS_114	**A09**	-35.3**	91.05-96.1				
	12CS_113	B01	-37.43**	0-9.1				
	12CS_001	B01	-31.12*	0-9.1				
	12CS_114	**B09**	-35.3**	3.45-25.975				
TN	12CS_103	**A03**	ns	.	-19.08**	57.2-74.2	ns	.
	12CS_090	**A04**	ns	.	-17**	90.975-113.15	ns	.
	12CS_103	**A08**	ns	.	-19.08**	46.15-75.525	ns	.
	12CS_100	A10	ns	.	-16.82*	65.375-83.3	ns	.
	12CS_021	B02	19.79*	56.15-82.9	ns	.	ns	.
PG	12CS_115	A01	ns	.	ns	.	-52.6*	58.7-63.3
	12CS_051	A02	ns	.	-43.09*	43.85-55.35	-44.31*	43.85-55.35
	12CS_004	A03	ns	.	-45.51**	0-16.6	ns	.
	12CS_103	**A03**	ns	.	ns	.	-38.71*	57.2-74.2
	12CS_110	A03	ns	.	-43.13*	36.35-57.2	-43.92*	36.35-57.2
	12CS_027	A04	ns	.	ns	.	-61.33	48.975-57.625
	12CS_108	A04	ns	.	ns	.	-40.78**	48.975-57.625
	12CS_095	**A05**	ns	.	-44.87*	0-14.5	ns	.
	12CS_116	A05	ns	.	ns	.	-82.02*	66.575-75.2
	12CS_008	A06	ns	.	ns	.	-43.18**	70.225-73.7
	12CS_121	A06	ns	.	ns	.	-43.62***	0-43.925
	12CS_062	A07	ns	.	ns	.	-53.44***	28.525-60.6
	12CS_084	A08	ns	.	-41.91**	75.525-85.375	ns	.
	12CS_103	**A08**	ns	.	ns	.	-38.71*	46.15-75.525
	12CS_028	**A09**	ns	.	ns	.	-36.96*	7.125-49.375

	12CS_031	A09	ns	.	47.49*	49.375-72.1	ns	.
	12CS_100	A10	ns	.	ns	.	-41.79*	65.375-83.3
	12CS_070	B01	ns	.	ns	.	-36.96*	62.175-70.675
	12CS_113	B01	ns	.	ns	.	-51.16**	62.175-70.675
	12CS_044	B02	ns	.	-52.44**	24.55-43.25	-57.08***	24.55-43.25
	12CS_021	B02	ns	.	ns	.	-72.57***	56.15-82.9
	12CS_011	B05	ns	.	-52.26*	0-13.575	ns	.
	12CS_079	B09	ns	.	-63.91**	31.725-61.7	ns	.
	12CS_028	**B10**	ns	.	ns	.	-36.96*	48.02-55.525
PF	12CS_051	A02	-79.89***	43.85-55.35	-61.18**	43.85-55.35	-43.17**	43.85-55.35
	12CS_004	A03	-78.43***	0-16.6	-58.11*	0-16.6	-48.05**	0-16.6
	12CS_060	**A07**	-59.51*	12.1-28.525	ns	.	ns	.
	12CS_092	A07	ns	.	66.36*	16.6-20	ns	.
	12CS_061	**A10**	-51.12*	23.4-43.35	ns	.	ns	.
	12CS_070	B01	-59.96*	87.525-116.1	ns	.	ns	.
	12CS_044	B02	-76.49**	24.55-43.25	-65.31*	24.55-43.25	-57.56***	24.55-43.25
	12CS_109	**B04**	-76.44***	0-40.875	ns	.	ns	.
	12CS_060	**B06**	-59.51*	16.275-50.95	ns	.	ns	.
	12CS_006	B08	-81.45**	26.95-29.8	ns	.	ns	.
	12CS_060	**B08**	-59.51*	5.25-21.25	ns	.	ns	.
	12CS_061	**B08**	-51.12*	5.25-21.25	ns	.	ns	.

GL indique le groupe de liaison qui porte le segment de chromosome sauvage (QTL) responsable du phénotype ; EQ (%) représente l'effet QTL ou la différence relative entre les CSSL et Fleur11 dans chaque environnement ; Int Conf. indique l'intervalle de confiance du QTL sur le groupe de liaison. Les GLs en gras indiquent les QTL putatifs. %Ndfa : pourcentage en azote fixé des fanes ; TN : teneur en azote total des fanes ; PG : poids de gousses/plante ; PF : poids de fanes/plante ; *, ** et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$ en utilisant le test de comparaisons multiples de Dunnett, ns : non significatif.

IV. Discussion

IV.1. SPIR et prédiction de la teneur en azote total des fanes

La combinaison des données spectrales et chimiques des 296 échantillons analysés, nous a permis de calibrer un modèle de prédiction quantificatif et précis (RPD = 3 et $r^2 = 0.89$) sur la TN des fanes d'arachide. Les principales longueurs d'ondes associées à l'azote étaient comprises entre 1600 et 2250 nm. La gamme de longueurs d'ondes allant 2200 à 2400 nm a été principalement associées la teneur en azote dans les feuilles de coton (Prananto *et al.*, 2021). D'autres études ont montré que, les molécules azotés comme les protéines absorbent la lumière proche infrarouge entre 2000 et 2222 nm (Min & Lee, 2005; Padhi *et al.*, 2022). De plus, les longueurs d'ondes 1420, 1694 et 2160 nm ont été associées à l'absorbance de la chlorophylle

(Liu *et al.*, 2022). Ces différents résultats soutiennent la discrimination des spectres de nos échantillons sur la base de leur teneur en molécules azotés. Ainsi, le modèle de prédiction a été utilisé pour estimer la teneur en azote des échantillons qui n'ont pas été analysés au laboratoire.

IV.2. Relation entre les caractères associés à la SFA et les composantes du rendement

La méthode de l'abondance en azote isotopique ^{15}N ($\delta^{15}N$) a été utilisée pour estimer le %Ndfa au sein de la population CSSL. Les résultats ont montré qu'entre 35.27 et 75.2% de l'azote contenu dans les fanes à la récolte provenaient de la SFA. Cependant, aucune relation a été observée entre le %Ndfa et la TN dans les fanes à la récolte. De plus, des faibles coefficients de corrélation ont été observés entre les caractères liés à la SFA et les composantes du rendement (Tableau XII). Cette absence de corrélations entre le %Ndfa et la TN, peut être liée à la précision de la mesure du $\delta^{15}N$. Pour tester cette hypothèse, nous avons fait analyser cinq échantillons de fanes d'arachide choisis au hasard par deux laboratoires. Les résultats ont montré des différences importantes sur la teneur en $\delta^{15}N$ des échantillons entre les deux laboratoires, mais également pour un échantillon répété au sein d'un même laboratoire (Annexe 1). En revanche, pour chaque échantillon, toutes les mesures de la TN ont été globalement similaires (Annexe 1).

Ces résultats montrent qu'une mesure précise du $\delta^{15}N$ n'est pas triviale. D'autres études ont rapporté des différences importantes sur la mesure du $\delta^{15}N$ pour un même échantillon de légumineuse analysé dans différents laboratoires (Okito *et al.*, 2004; Unkovich, 2013). Si les différences de mesures entre les laboratoires pourraient s'expliquer par différentes méthodes de préparation des échantillons ou par l'étalonnage par rapport au N_2 atmosphérique, les différences observées entre les mesures répétées d'un échantillon au sein d'un même laboratoire restent difficiles à expliquer. Une source probable de ces différences pourrait être liée à l'hétérogénéité de poudre de l'échantillon, au moment du prélèvement de l'aliquote (petites quantités < 2 mg) à analyser. Selon que l'aliquote contient plus ou moins des particules de biomasse issues des tiges, des feuilles et des racines, la mesure du $\delta^{15}N$ pourrait être différente. Sachant que, des signatures différentes de $\delta^{15}N$ ont été rapportées entre les différentes parties de la plante chez le soja (Wanek & Arndt, 2002). Une autre source de variation pourrait être liée à une limite de détection du $\delta^{15}N$ des fanes. Cette hypothèse suppose qu'une remobilisation importante de l'azote vers les graines, aurait conduit à des faibles teneurs en azote des fanes, qui se trouveraient dans la limite de détection $\delta^{15}N$ par le spectromètre de masse. Chez les légumineuses à graines, les besoins en azote pendant la période remplissage des graines sont

généralement supérieurs à l'azote fourni par l'absorption et la SFA. Par conséquent, l'azote précédemment accumulé dans les parties végétatives de la plante est remobilisé pour enrichir les graines en azote. La remobilisation de l'azote vers les graines a été bien décrite chez les légumineuses à croissance déterminée. Chez le niébé, (*Vigna unguiculata*) 40% de l'azote des graines sont fournis par la SFA après la floraison, le reste de l'azote est issu de la remobilisation de l'azote fixé avant la floraison (Peoples *et al.*, 1983). Zeiher *et al.* (1982) ont trouvé que 30 à 100 % de l'azote de graines de soja provenait de la remobilisation de l'azote des parties végétatives. Pampana *et al.* (2016) ont rapporté une remobilisation de l'azote vers les graines à partir des tiges et feuilles (58 à 85%), des racines (11 à 37%) et des nodules (environ 8%) chez des légumineuses à graines telles que le pois chiche (*Cicer arietinum*), la féverole (*Vicia faba*), le pois (*Pisum sativum*) et le lupin (*Lupinus albus*) cultivées en champ. Les auteurs de cette étude ont également montré que 26 à 42% de l'azote fixé entre la floraison et la récolte sont directement stockés dans les graines. Bien que l'arachide cultivée, soit une légumineuse à croissance indéterminée (i.e., que la plante continue à fleurir durant la formation des gousses), le stress hydrique causé par l'arrêt des pluies pendant le remplissage des gousses, pourrait contrainte la plante à adopter le mode de fonctionnement des légumineuses à croissance déterminée, en mobilisant ses ressources vers ses graines.

IV.3. Variabilité et cartographie de QTL des caractères associés à la SFA et des composantes du rendement

Dans chacune des trois expérimentations réalisées en champ paysan, un effet génotype significatif a été observé au sein de la population CSSL, pour tous les caractères liés à la SFA et les composantes du rendement évalués (Tableau XI). Les associations génotype × phénotype ont permis d'identifier des régions du génome qui expliquent une part des variations phénotypiques observées. Pour les caractères liés à la SFA, 04 QTL ont été associés au %Ndfa des fanes dans l'environnement DH19. Tandis que, 05 QTL ont été associés à la TN des fanes dans les environnements DH19 et DH20. Aucun QTL de TN n'a été détecté dans plus d'un environnement. Ce qui suggère une interaction QTL-environnement, qui se traduit par une influence prépondérante des conditions environnementales (valeurs d'héritabilité comprises entre 0.32 et 0.54) sur la variation de ce caractère. Parmi les QTL associés aux caractères de SFA en conditions naturelles, 03 QTL avaient été rapporté précédemment en conditions semi-contrôlées. Il s'agit des QTL sur les GLs A03 et A08 associés à une réduction de la teneur en chlorophylle et de la biomasse chez la lignée 12CS_103, et d'un QTL localisé sur le GL A04 qui est responsable de la diminution de biomasse chez la lignée 12CS_090 (voir paragraphe

III.2.2 du chapitre 2). Toutefois, ces QTL avaient été identifiés uniquement dans une seule expérimentation. La SFA est un processus biologique complexe, difficile à mesurer et fortement influencé par les conditions environnementales (Arrendell *et al.*, 1988; Dwivedi *et al.*, 2005, 2015). Lorsqu'un caractère est fortement influencé par les conditions environnementales, les effets des QTL et de l'environnement peuvent être confondus (Fasoula *et al.*, 2004; Tossim *et al.*, 2020).

Au total, 31 QTL repartis sur 18 GLs ont été associés aux poids de gousses et de fanes dans tous les environnements. De nombreuses études ont montré que, les composantes du rendement sont des caractères quantitatifs complexes gouvernés par plusieurs gènes chez des cultures telles que le soja (Sun *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2017), le haricot commun (Sonah *et al.*, 2015), le riz (Zhao *et al.*, 2022; Ashfaq *et al.*, 2022), et l'arachide (Fonceka *et al.*, 2012a; Huang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019; Tossim *et al.*, 2020). Parmi les QTL des composantes du rendement, 03 QTL localisés sur les GLs A02, A03 et B02 ont été associés à une diminution du poids de fanes respectivement chez les lignées 12CS_051, 12CS_004 et 12CS_044 dans les trois environnements. De même, 03 QTL situés sur les GLs A02, A03 et B02 ont été associés à une diminution du poids de gousses respectivement chez les lignées 12CS_051, 12CS_110 et 12CS_044 dans deux environnements. Il est remarquable de noter, que les QTL identifiés en champ chez les lignées 12CS_051, 12CS_004 et 12CS_044 avaient été précédemment associés de manière pertinente à une réduction de la teneur en chlorophylle, de la biomasse et des caractères de nodulation en conditions contrôlées et semi-contrôlées. En outre, les variations phénotypiques observées chez ces lignées en champ paysan, n'ont pas été rapportées sur les parcelles fertilisées (150 kg/ha de 6-20-10 avant semis, 100 kg/ha de 46-00-00 au 15ème jours après semis, et 200 kg/ha de 9-23-30 au 30ème jours après semis) des stations expérimentales de l'ISRA à Sinthiou Malèm et au CNRA de Bambey (Tossim, 2014). Ces résultats suggèrent d'une part que, la faible productivité observée chez ces lignées en champ paysan, pourrait être liée à une faible capacité à fixer l'azote, et d'autre part que, ces QTL seraient spécifiques aux conditions de faible fertilité du sol. Il convient de signaler que, le développement de variétés à haut rendement s'effectue communément dans des conditions optimales en station expérimentale, pourtant les variétés développées sont pour la plupart cultivées dans des conditions de faibles fertilité en Afrique de l'Ouest. Par conséquent, ces QTL dépressifs en conditions de faible fertilité ne sont pas détectés par les sélectionneurs, et peuvent dans une certaine mesure expliquer une part de la faible adoption de certaines variétés améliorées par les agriculteurs.

Par ailleurs, certaines régions identifiées en champ dans notre étude avaient été précédemment associées à d'autres composantes du rendement, au sein la même population CSSL ou une population AB-QTL développée à partir des mêmes parents évaluée sur des parcelles fertilisées. C'est par exemple le cas du QTL sur le GL A09 associé à une augmentation du poids de 100 gousses et de 100 graine chez la lignée 12CS_031(Fonceka *et al.*, 2012a; Tossim *et al.*, 2020), ou du QTL sur le GL B08 associé à une réduction du poids de 100 gousses chez la lignée 12CS_006 (Tossim *et al.*, 2020).

Globalement, les allèles sauvages aux QTL identifiés dans cette étude ne permettent pas d'améliorer significativement les caractères liés à la SFA et les composantes du rendement de l'arachide cultivée, dans des conditions de faible fertilité de sol. Ces résultats confirment les observations précédentes faites en conditions contrôlées et semi-contrôlées, qui ont révélé que les espèces sauvages (*A. duranensis* et *A. ipaensis*) utilisées dans le développement de cette population CSSL, ne seraient pas des sources d'allèles favorables pour optimiser la SFA de l'arachide cultivée. Par conséquent, l'hypothèse qui suppose un impact négatif de la domestication et de la sélection variétale sur les performances symbiotiques de l'arachide cultivée au Sénégal serait infirmée.

V. Conclusion

Dans ce chapitre une population de 83 lignées de substitution de segments chromosomiques a été utilisée pour cartographier les QTL associés aux caractères liés à la symbiose fixatrice d'azote (SFA) et les composantes du rendement chez l'arachide cultivée en milieu paysan. La spectrométrie proche infrarouge s'est avérée être une alternative efficace et peu couteuse pour la détermination de la teneur en azote total des fanes d'arachide à la récolte. Une variabilité significative de tous les caractères évalués a été détectée, et au total 09 et 31 QTL ont été associés respectivement aux caractères liés à la SFA et les composantes du rendement. Les allèles sauvages aux QTL identifiés, ont eu un effet dépressif sur les caractères ciblés. Aucune relation significative n'a été trouvée entre les caractères liés à la SFA et les composantes du rendement, ce qui suscite une réflexion sur le bon indicateur et la quantification de la SFA en champ. Toutefois, parmi les QTL associés aux composantes du rendement, 03 QTL avaient été associés précédemment à la réduction de l'efficacité symbiotique dans des conditions contrôlées et semi-contrôlées, et n'avaient pas été identifiés dans des conditions fertilisées en station expérimentale. Ce qui suggère que la réduction des composantes du rendement en conditions de faibles fertilité pourrait être liée à une faible efficacité dans la SFA. Des études

supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir établir une relation directe entre les performances agronomiques et symbiotiques dans les conditions de culture étudiées. Ces résultats fournissent des informations utiles aux sélectionneurs, pour l'élimination des allèles sauvages défavorables dans les conditions de sol appauvris en azote.

CHAPITRE 4 : ÉTUDE DE LA SPÉCIFICITÉ CSSL-*Bradyrhizobium*

Les principaux résultats de ce chapitre de thèse ont fait l'objet de 03 séminaires scientifiques.

Title: Study of QTL effects on peanut-*Bradyrhizobium* specificity

- À l'Université de Rio Cuarto, 09 mars 2023, Argentine.
- À L'Institut de physiologie végétale et des ressources génétiques de Cordoba, 14 mars 2023 en Argentine.
- À l'institut de biotechnologie et biologie moléculaire de l'Université nationale de La Plata, 22 mars 2023, Argentine.

Résumé

Le choix du partenaire (spécificité) est un facteur déterminant dans la mise en place d'une symbiose légumineuse-*rhizobia* efficace. Cependant, les mécanismes génétiques qui sous-tendent cette spécificité demeurent peu connus chez des légumineuses comme l'arachide. Dans ce chapitre, nous avons étudié la spécificité symbiotique de 05 lignées de substitutions de segments chromosomiques et de leur parent récurent la variété Fleur11, vis-à-vis de la diversité de *rhizobia* associés à l'arachide cultivée au Sénégal. La variété Fleur11 a montré une efficacité symbiotique « souche dépendante » associée à la phylogénie de la bactérie, en formant des nodules très efficaces (Nod+Fix++), peu efficaces (Nod+Fix+) et inefficaces (Nod+Fix-) respectivement avec les souches ISRA400, ISRA432 et ISRA463. En revanche, les lignées 12CS_004 et 12CS_044 ont montré un phénotype Nod+Fix- avec les souches ISRA400 et ISRA432. Un phénotype Nod+Fix+ a été observé chez la lignée 12CS_051 avec les souches ISRA400 et ISRA432, mais l'efficacité symbiotique a été considérablement réduite par rapport à celle observée chez Fleur11. De même, l'interaction entre la lignée 12CS_084 et la souche ISRA400 aboutie à la formation d'un phénotype Nod+Fix+. Ces résultats traduisent une incompatibilité tardive ou de fixation d'azote. Les observations histologiques ont montré que cette incompatibilité s'assimilerait à un mécanisme de « sanction » des nodules peu ou pas efficaces. Elle se manifeste par une altération de l'infection des cellules et/ou par une proportion importante de bactéroïdes morts à l'intérieur des cellules. Les introgressions portées par ces lignées seraient impliquées dans le contrôle du symbiote bactérien durant le processus symbiotique. Cette étude fournit des informations préliminaires à la compréhension des mécanismes génétiques qui régulent de l'incompatibilité tardive chez l'arachide.

I. Introduction

La symbiose légumineuse-*rhizobia* est un processus hautement spécifique (Walker *et al.*, 2020). Au-delà de la spécificité avec la famille des légumineuses, les espèces ou génotypes de légumineuses ne peuvent établir une symbiose efficace qu'avec un nombre limité d'espèces ou de souches bactériennes, et vice-versa. La spécificité légumineuse-*rhizobia* est un facteur clé dans l'efficacité symbiotique, et serait régulée par des mécanismes génétiques complexes (Wang *et al.*, 2012). La compréhension des mécanismes moléculaires qui gouvernent la spécificité symbiotique fournirait des informations utiles, pour l'amélioration génétique de la symbiose légumineuse-*rhizobia*, à travers soit un élargissement du spectre d'hôtes des souches bactériennes très performantes dans la fixation d'azote, ou soit en excluant les souches

indigènes du sol peu efficaces ou inefficaces par une sélection des génotypes de légumineuses à haute spécificité (Yang *et al.*, 2010).

L'établissement de la symbiose nécessite une série d'échanges de signaux moléculaires entre la plante et bactérie, incluant d'une part les flavonoïdes exsudés par les racines de la plante, et d'autre part des lipochitooligosaccharides, appelés facteurs Nod (FN), qui sont sécrétés par la bactérie (Oldroyd, 2013; Roy *et al.*, 2020). Chez la plupart des légumineuses, ce dialogue moléculaire conditionne la reconnaissance ou la spécificité entre les deux partenaires. En plus des FNs, d'autres molécules bactériennes telles que les effecteurs qui sont des protéines sécrétées par le système de sécrétion de type III (T3SS) ou les molécules de surface telles que les exopolysaccharides (EPS), jouent également un rôle important dans la détermination du spectre d'hôte (Oldroyd & Downie, 2008). La reconnaissance entre les deux partenaires conduit à la formation d'un primordium nodulaire et à l'invasion des cellules de la plante par les bactéries. Au cours du processus de développement du nodules, les cellules végétales sont colonisées par des bactéries différentiées en bactéroïdes, et entourées par une membrane d'origine végétale, qui délimite un nouvel organite fixateur d'azote appelé symbiosome (Kondorosi *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2020). Les cellules végétales subissent également une différenciation à travers une série d'endoréduplications, qui aboutissent à leur élargissement, avant d'être remplies par de nombreux symbiosomes (Vinardell *et al.*, 2003).

Une incompatibilité entre les deux partenaires peut survenir à différentes étapes du processus symbiotique. Elle peut se manifester durant les étapes précoces de la symbiose, incluant la reconnaissance entre les deux partenaires, la formation et l'infection du primordium nodulaire (incompatibilité précoce ou de spécificité) (Wang *et al.*, 2012). Une incompatibilité précoce peut aboutir à l'absence de nodules (phénotype Nod-Fix-), ou à la formation des nodules qui ne sont pas infectés (phénotype Nod+Fix-). Elle peut être causée par une absence de reconnaissance des FNs ou des exopolysaccharides (Morgante *et al.*, 2005, 2007; Radutoiu *et al.*, 2007; Patra & Mandal, 2022) ou par des mécanismes de défense induits par la plante (Yang *et al.*, 2010). L'incompatibilité peut également se produire durant le développement et le fonctionnement des nodules (incompatibilité tardive ou de fixation d'azote) (Wang *et al.*, 2012). Dans ce cas, l'interaction aboutit à la formation de nodules, qui sont infectés mais déficients dans la fixation d'azote (phénotype Nod+Fix- ou Nod+Fix+) (Heath, 2010; Sachs *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014). Chez les légumineuses appartenant au clade des IRLC (inverted repeat lacking clade), telles que le pois (*Pisum sativum*) et *Medicago truncatula*, des études ont démontré que l'incompatibilité tardive serait associée à la sécrétion de certains peptides riches en cystéine par la plante, qui sont spécifiques aux nodules et impliqués dans la différentiation bactérienne à

l'intérieur des nodules (Horváth *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017a). Toutefois, les mécanismes moléculaires impliqués dans une incompatibilité tardive demeurent encore peu élucidés.

L'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.) est une légumineuse qui établit préférentiellement la symbiose avec les espèces de bactéries du genre *Bradyrhizobium*. Au Sénégal, une analyse de la diversité génétique et de la fixation d'azote des *rhizobia* natifs associés à l'arachide cultivée a révélé, une large diversité génétique repartie en 03 groupes phylogénétiques de *Bradyrhizobium* sp., dont 02 regroupent des souches efficaces, tandis que le troisième groupe est constitué de souches inefficaces (Zaiya *et al.*, 2018). Dans le chapitre 2 de ce travail de thèse, l'évaluation de la performance symbiotique d'une population de 83 lignées de substitutions de segments chromosomiques (CSSL) avec une souche efficace *Bradyrhizobium vignae* ISRA400, a permis d'identifier 04 CSSL qui portent des fragments de chromosomes sauvages responsables d'une diminution de l'efficacité symbiotique chez l'arachide cultivée. Dans ce quatrième chapitre, nous avons exploité la diversité génétique des *rhizobia* associées à l'arachide cultivée au Sénégal, afin d'analyser la spécificité symbiotique de ces lignées vis-à-vis d'autres souches sénégalaises.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal et souches bactériennes

Le matériel végétal est constitué de la variété cultivée Fleur11 (parent récurent) et de 05 CSSL sélectionnées sur la base de leurs performances symbiotiques dans l'interaction avec la souche efficiente ISRA400. En comparaison à Fleur11, 04 CSSL (12CS_004, 12CS_044, 12CS_051, 12CS_084) ont montré une diminution significative des caractères liés à la nodulation, tandis que la lignée 12CS_114 a montré une augmentation de l'efficacité symbiotique, bien qu'elle ne soit pas statistiquement significative. Les souches bactériennes ont été constituées de trois souches de *Bradyrhizobium* sp. (ISRA400, ISRA432 et ISRA463) précédemment isolées des nodules d'arachide cultivée au Sénégal. Ces souches sont représentatives de la diversité des *rhizobia* associés à l'arachide cultivée au Sénégal (Zaiya *et al.*, 2018), et ont été fournies par la collection du laboratoire commun de microbiologie de Dakar Bel-Air. ISRA400 appartient au groupe des souches les plus efficaces (groupe A), ISRA432 appartient au groupe des souches moyennement efficaces (groupe B), et la souche ISRA463 appartient au groupe des souches inefficaces (groupe C) (Figure 10).

II.2. Conditions expérimentales et phénotypage

Pour chaque génotype, les graines ont été désinfectées avec une solution d'hypochlorite de calcium à 7%, avant d'être mises en germination sur milieu eau gélosée pendant trois jours à 28°C (Zaiya *et al.*, 2018). Par la suite, les graines germées ont été transférées en pots Magenta (Sigma) contenant de la vermiculite stérile (Somasegaran & Hoben, 1994) et la solution nutritive BNM sans azote (Ehrhardt *et al.*, 1992). Les plantes ont été cultivées en chambre de culture suivant un cycle photopériodique de 16 h de lumière et 8h d'obscurité, une température à 28°C, une humidité à 70% et une intensité lumineuse d'environ 277 $\mu mol.m^2.s^{-1}$. Deux types de traitements ont été appliqués : sans azote (-N ou control), et sans azote + inoculé avec une souche de *Bradyrhizobium* sp. Les trois souches ISRA400, ISRA432 et ISRA463 ont été testées en monoinoculation. Pour chaque souche, l'inoculum a été produit par culture dans le milieu Yeast Mannitol (Vincent, 1970), pendant 4 jours à 28 °C. Ensuite, l'inoculation a été réalisée sur des plantes jeunes âgées de sept jours (stade deux premières feuilles épanouies), avec 1 ml d'une suspension cellulaire (absorbance ~0.7 à 600 nm). Le dispositif expérimental était un block complet randomisé avec quatre répétitions. Trente-cinq jours après inoculation, les caractères liés à la symbiose fixatrice d'azote tels que la teneur chlorophylle (SPAD), la biomasse sèche (TB), l'activité de nitrogénase (ARA), le poids sec de nodules (PSN) et le nombre de nodules (NN) ont été évalués. L'expérimentation a été répétée deux fois.

II.3. Analyses cytologiques

Une analyse cytologique a été réalisée afin d'examiner la structure et le fonctionnement des nodules suivant l'association CSSL-*Bradyrhizobium*. Trente-cinq jours après inoculation, des nodules frais ont été prélevés des racines, inclus dans la gélosée à 4%, et coupés en sections de 80 µm d'épaisseur à l'aide d'un vibratome VT1000S (Leica Biosystems, Allemagne). Les coupes obtenues ont été incubées successivement dans les solutions live/dead staining (5 µM SYTO 9 and 30 µM propidium iodide in 50 mM Tris pH 7.0 buffer; live/dead BacLight, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) pendant 15 min, et de calcofluor white M2R (0,01 % wt/vol in 10 mM phosphate saline buffer, Sigma, Munich, Germany) pendant 15 min à l'obscurité (Nagata & Takebe, 1970). Par la suite, les sections colorées ont été montées entre lames et lamelles dans une goutte de tampon phosphate salin-glycérol (vol/vol), avant d'être observées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser LSM 700 (Carl Zeiss, Allemagne). Le SYTO9 et l'iodure de propidium ont été excités à 488 et 555 nm respectivement, pour une gamme d'émission de 490-522 nm et 555-700 nm. Pour le calcofluor, l'excitation a été réalisée à 405 nm et la gamme

d'émission a été de 405 à 470 nm. Pour analyser la structure des nodules, les sections de nodules ont été également observées au microscope à contraste interférentiel AZ (Nikon, Japan).

II.4. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R. Pour un caractère donné, la normalité et l'homogénéité de la variance ont été vérifiées respectivement avec les tests de Kolmogorov-Smirnov et de Levene. L'analyse de variance (ANOVA) a été réalisée pour chaque expérimentation afin d'estimer les effets génotype/souche et répétition sur chaque caractère évalué en utilisant le modèle linéaire standard :

$$y_{ij} = \mu + G_i + r_j + \varepsilon_{ij}$$

Où y_{ij} = valeur observée du génotype/souche i dans la répétition j ; μ = valeur moyenne de la population ; G_i = effet du génotype ou souche i ; r_j = effet de la répétition j ; ε_{ij} = erreur résiduelle.

A partir des résultats de l'ANOVA obtenus pour un caractère donné, le test de comparaisons multiples de moyennes de Duncan du package agricolae (Mendiburu, 2023), a été utilisé pour identifier les différences entre les souches chez chaque génotype. Le test de comparaisons moyennes deux à deux de Dunnett (Dunnett, 1985) du package multcomp (Hothorn *et al.*, 2008) a été appliqué pour montrer les différences entre Fleur11 et les lignées dans chaque traitement. Lorsque pour un caractère donné, la distribution normale ou l'homogénéité de variance n'est pas respectée, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis ou Kruskal.test (Hollander *et al.*, 2013) a été utilisé pour analyser la variance et identifier les groupes.

III. Résultats

III.1. Analyse de la réponse à l'inoculation

Pour évaluer la compatibilité CSSL-*Bradyrhizobium*, nous avons analysé la réponse à l'inoculation de 05 CSSL et de la variété cultivée Fleur11 (parent récurrent) avec 03 souches de *Bradyrhizobium* (ISRA400, ISRA432, ISRA463), qui sont représentatives de la diversité des *rhizobia* associés à l'arachide cultivée au Sénégal (Zaiya *et al.*, 2018). Pour chaque plante, les caractères liés à symbiose fixatrice d'azote ont été évalués à 35 jours après inoculation.

III.1.1. Effet de la souche bactérienne sur l'efficacité symbiotique

Le tableau XIV récapitule pour chaque souche bactérienne, les coefficients de corrélation observés entre l'activité de la nitrogénase et les autres caractères évalués chez tous les génotypes. Les fortes corrélations observées avec les souches ISRA400 et ISRA432, suggèrent

une relation positive et significative entre la fixation d'azote, la formation et développement des nodules, et les caractères de croissance de la plante. En revanche, chez la souche ISRA463, à l'exception d'une corrélation positive et significative observée avec la teneur en chlorophylle des feuilles, les coefficients de corrélations sont faibles et non significatifs, ce qui suggère qu'il n'y a pas de relation entre la fixation d'azote et les caractères liés à l'accumulation de biomasse, la formation et développement de nodules. Par ailleurs, la relation positive et significative entre l'activité de la nitrogénase et la teneur en chlorophylle observée chez chaque souche, suggère que la teneur en chlorophylle serait un bon indicateur pour discriminer les génotypes suivant leurs efficacités symbiotiques en conditions contrôlées.

Tableau XIV : Relation entre les caractères liés à la symbiose fixatrice d'azote

		Coef. Corr. par souche		
Caractère1	Caractère2	ISRA400	ISRA432	ISRA463
Activité de la nitrogénase	Teneur en chlorophylle	0.81***	0.41**	0.58***
	Biomasse totale	0.80***	0.63***	0.1
	Poids sec de nodules	0.96***	0.96***	0.28
	Nombre de nodules	0.84***	0.96**	-0.03
	Ratio poids et nombre de nodules	0.77***	0.46**	0.4

Coef. Corr : coefficient de corrélation de Pearson (ISRA400, ISRA432) et de Spearman (ISRA463). *, **, et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$.

L'ANOVA de l'activité de la nitrogénase (ARA), a révélé une réponse à l'inoculation « souche dépendante » chez Fleur11 (Figure 32). Globalement, la fixation d'azote est plus élevée avec la souche ISRA400, et décroît progressivement avec les souches ISRA432 et ISRA463. Dans des travaux précédents, Zaiya *et al.* (2018) ont étudié l'efficacité symbiotique de Fleur11 inoculée avec les *Bradyrhizobium* associés à l'arachide cultivée au Sénégal. Ils ont montré que, l'efficacité symbiotique est « souche dépendante », et liée à la diversité de la bactérie. Ils ont distingué 03 groupes : (i) les souches efficaces telle que ISRA400 ; (ii) les souches globalement moins efficaces parmi lesquelles ISRA432 ; et (iii) les souches inefficaces telle que ISRA463. Ainsi, ces résultats nous ont permis de confirmer et de valider les variations phénotypiques observées dans nos expérimentations. Un effet souche similaire à celui décrit chez Fleur11, a été observé chez les lignées 12CS_051, 12CS_084 et 12CS_114 (Figure 32). En revanche, chez les lignées 12CS_004 et 12CS_044, l'ARA demeure très faible quelle que soit la souche (Figure 32). Les résultats d'ANOVA obtenus pour les autres caractères sont consignés dans l'annexe 2.

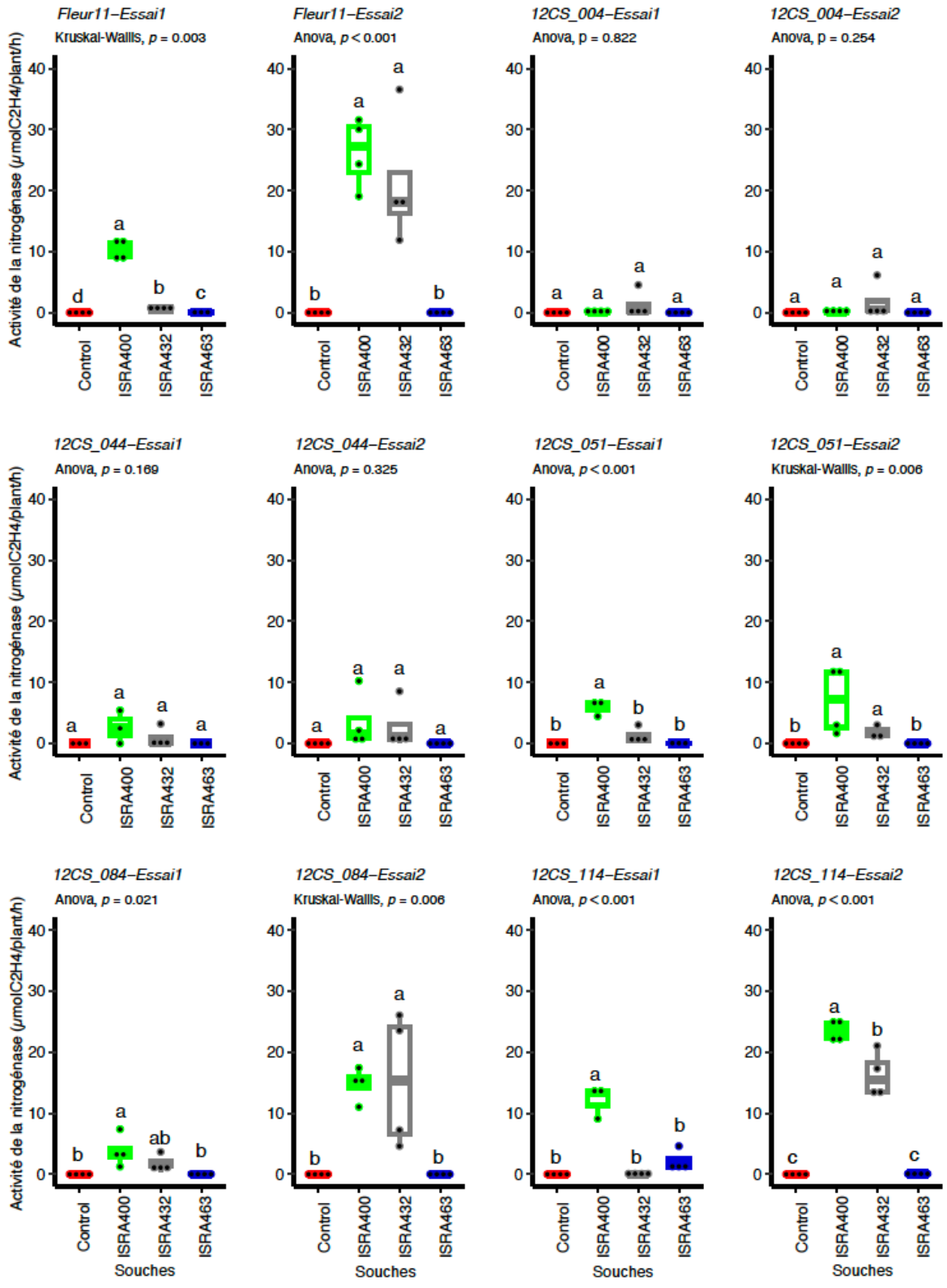


Figure 32. Variation de l'activité de la nitrogénase en fonction de la souche de *Bradyrhizobium* sp. Control ou témoin négatif indique les plantes non inoculées ; ISRA400, ISRA432, ISRA463 indiquent des souches de *Bradyrhizobium* isolées des sols du Bassin arachidier du Sénégal. Les boxplots avec des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0.05$).

Une analyse multivariée réalisée sur l'ensemble des caractères évalués a permis de résumer environ 93% de la variance étudiée et de constituer 03 groupes suivant l'efficacité symbiotique des combinaisons plante-*Bradyrhizobium* (Figure 33). Le groupe « Fix++ » désigne les plantes avec une efficacité symbiotique élevée. Il comprend uniquement la lignée 12CS_114 et la variété Fleur11 inoculées avec la souche ISRA400. Le second groupe « Fix+ » inclus la lignée 12CS_114 et la variété Fleur11 inoculées avec la souche ISRA432, ainsi que les lignées 12CS_051 et 12CS_084 inoculées avec les souches ISRA400 et ISRA432. Ce groupe correspond aux plantes inoculées qui ont une efficacité symbiotique moyenne ou faible. Le troisième groupe « Fix- » désigne les plantes inoculées qui présentent une très faible efficacité symbiotique. Ces plantes sont très proches des plantes non inoculées, ce qui pourrait signifier une fixation d'azote très faible ou nulle. Ce groupe comprend les lignées 12CS_004 et 12CS_044 inoculées avec chaque souche, ainsi que tous les autres génotypes inoculés avec la souche ISRA463.

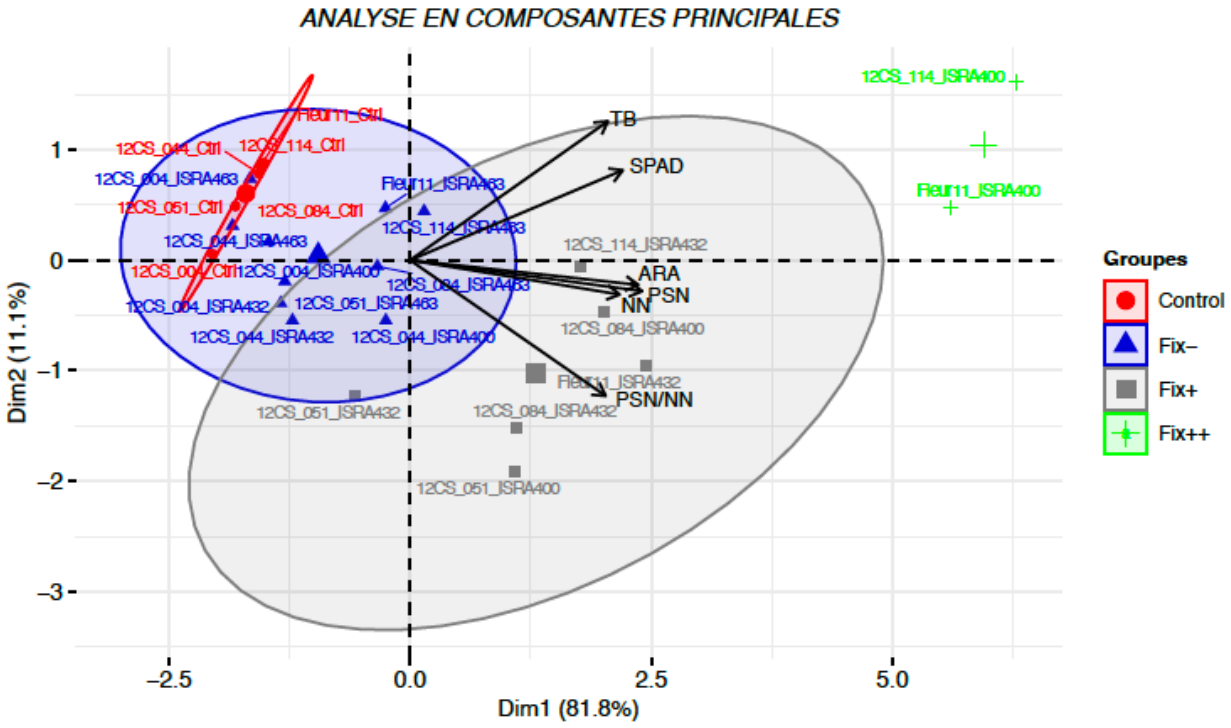


Figure 33. Analyse en composantes principales

SPAD : teneur en chlorophylle des feuilles ; TB : Biomasse totale ; ARA : activité de la nitrogénase ; PSN : Poids sec de nodules ; NN : nombre de nodules.

III.1.2. Effet du génotype de la plante sur l'efficacité symbiotique

Trente-cinq jours après inoculation, les caractères de croissance et de nodulation des lignées ont été comparés à ceux du parent récurent Fleur11 afin d'identifier les différences dans chaque traitement. Pour la teneur en chlorophylle des feuilles, le test de comparaison de Dunnett a montré qu'il n'y a pas de différence entre Fleur11 et les CSSL avec le traitement sans azote (-N) (Figure 34). En revanche, avec le traitement -N+ISRA400, les lignées 12CS_004, 12CS_044, 12CS_051 et 12CS_084 ont montré une diminution significative (53 – 75%) de la teneur en chlorophylle dans les deux expérimentations (Figure 34). Ces 04 lignées ont également montré une diminution significative de la teneur en chlorophylle de 29 – 47% avec le traitement -N+ISRA432, et de 21 – 34 % avec le traitement -N+ISRA463 dans la seconde expérimentation (Figure 34). Une augmentation significative de la teneur en chlorophylle de 20% a été observée chez la lignée 12CS_114 avec le traitement -N+ISRA463 uniquement dans la seconde expérimentation (Figure 34). Concernant la production de biomasse, à l'exception de la baisse de biomasse observée chez la lignée 12CS_004 dans la première expérimentation, aucune différence n'a été détectée entre les CSSL et Fleur11 avec le traitement -N (Figure 35). Tandis que, avec le traitement -N+ISRA400, les lignées 12CS_004, 12CS_044 et 12CS_051 ont montré une diminution significative de la biomasse (23 – 43%) par rapport à Fleur11 dans les deux expérimentations (Figure 35). Chez la lignée 12CS_114, une augmentation significative de la biomasse totale de 16% a été détectée dans une seule expérimentation. Avec les traitements -N+ISRA432 et -N+ISRA463, aucune différence significative de biomasse n'a été identifiée entre les CSSL et Fleur11 (Figure 35).

Pour les caractères de nodulation, les résultats d'analyses statistiques ont également permis d'identifier les différences entre les CSSL et Fleur11 dans chaque traitement inoculé (Figure 36). Chez la lignée 12CS_004, une réduction significative de tous les caractères de nodulation a été observée avec le traitement -N+ SRA400 dans les deux expérimentations. Des résultats similaires ont été obtenus avec le traitement -N+ISRA432, mais uniquement dans une expérimentation. Tandis que, avec le traitement -N+ISRA463, la lignée 12CS_004 a montré un poids sec de nodules, un nombre de nodules et un poids moyen de nodule significativement inférieurs à ceux de Fleur11 dans une expérimentation (Figure 36). Chez la lignée 12CS_044, à l'exception du nombre de nodules, une diminution significative a été observée pour tous les caractères de nodulation avec le traitement -N+ISRA400 dans les deux expérimentations. L'activité de la nitrogénase a été significativement inférieure à celle de Fleu11 avec le traitement -N + ISRA432 dans une expérimentation. En plus, le poids sec et le nombre de nodule ont été significativement inférieurs à ceux de Fleur11 avec les traitements -N+ISRA432

et -N + ISRA463 dans une expérimentation (Figure 36). Chez la lignée 12CS_051, une diminution significative de l'activité de la nitrogénase a été observée avec le traitement -N+ISRA400 dans les deux expérimentations. En outre, une diminution significative a été observée dans une expérimentation, pour le poids sec de nodules avec les trois traitements, pour le nombre de nodules avec les traitements -N+ISRA432 et -N+ISRA463, et pour l'activité de la nitrogénase avec le traitement -N+ISRA432 (Figure 36). Chez la lignée 12CS_084, une réduction significative de l'activité de la nitrogénase et du poids sec de nodules a été identifiée avec le traitement -N + ISRA400 dans les deux expérimentations. En outre, le poids moyen du nodule a été significativement inférieur à celui de Fleur11 dans une expérimentation. Avec les traitements -N+ISRA432 et -N+ISRA463, aucune différence n'a été observée entre Fleur11 et la lignée 12CS_084 (Figure 36). Chez la lignée 12CS_114, aucune différence n'a été observée par rapport à Fleur11 avec les traitements -N+ISRA400 et -N+ISRA432. En revanche, avec le traitement -N+ISRA463, bien que la lignée 12CS_114 a produit significativement moins de nodules que Fleur11, elle a montré une augmentation significative de l'activité de la nitrogénase et du poids moyen du nodule dans les deux expérimentations.

En résumé, la comparaison de la performance symbiotique entre les CSSL et de Fleur11 inoculées avec les *Bradyrhizobium* du Sénégal a montré que, à l'inverse de Fleur11, les lignées 12CS_004 et 12CS_044 n'ont pas une réponse à l'inoculation « souche dépendante ». La forte réduction de la performance symbiotique observée par rapport à Fleur11 avec toutes les souches inoculées, suggère que les introgressions sauvages portées par ces lignées pourraient jouer un rôle essentiel dans l'infection ou l'organogénèse du nodule. Par ailleurs, chez les lignées 12CS_051, 12CS_084 et 12CS_114, la réponse à l'inoculation est « souche dépendante » comme chez Fleur11, mais avec des niveaux variables. Ces observations indiquent que, les introgressions sauvages portées par ces lignées, affecteraient essentiellement le développement et le fonctionnement du nodule.

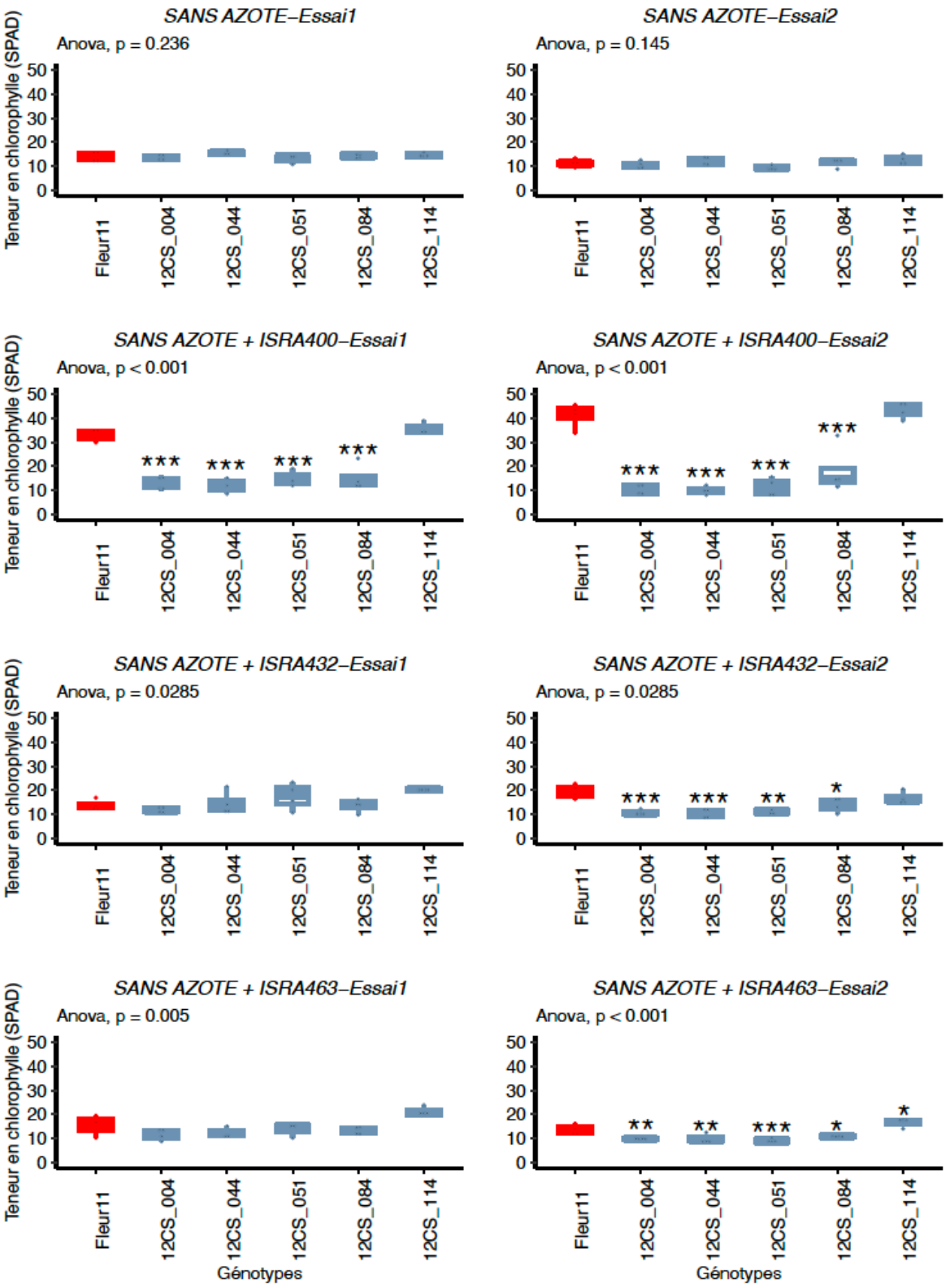


Figure 34. Variation de la teneur en chlorophylle des feuilles entre les CSSL et Fleur11

*, **, et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$ en utilisant le test de Dunnett.

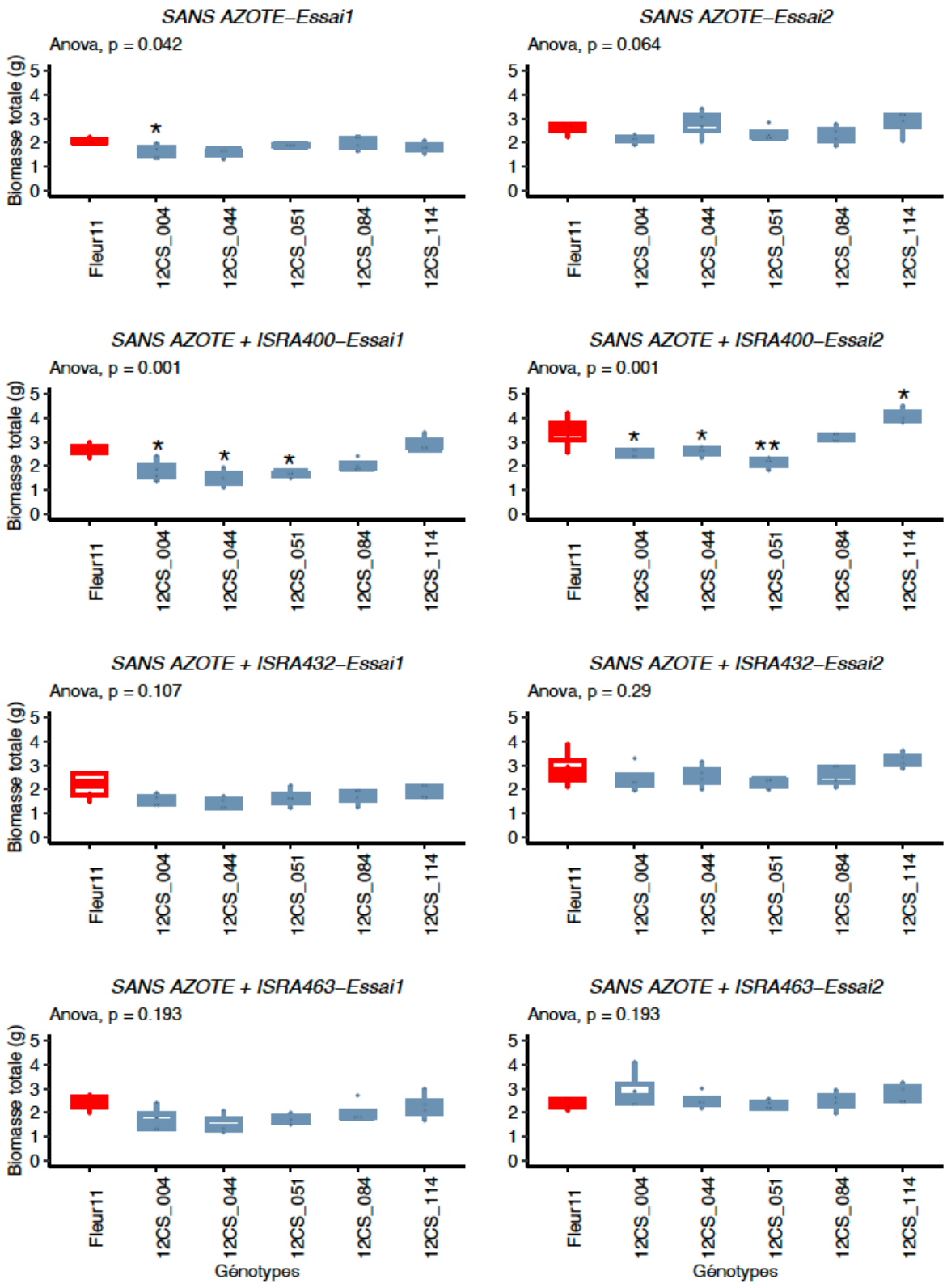


Figure 35. Variation de la biomasse totale entre les CSSL et Fleur11

*, **, et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$ en utilisant le test de Dunnett.

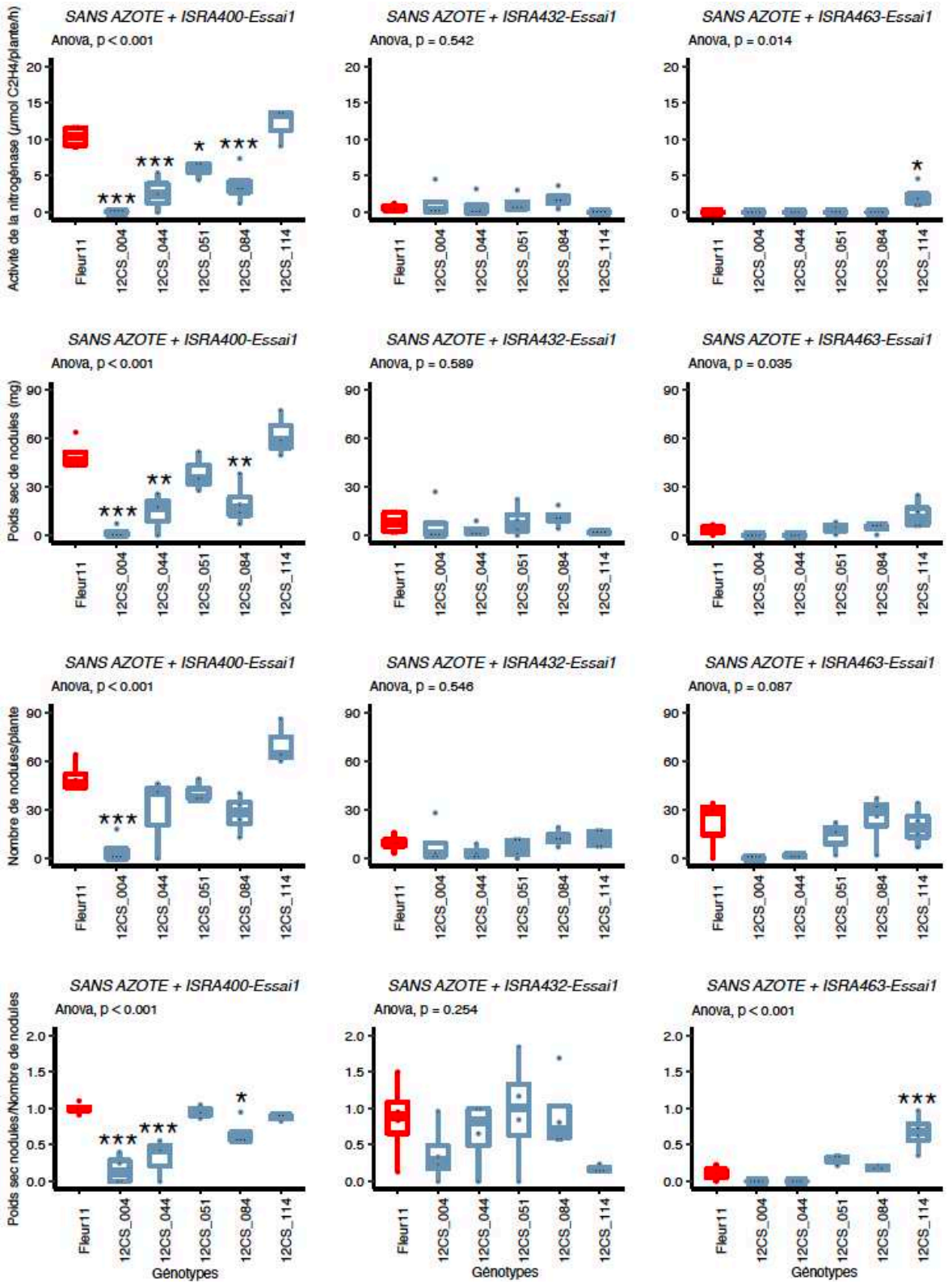


Figure 36. (Suite)

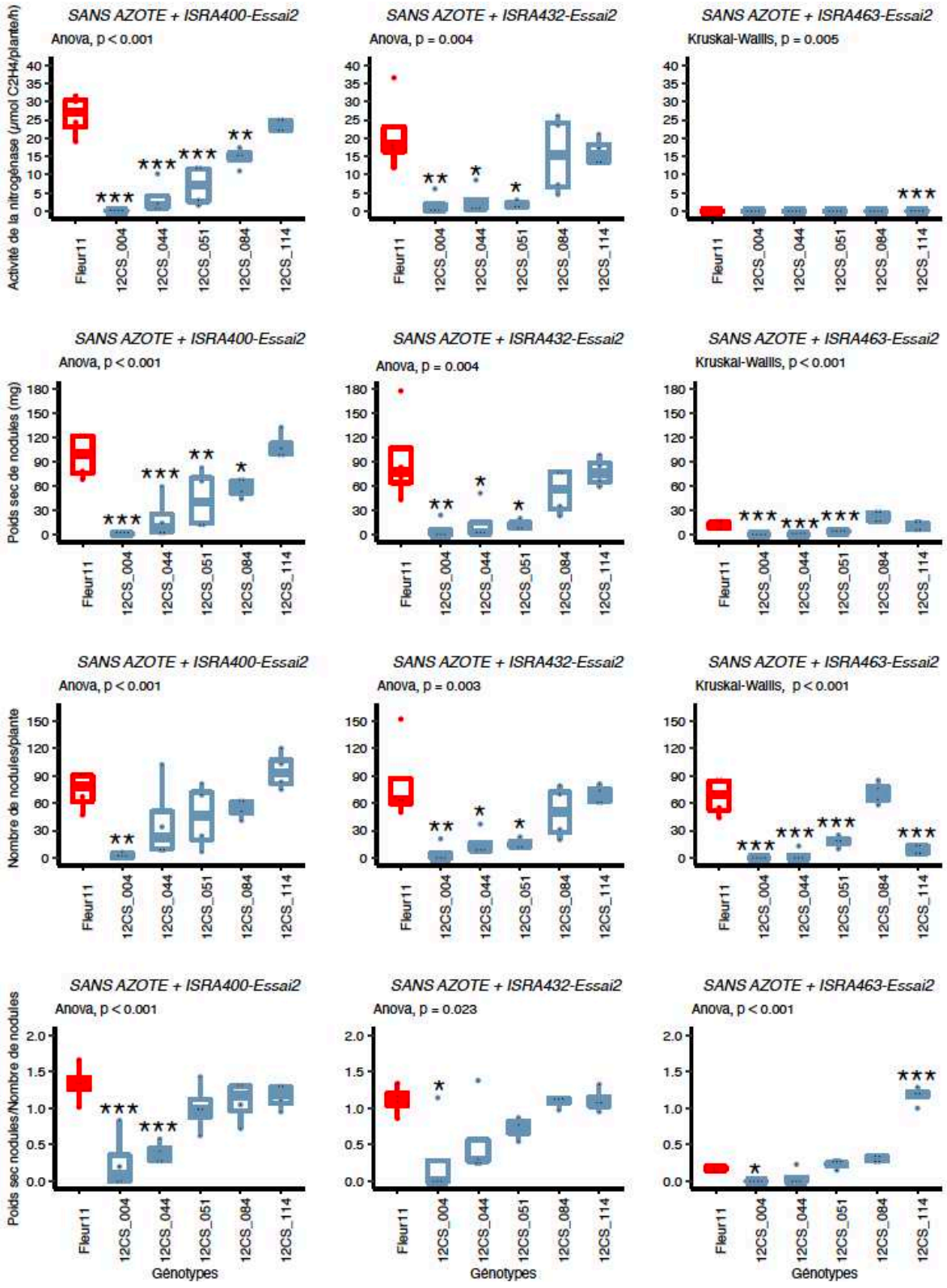


Figure 36. Variation des traits de nodulation entre les CSSL et Fleur11

*, **, et *** indiquent respectivement la significativité à $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$ en utilisant le test de Dunnett.

III.1.3. Analyse comparative de l'infection et de la colonisation des nodules

Les analyses cytologiques des coupes de nodules ont montré que, avec les souches ISRA400 et ISRA432, la variété Fleur11 a formé des gros nodules, et dont les cellules sont infectées par des bactéries différentiées en bactéroïdes (Planche 5a, b, d, e, g, h). En revanche, avec la souche ISRA463, Fleur11 a formé des nodules plus petits, et dont les cellules ne sont pas infectées par les bactéries (Planche 5c, f, i). Ces dernières ont été retrouvées dans l'espace intercellulaire (Planche 5, i). Ces observations pourraient expliquer la faible performance symbiotique observée chez les plantes inoculées avec la souche ISRA463 (Figure 33).

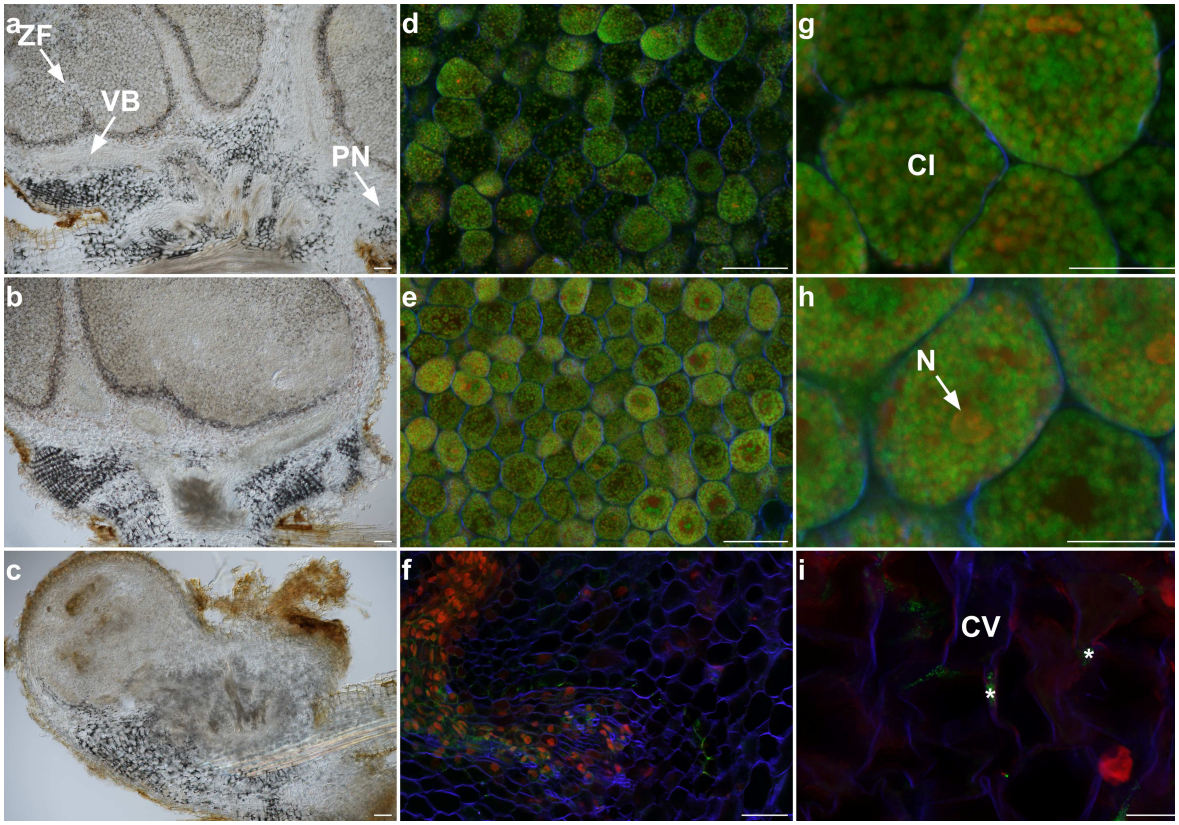


Planche 5. Coupes longitudinales des nodules de Fleur11 inoculées avec 03 souches de *Bradyrhizobium* sp. associées à l'arachide cultivée au Sénégal.

(a, d, g), (b, e, h) et (c, f, i) désignent respectivement les nodules de Fleur11 avec la souche ISRA400, ISRA432 et ISRA463. (a-c) correspondent aux images microscopiques à contraste interférentiel montrant la structure du nodule, (d-i) correspondent aux images microscopiques confocales présentant l'infection et la colonisation des cellules végétales. ZF : zone de fixation ; PN : parenchyme nodulaire ; VB : vaisseaux conducteurs ; CI : cellules infectées par des bactéries différentiées en bactéroïdes (forme arrondie) ; CV : cellules vides ou non infectées ; N : noyau. Les astérisques indiquent la présence intercellulaire des bactéries. Barre échelle = 50 µm (a-f) et 20 µm (g-i).

Toutes les CSSL forment des nodules avec des cellules infectées, lorsqu'elles sont inoculées avec les souches ISRA400 et ISRA432. Globalement, les lignées 12CS_084 et 12CS_114 ont montré une colonisation des cellules végétales par les bactéries, similaire à celle décrite chez Fleur11. En revanche, une faible colonisation des cellules et/ou une proportion importante de bactéroïdes à priori non viables à l'intérieur des cellules ont été observées avec les souches ISRA400 et ISRA432 dans les nodules des lignées 12CS_004 (Planche 6a, d), 12CS_044 (Planche 6b, e), et 12CS_051 (Planche 6c, f).

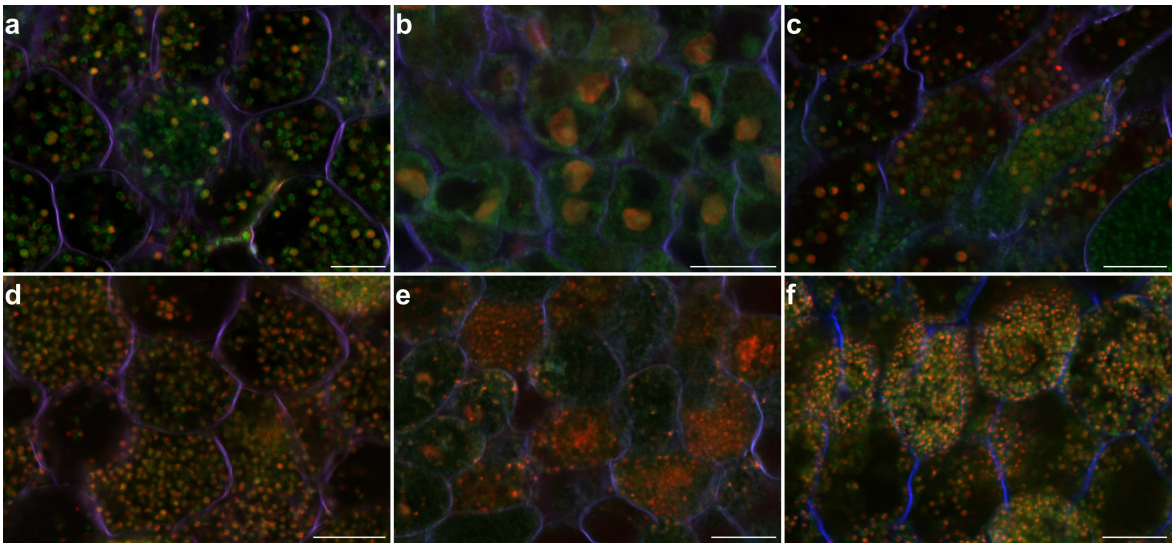


Planche 6. Observations microscopiques confocales des cellules de nodules de 03 CSSL inoculées avec les souches de *Bradyrhizobium* sp. ISRA400 et ISRA432

(a-c) et (d-f) montrent respectivement la colonisation des cellules des nodules des lignées par la souche ISRA400 et ISRA432. Les bactéroïdes vivants sont de couleur verte, tandis que ceux qui sont morts sont de couleur rouge. Lignée 12CS_004 (a, d) ; lignée 12CS_044 (b, e) et lignée 12CS_051 (c, f). barre d'échelle = 20 µm.

L'absence d'infection de cellules des nodules par la souche ISRA463, telle que décrite chez Fleur11 a été également observée chez toutes les CSSL, à l'exception de la lignée 12CS_114. En effet, la lignée 12CS_114 a formé avec la souche ISRA463, quelques nodules plus gros que ceux de Fleur11, et dont les cellules sont infectées par des bactéries (Planche 7). Ces observations pourraient être associées à l'augmentation de l'activité de la nitrogénase et du poids sec de nodules observée chez la lignée 12CS_114 par rapport à Fleur11 (Figure 36). Bien que, la souche ISRA463 infecte les cellules des nodules chez la lignée 12CS_114, la colonisation des cellules par les bactéries est faible comparée à celle observée dans les nodules formés avec les souches ISRA400 et ISRA432, et ce qui se traduit par un décollement des membranes cellulaires (Planche 5g, h).

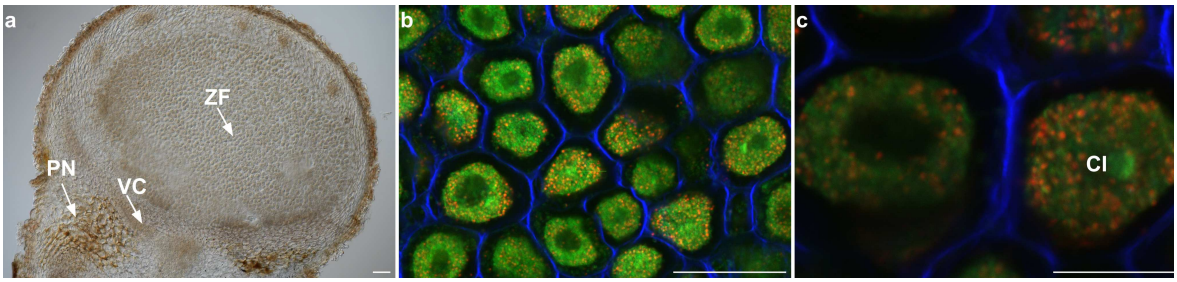


Planche 7. Coupes longitudinales des nodules de 12CS_114 inoculée avec *Bradyrhizobium* sp. ISRA463.

nodule, (b-c) correspondent aux images microscopiques confocales présentant l'infection et la colonisation des cellules végétales. ZF : zone de fixation ; PN : parenchyme nodulaire ; VC : vaisseaux conducteurs ; CI : cellules infectées par des bactéries ou bactéroïdes (vert = vivant et rouge = mort). Barre échelle = 50 µm (a-b) et 20 µm (c).

IV. Discussion

IV.1. Spécificité symbiotique de la variété Fleur11

Les résultats de cette étude ont montré que la variété Fleur11, a une efficacité symbiotique « souche dépendante », associée à la phylogénie de la bactérie. Les souches ISRA400 et ISRA432 forment des nodules normaux infectés par les bactéries différentiées en bactéroïdes fixateurs d'azote, bien que à des niveaux variables (Nod+Fix++/Nod+Fix+). En revanche, la souche ISRA463 forme des petits nodules non infectés et non fixateurs (Nod+Fix-). La formation de nodules dans les interactions avec toutes les souches testées, suggère une production de FNs fonctionnels par chaque souche, et que l'infection et le développement du nodule déterminent la compatibilité des deux partenaires. Le phénotype Nod+Fix- observé avec la souche ISRA463 serait une incompatibilité précoce, et pourrait être liée à la production d'exopolysaccharides par la bactérie. Les EPS peuvent faciliter l'infection des cellules par la bactérie, durant le processus symbiotique en inhibant les mécanismes de défense de l'hôte (Jones *et al.*, 2007). La suppression de la sécrétion des EPS (succinoglycane) chez *Sinorhizobium meliloti*, empêche l'infection des cellules végétales, et conduit à l'obtention d'un phénotype Nod+Fix- avec *M. truncatula* (Simsek *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014). Morgante *et al.* (2005) ont montré qu'une altération la production des EPS, entrave considérablement l'infection des nodules chez l'arachide. Une seconde hypothèse pouvant expliquer ce phénotype impliquerait la sécrétion d'effecteurs bactériens, qui pourrait activer les mécanismes de défense de la plante, et entraver le processus de nodulation. L'annexe 3 présente une analyse de

similarité des effecteurs bactériens identifiés chez les *Bradyrhizobium* associés à l'arachide cultivée au Sénégal (Ibanez *et al.*, communication personnelle). Cette analyse a montré que, les effecteurs NopAA/GunA et NopD sont présents chez la souche inefficace ISRA463 et absents chez les souches efficaces ISRA400 et ISRA432. Le rôle de ces effecteurs durant l'infection des *rhizobia*, a été démontré chez le soja et niébé (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020; Dorival *et al.*, 2020). Des études futures seront nécessaires afin de vérifier le rôle de la sécrétion de ces effecteurs ou des EPS durant le processus symbiotique chez l'arachide cultivée.

IV.2. Spécificité symbiotique des CSSL

L'analyse de la compatibilité symbiotique des lignées de substitutions de segments chromosomiques (CSSL), revient à apprécier l'impact des introgressions sauvages portées par ces lignées sur la compatibilité symbiotique de leur parent récurrent Fleur11. À l'exception de la lignée 12CS_114, l'interaction de toutes les lignées avec la souche ISRA463 a abouti à la formation de nodules non infectés (Nod+Fix-). Ce qui signifie que, les introgressions sauvages présentes chez ces lignées n'affectent pas l'incompatibilité précoce observée chez Fleur11. Cependant, bien que la lignée 12CS_114 a formé des nodules infectés avec la souche ISRA463, et que ceux-ci fixent plus d'azote que ceux de Fleur11 avec la même souche, cette interaction symbiotique reste inefficace (Nod+Fix-) (Figures 33 et 36). Ces résultats suggèrent que, le fragment de chromosome sauvage porté par cette lignée pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de l'incompatibilité précoce en favorisant l'infection bactérienne.

A l'inverse de Fleur11, qui a montré un phénotype Nod+Fix++ et Nod+Fix+ respectivement, avec les souches ISRA400 et ISRA432, les lignées 12CS_004 et 12CS_044 ont formé des nodules plus petits et infectés, mais avec une fixation d'azote très faible ou nulle (Nod+Fix-) (Figures 33 et 36). La lignée 12CS_051 a formé des nodules infectés et fixateurs d'azote (Nod+Fix+) dans l'interaction avec les souches ISRA400 et ISRA432 mais l'efficacité symbiotique a été considérablement réduite par rapport à celle observée chez Fleur11 (Figures 33 et 36). Des observations similaires ont été faites dans la symbiose entre la lignée 12CS_084 et la souche ISRA400 (Figures 33 et 36). Nous en déduisons que, les introgressions sauvages portées par ces lignées contiendraient des gènes impliqués dans une incompatibilité tardive ou de fixation d'azote. Les analyses cytologiques des nodules ont montré que cette incompatibilité se manifeste par une faible colonisation des cellules et/ou une proportion importante de bactéroïdes morts à l'intérieur des cellules, ce qui pourrait traduire un mécanisme de sanction des nodules par la plante. Chez d'autres légumineuses, il a été également démontré que certains *rhizobia* pouvaient former des nodules fixateurs avec un génotype (Nod+Fix+), et des nodules

non fixateurs avec un autre (Nod+Fix-) (Tirichine *et al.*, 2000; Simsek *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010). Lorsque dans une interaction symbiotique, les nodules sont infectés par une bactérie qui fournit peu ou pas d'azote, la légumineuse peut induire une senescence précoce des nodules, ce qui entrave considérablement la viabilité des bactéroïdes dans les cellules (Sachs *et al.*, 2010; Oono *et al.*, 2011; Regus *et al.*, 2017a). Pierre *et al.* (2013) ont montré que, une étape clé de la senescence précoce consiste à l'interruption du développement et de la viabilité du symbiosome. Par ailleurs, une restriction en oxygène des nodules par la plante, pourrait également être un mécanisme de régulation de la viabilité des bactéroïdes peu ou pas fixateurs, en limitant leur respiration (Kiers *et al.*, 2003).

IV.3. Description de gènes candidats pouvant expliquer les phénotypes de quelques lignées

Dans le deuxième chapitre de cette thèse, nous avons analysé les gènes contenus dans les QTL identifiés chez ces lignées. Au total, 17 orthologues de gènes symbiotiques avaient été identifiés (Tableau IX). Les phénotypes des mutants de certains de ces gènes décrits chez d'autres légumineuses, sont similaires à ceux observés chez les lignées CSSL. C'est par exemple le cas de la lignée 12CS_004, dont le QTL identifié sur le groupe de liaison (GL) A03 comporte 07 orthologues de gènes symbiotiques décrits. Parmi ces orthologues, on retrouve les orthologues de *MtCRE1* (*Aradu.UYZ93*) ou de *GmINS1* (*Aradu.JZT13*). *MtCRE1* est impliqué dans la signalisation et la perception des cytokinines (Plet *et al.*, 2011). Une inhibition de *MtCRE1* conduit à un arrêt prématuré de la croissance des cordons d'infection, et affecte l'expression des nodulines telles que *MtNIN* essentielle à l'organogénèse du nodule chez *M. truncatula* (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006). Les mutants *MtCRE1* ont présenté un phénotype Nod+Fix-. Une suppression de l'expression de *GmINS1* conduit à une incompatibilité de fixation chez le soja, qui se manifeste par une réduction considérable de la fixation d'azote, de la capacité à former les nodules, et du nombre de cellules infectées dans les cellules (Li *et al.*, 2018). Chez les lignées 12CS_051 et 12CS_044, quatre orthologues de gènes symbiotiques ont été détectés respectivement sur chacun des GLs homéologues A02 et B02. Parmi ces orthologues, une mutation du gène *MtVAMP721* (*Aradu.Q6WYU*/*Araip.5U4XM*) pourrait expliquer les phénotypes des lignées. Il a été démontré qu'une mutation de *MtVAMP72* bloque la formation du symbiosome chez *M. truncatula* (Ivanov *et al.*, 2012). L'absence de symbiosome aboutie à la formation de nodules incapables de fixer l'azote (Fix-), ce qui pourrait induire des mécanismes de sanctions de la plante vis-à-vis des nodules inefficaces. Par ailleurs, les différences de phénotypes entre les lignées 12CS_051 et 12CS_044, pourraient s'expliquer par

une régulation différentes du gène *MtVAMP721* entre les deux sous-génomes A (*A. duranensis*) et B (*A. ipaensis*).

V. Conclusion

L'établissement d'une symbiose légumineuse-*rhizobia* nécessite une reconnaissance de signaux entre les deux partenaires, qui aboutit à la formation d'un nodule fixateur d'azote. Si les mécanismes génétiques de l'incompatibilité symbiotique précoce causée à une absence de reconnaissance sont bien décrits chez les légumineuses, ceux qui sous-tendent l'incompatibilité tardive ou de fixation d'azote restent encore très peu connus. Dans cette étude, nous avons associé les introgressions sauvages portées par des lignées CSSL à une incompatibilité de fixation d'azote chez l'arachide. Cette incompatibilité se traduit par un mécanisme de « sanction » de la plante, qui affecte le développement et le fonctionnement du nodule. Pour une description fine des mécanismes génétiques de cette incompatibilité tardive, d'autres études complémentaires sont nécessaires afin d'identifier et de valider les gènes candidats.

CHAPITRE 5 : ANALYSE DU TRANSCRIPTOME ET CARTOGRAPHIE FINE DE DEUX RÉGIONS D'INTROGRESSION DE SEGMENTS CHROMOSOMIQUES D'ORIGINE SAUVAGE, IMPLIQUÉES DANS LA SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE CHEZ L'ARACHIDE CULTIVÉE (*Arachis hypogaea* L.)

Les principaux résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'un poster.

Title: Transcriptomic analyses of two homeologous wild genomic regions involved in root nodule symbiosis on chromosomes A02 and B02 in peanut (*Arachis hypogaea* L.)

- 19ème Congrès de l'Association Africaine pour la Fixation Biologique de l'Azote, AABNF du 28 novembre au 02 décembre 2022, Dakar, Sénégal.

Résumé

La symbiose fixatrice d'azote (SFA) est un processus complexe régulé par de nombreux gènes, dont les bases moléculaires demeurent peu connues chez l'arachide cultivée. Dans les chapitres précédents nous avons identifiés deux QTL sur les groupes de liaisons (GL) A02 (environ 76 Mbp) et B02 (environ 82.5 Mbp) impliqués dans une diminution de la performance symbiotique respectivement chez les lignées 12CS_051 et 12CS_044. Dans ce chapitre nous avons réalisé d'une part l'analyse des transcriptomes des lignées et de leur parent récurent la variété Fleur11. Et d'autre part, la cartographie fine de QTL pour faciliter l'identification de gènes candidats prometteurs. L'analyse comparative des transcriptomes globaux a montré une dérégulation importante des gènes contrôlant l'immunité de la plante, le transport de l'oxygène ou encore la réponse au stress oxydatif chez les lignées. Cette expression différentielle de gènes est globalement cohérente avec les variations phénotypiques et les observations cytologiques des nodules. De même, au niveau des régions ciblées sur le GL A02 et B02, les gènes régulés différemment entre Fleur11 et les lignées sont impliqués dans les fonctions liées à la SFA telles que l'immunité de la plante, la division cellulaire ou encore la senescence des tissus. Dans le QTL ciblé sur le GL A02, deux orthologues de gènes symbiotiques ont été régulés différemment entre Fleur11 et 12CS_051. Il s'agit du gène *Arahy.R43499* (orthologue de *LjFEN1*) impliqué dans le fonctionnement du nodule, et du gène *Arahy.MAQ2UP* (orthologue de *MtFER3*) impliqué dans un mécanisme de sénescence induite des nodules. La faible différentiation des bactéries observée dans les analyses cytologiques des nodules suggère que *Arahy.R43499* serait un gène candidat prometteur. Sur le GL B02, le gène *Arahy.Y8K7VT* (orthologue de *LjFEN1*) a été surexprimé chez Fleur11 et 12CS_044. Cependant, bien que son expression soit 03 fois plus importante chez Fleur11, une variation de l'expression de ce gène ne permettrait pas d'expliquer le phénotype de 12CS_044. La cartographie fine de QTL n'a pas permis d'affiner la taille des régions ciblées. Le croisement entre 12CS_044 et Fleur11 aboutie au développement d'une population de 23 lignées quasi-isogéniques (NIL). L'évaluation de l'efficacité symbiotique de ces NIL n'a montré aucune cohérence entre les données génotypiques et phénotypiques. Ce qui suggère que le gène responsable de ces variations phénotypiques n'est pas présent dans la région ciblée. Ces résultats fournissent des informations supplémentaires sur les mécanismes génétiques de la SFA chez l'arachide cultivée.

I. Introduction

Les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS, *Next Generation Sequencing*) développées au début du 21ème siècle ont considérablement accéléré la compréhension de la génétique des caractères complexes, à travers le séquençage de génome, l'identification des polymorphismes et des locus responsables de la variation des caractères quantitatifs (QTL), l'analyse de transcriptome (RNA-Seq), et le clonage de gènes candidats/QTL. La symbiose légumineuse-*rhizobia* est un caractère complexe gouverné par plusieurs gènes avec des effets variables (Dwivedi *et al.*, 2007, 2015). Durant les deux dernières décennies, ces technologies ont été largement utilisées chez les légumineuses modèles *Lotus japonicus* et *Medicago truncatula*, et ont permis de décrire les mécanismes génétiques et moléculaires sous-jacents au processus de nodulation, dans lequel l'infection intracellulaire des cellules végétales par la bactérie nécessite la formation de cordons d'infections (Oldroyd *et al.*, 2011; Oldroyd, 2013; Roy *et al.*, 2020). Brièvement, la légumineuse libère dans la rhizosphère des exsudats qui contiennent des flavonoïdes, reconnus par les *rhizobia* du sol comme des signaux symbiotiques (Redmond *et al.*, 1986). Cette reconnaissance attire la bactérie autour de la racine par chimiotactisme, et aboutie à la production et à la libération de facteurs Nod (NF), qui peuvent être reconnus par les récepteurs membranaires de NF (*LjNFR1*, *LjNFR5* ou *MtLYK3, MtNFP*) des cellules végétales (Oldroyd *et al.*, 2011). La reconnaissance des NF conduit à des oscillations calciques nucléaires, causées par l'activation d'un corécepteur de NF (*LjSYMRK*/*MtDMI2*), des protéines membranaires (*LjCASTOR*, *LjPOLLUX/MtDMI1*), et des nucléoprotéines (*LjNUP85*, *LjNUP133, LjNENA*) (Oldroyd, 2013). Par la suite, un complexe constitué des protéines *LjCCamK/MtDMI3* et *LjCYCLOPS/MtIPD3* décodent ces oscillations calciques, et induisent l'activation de plusieurs facteurs de transcription tels que *LjNSP1*, *LjNSP2*, *LjNIN, LjCRE1, LjERN1* qui sont des gènes clés impliqués dans l'infection bactérienne et dans le développement du nodule (Oldroyd *et al.*, 2011; Oldroyd, 2013).

Contrairement aux légumineuses modèles, chez d'autres légumineuses comme l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea*), le mode d'infection est intercellulaire ou « crack-entry » i.e., les bactéries infectent directement les cellules sans formations de cordons d'infections, à travers les fissures naturelles situées à la base des racines latérales (Sprent & James, 2007; Ibáñez *et al.*, 2017b). Cependant, les mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans la symbiose fixatrice d'azote chez l'arachide demeurent peu connus. Grâce aux séquençages récents du génome de l'arachide cultivée et de ses deux ancêtres sauvages (*Arachis duranensis* et *Arachis ipaensis*) (Bertioli *et al.*, 2016, 2019; Zhuang *et al.*, 2019), quelques travaux ont été axés sur les aspects génétiques et moléculaires du processus de nodulation. Peng *et al.* (2018) ont identifié

20 régions génomiques associées à la perte de nodulation chez l'arachide. Des approches d'analyses phylogénétiques et transcriptomiques ont permis d'une part d'identifier les orthologues de nombreux gènes symbiotiques préalablement décrits chez les légumineuses modèles, et d'autre part d'examiner leurs profils d'expression durant le processus de nodulation (Peng *et al.*, 2017b; Lu *et al.*, 2018; Griesmann *et al.*, 2018; Karmakar *et al.*, 2018; Roy *et al.*, 2020; Raul *et al.*, 2022). Par ailleurs, les fonctions de quelques orthologues de gènes symbiotiques (*AhCCaMK*, *AhCYCLOPS, AhHK1*, *AhNFR1*, *AhNFR5* et *AhNSP2*) ont été clairement décrites chez l'arachide (Sinharoy & DasGupta, 2009; Kundu & DasGupta, 2018; Das *et al.*, 2019; Shu *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2021).

Dans le deuxième chapitre de cette thèse, une population de 83 lignées de substitution de segments chromosomiques (CSSL) issue du croisement entre la variété d'arachide cultivée Fleur11 (génome AABB) et le tétraploïde synthétique AiAd [(*A. ipaensis* (génome BB) × *A. duranensis* (génome AA)], nous a permis d'identifier 04 QTL majeurs associés aux caractères de nodulation. Deux de ces QTL ont été cartographiés sur le groupe de liaison (GL) A02 de la lignée 12CS_051 et le GL B02 de la ligné 12CS_044. Les allèles sauvages aux locus des gènes à certains gènes sous-jacents à ces QTL, sont responsables de la diminution considérable des paramètres de croissance et des caractères de nodulation en conditions contrôlées, et des composantes du rendement sur des parcelles appauvries en azote. Cependant, la grande taille de la région du QTL (environ 76 Mbp sur le GL A02, et environ 82,5 Mbp sur le GL B02) contient de nombreux gènes, ce qui rend difficile l'identification de gène (s) candidat (s) responsable (s) des phénotypés observés. Dans ce cinquième chapitre, nous avons combiné deux approches pour identifier des gènes candidats prometteurs. La première approche a consisté à une analyse RNA-Seq à l'échelle du génome et à celle de la région ciblée pour comparer les profils d'expression de gènes durant le processus symbiotique chez les deux CSSL et chez Fleur11. La seconde approche a consisté à affiner la taille de la région ciblée, par le développement et le phénotypage de lignées quasi-isogéniques.

II. Matériel et méthodes

II.1. Analyse du transcriptome (RNA-Seq)

II.1.1. Matériel végétal et conditions expérimentales

Les génotypes utilisés sont les CSSL 12CS_044 et 12CS_051, et la variété cultivée Fleur11 (parent récurent). Pour chaque génotype, les graines ont été désinfectées avec une solution d'hypochlorite de calcium à 7%, avant d'être mises en germination sur milieu eau gélosée pendant trois jours à 28°C (Zaiya *et al.*, 2018). Par la suite, les graines germées ont été

transférées en pots Magenta (Sigma) contenant de la vermiculite stérile (Somasegaran & Hoben, 1994) et la solution nutritive BNM sans azote (Ehrhardt *et al.*, 1992). Deux traitements ont été appliqués : sans azote (-N) et sans azote + inoculé avec la souche efficience *Bradyrhizobium vignae* ISRA400 (-N+ISRA400). Le dispositif expérimental était un block complet randomisé avec quatre répétitions. Les plantes ont été cultivées en chambre de culture suivant un cycle photopériodique de 16 h de lumière et 8h d'obscurité, à une température de 28°C, une humidité à 70% et une intensité lumineuse ~175 $\mu mol.m^2.s^{-1}$. L'inoculation a été réalisée sur des jeunes plantes âgées de sept jours (stade deux premières feuilles épanouies), avec 1 ml d'une suspension cellulaire (absorbance ~0.7 à 600 nm) de la souche ISRA400 (cultivée dans le milieu Yeast Mannitol pendant 4 jours à 28°C). Les plantes non inoculées ont été utilisées comme témoin négatif. La fixation biologique d'azote a été évaluée 21 jours après l'inoculation (jai), en estimant la teneur en chlorophylle des feuilles de la troisième plus jeune feuille à l'aide d'un SPAD (Soil Plant Analysis Development ; Konica-Minolta). Pour chaque génotype, le système racinaire total a été récolté à deux stades : 0 et 21 jai. Les échantillons récoltés et nettoyés ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide pour l'extraction des ARNs.

II.1.2. Observations et analyses cytologiques

Une cinétique de nodulation a été réalisée pour chaque génotype, avec trois dates d'observation :0, 12 et 21 jai. Les observations macroscopiques des nodules et des racines ont été réalisées avec un microscope stéréoscopique (Nikon SMZ74557) équipé d'une caméra Q-Imaging GO-3. Les images ont été capturées avec le logiciel Q-capture. Pour visualiser l'organisation des tissus nodulaires et leur infection par la bactérie, des nodules frais à 21 jai ont été prélevés des racines, puis introduits dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 24h à 4°C afin de fixer les structures cellulaires, avant d'être conservés à température ambiante dans de l'éthanol à 70%. Les nodules fixés ont été déshydratés dans un gradient d'éthanol (80, 90, 95 et 100%), puis inclus dans de la résine (Technovit®7100). Les échantillons inclus ont été coupés en sections de 5 à 6 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome rotatif (Leica RM 2145 Biosystems). Par la suite, les coupes obtenues ont été colorées pendant 2 min dans du bleu de toluidine à 0,01%, et observées avec un microscope optique (Nikon H550S) équipé d'une caméra Q-Imaging Micropublisher 3.3 RTV.

II.1.3. Extraction d'ARNs, construction des banques d'ADNc et séquençage

Les échantillons congelés ont d'abord été broyés individuellement dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Pour chaque échantillon, les ARN totaux contenus dans environ 100 mg de poudre ont été extraits, en utilisant le protocole du kit Qiagen RNeasy Minikit. La dégradation et la pureté des ARNs ont été vérifiées par électrophorèse (100 volts pendant 30 min) sur gel d'agarose 1%. La concentration et l'intégrité des ARNs ont été évaluées respectivement à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop (ThermoScientific) et d'un bioanalyseur 2100 systems (Agilent Technologies). La construction des banques d'ADN complémentaires (ADNc) et leur séquençage ont été effectués par la plateforme MGX-Montpellier Genomix (MGX, France, https://www.mgx.cnrs.fr/index.php). Brièvement, pour chaque échantillon, la construction des banques d'ADNc a été réalisée à partir de 2 µg d'ARN totaux en utilisant le kit Stranded mRNA Prep ligation d'Illumina. La première étape a consisté à une sélection des ARN messagers (ARNm) sur des billes magnétiques oligo-dT, suivie d'une fragmentation chimique des ARNs sélectionnées à l'aide de cations divalents. Les ARNs fragmentés ont été utilisés pour la synthèse des doubles brins d'ADNc. Par la suite, une adénylation suivie d'une ligation d'adapteurs ont été réalisées aux extrémités 3' de l'ADNc. Les fragments d'ADNc obtenus ont été amplifiés par PCR pour constituer les banques. Cette étape d'amplification permet également l'indexage des banques. La validation des banques a été effectuée grâce à une quantification (concentration et taille des fragments) de l'ADNc sur le Fragment Analyzer (kit Standard et High Sensitivity NGS) ainsi que par qPCR (Roche Light Cycler 480). Au total 24 banques ont été construites (3 génotypes × 2 stades × 4 répétitions). Le séquençage des banques a été réalisé sur un NovaSeq 6000 d'Illumina grâce à la technique SBS (Sequence by Synthesis) à l'aide du kit NovaSeq Reagent Kits. Les banques ont été séquencées en single-read de 100 nucléotides.

II.1.4. Analyses bio-informatiques : Prétraitement, alignement et assemblage des séquences

Les analyses d'images du séquençage et leur conversion en bases nucléotidiques (*base calling*) de l'ADN ont été effectuées par la plateforme MGX-Montpellier Genomix. La qualité des séquences (reads) brutes générées a été contrôlée en utilisant Fastqc (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/). Les adaptateurs et les séquences de faible qualité (Phred Score < 30) ont été éliminés en utilisant Trimgalore et Cutadapt (Martin, 2011). Les séquences de haute qualité ont été alignées au génome de référence d'*A. hypogaea*

var. Tifrunner (arahy.Tifrunner.gnm1.KYV3.genome_main.fna, téléchargé sur PeanutBase : https://peanutbase.org/home) en utilisant le pipeline NF-core/rnaseq (Ewels *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2020). Brièvement, les alignements au génome de référence ont été réalisés avec STAR (Dobin *et al.*, 2013), la qualité de l'alignement a été contrôlée avec Qualimap (García-Alcalde *et al.*, 2012) et l'expression génique a été quantifiée avec Salmon en déterminant les *counts* (nombre de reads alignés) pour chaque gène (Patro *et al.*, 2017).

II.1.5. Identification et analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés

Pour chaque génotype, les niveaux d'expression des transcrits des plantes inoculées et non inoculées ont été comparés afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés (ou differentially expressed genes, DEGs) durant le processus de nodulation. Les DEGs ont été identifiés en utilisant le package bioconductor EdgeR (Robinson *et al.*, 2010). Seuls les gènes ayant un FDR (False Discovery Rate ou *p*-value ajustée par la méthode de Benjamini et Hocherberg's) ≤ 0,05 et un log2FoldChange (log2FC) en valeur absolue ≥ 2 ont été considérés comme différentiellement exprimés. Si le log2FC ≥ 2, le gène est dit surexprimé ou induit, tandis que, si le log2FC ≤ -2, le gène est dit sous-exprimé ou réprimé. Les diagrammes de Veen ont été construits avec le package ggveen, et ont permis d'identifier le nombre de DEGs spécifiques et communs entre les génotypes. Les heatmaps ont été réalisés avec les packages ComplexHeatmap et gplots de R, afin de comparer les profils d'expression des DEGs entre les génotypes. Pour examiner les composants cellulaires (CC), les fonctions moléculaires (FM) et les processus biologiques (BP) associés aux DEGs, une analyse de l'enrichissement des termes GO a été effectuée à l'aide du package bioconductor Goseq (Galaxy version 1.50.0 +galaxy0), en se basant sur la méthode Wallenius et en incluant une correction du biais liée à la longueur des gènes (Young *et al.*, 2010). Les termes GO avec une *p*-value ≤ 0,05 ont été considérés comme significativement enrichis en nombre de DEGs.

II.1.6. Analyse de l'expression des orthologues de gènes symbiotiques

Afin d'identifier parmi les DEGs, les gènes spécifiquement impliqués dans le processus de nodulation, nous avons premièrement effectué une analyse phylogénétique à l'aide d' Orthofinder (Emms & Kelly, 2015), en utilisant les protéomes de 14 légumineuses (*Arachis hypogaea*, *Arachis ipaensis*, *Arachis duranensis*, *Cercis canadensis*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, *Glycine max*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, *Lupinus albus*, *Aeschynomene evenia*, *Nissolia schottii*, *Chamaecrista fasciculata*, *Mimosa pudica*) téléchargés sur les sites internet : Legume Information System (https://legumeinfo.org/), National Center

for Biotechnology (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Par la suite, cette analyse nous a permis d'identifier dans le génome de l'arachide les orthologues de 282 gènes connus pour leur rôle dans la symbiose légumineuse-*rhizobia* (Velzen *et al.*, 2018; Roy *et al.*, 2020; Quilbé *et al.*, 2021). Enfin, le profil d'expression de ces gènes a été analysé chez les génotypes étudiés.

II.2. Cartographie fine de QTL à partir des lignées quasi-isogéniques

II.2.1. Matériel végétal

La variété cultivée Fleur11 et les lignées 12CS_051 et 12CS_044 ont été utilisées comme parents pour le développement de lignées quasi-isogéniques (NIL).

Deux populations de croisements ont été développées. La figure 37 présente le schéma de sélection mis en place, pour le développement des NIL. La lignée 12CS_044 porte un segment chromosomique sauvage (*A. ipaensis*) sur le GL B02, qui a été associé à une diminution de la capacité à fixer l'azote. Le croisement 12CS_044 × Fleur11 a généré 94 plantes F_1. L'hybridité des F_1 a été vérifié par génotypage en utilisant deux marqueurs SSR (Seq2G04 et Seq1B09) situés sur le segment de chromosome sauvage ciblé. Ensuite, 12 plantes F_1 ont été sélectionnées et une large population de 970 individus F_2 a été développée. Dans un premier temps, 03 marqueurs SNP positionnés aux deux extrémités et au milieu du segment ont été utilisés pour identifier les recombinants. Ensuite, dans chaque intervalle entre les marqueurs SNP aux extrémités et le marqueur SNP au milieu du segment, 04 marqueurs SNP ont été positionnés, afin de localiser plus précisément les sites de recombinaison. Ce génotypage a permis de sélectionner 19 individus F_2 ayant recombiné dans la région ciblée, et ces dernières ont été avancées en génération F_3. Un total de 198 plantes F_3 a été produit et génotypé avec 16 marqueurs SNP. Enfin, 23 plantes F_3 présentant les recombinaisons les plus intéressantes, et qui étaient fixé au segment cible, ont été sélectionnées pour constituer les NIL. Ces plantes ont été avancées en génération F_4, pour obtenir les plantes utilisées pour le phénotypage.

Le croisement 12CS_051 × Fleur11 a été également réalisé, et la région ciblée a été le segment chromosomique sauvage (*A. duranensis*) sur le GL A02 associé à une diminution de la SFA chez la lignée 12CS_051. Un total de 94 plantes F_1 a été produit, et leur hybridité a été vérifiée en utilisant les marqueurs SSR Seq11G03 et Seq12E03. Deux hybrides ont été sélectionnés et utilisés pour produire une population F_2 de 103 plantes. Par la suite, 03 marqueurs SNP situés aux extrémités et au milieu du segment ciblé ont été utilisés pour sélectionner 23 recombinants. Les F_2 sélectionnées ont été avancées en génération F_3. Une large population de 372 plantes F_3 a été générée et génotypée avec 16 marqueurs SNP. Cependant, très peu de plantes ayant recombinée dans la région du segment ciblé ont été détectées et aucune NIL n'a été obtenue.

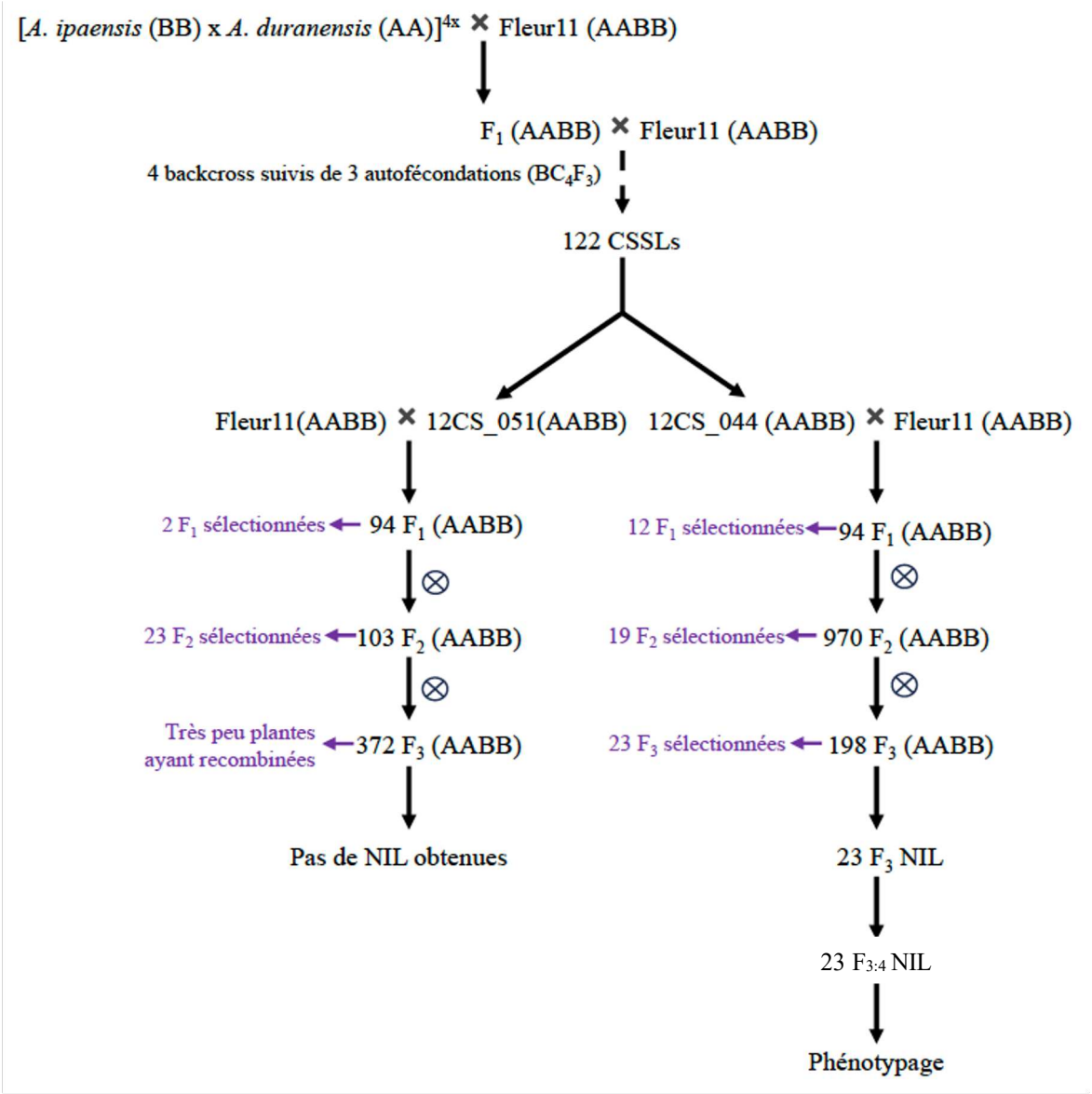


Figure 37. Schéma de sélection pour le développement des NIL

II.2.2. Extraction de l'ADN et génotypage

L'extraction de l'ADN a été effectuée comme décrit par Fonceka *et al.* (2012b). Brièvement, 20 mg de jeunes feuilles sèches ont été broyées pendant 2 min à l'aide d'un broyeur Mixer Mill. Les échantillons broyés ont été solubilisés dans 750 µl de tampon MATAB, puis incubés à 65°C pendant 20 min dans un bain-marie et refroidis pendant 5 min à température ambiante. Ensuite, un volume de 750 µl de chloroforme alcool isolamylique (24/1) a été ajouté à chaque échantillon, suivie d'une homogénéisation par agitation manuelle et d'une centrifugation à 13000 tr/min pendant 20 min. Pour chaque échantillon, un volume de 600 µl du surnageant a été récolté et transféré dans un nouveau tube et l'ADN a été précipité par l'ajout de 600 µl de

2-Isopropanol. Après centrifugation, les culots d'ADN ont été lavés avec 300 µl d'éthanol à 70%, séchés à température ambiante avant d'être dissouts dans 500 µl de Tris-EDTA. L'ADN extrait a été conservé à -20 °C pour la quantification et le génotypage.

Le génotypage a consisté à une amplification par PCR des marqueurs SSR et SNP associés aux segments chromosomiques sauvages ciblés comme décrit par Alyr *et al.* (2020). Les marqueurs SSR (Seq11G03, Seq12E03 sur le GL A02, et Seq2G04, Seq1B09 sur le GL B02) préalablement développés par Fonceka *et al.* (2012b), ont permis de vérifier l'hybridité des F_1 dans la région ciblée. Par la suite, de nouveaux marqueurs SNP ont été identifiés dans l'intervalle des marqueurs SSR délimitant la région ciblée, en utilisant les données GBS (*genotyping by sequencing*) de la population CSSL et une puce « *Axiom-Arachis* » (Pandey *et al.*, 2017). Un total de 56 et 42 nouveaux SNP ont été identifiés respectivement dans le QTL sur les chromosomes A02 et B02. L'analyse des données du génotypage avec les SNP a permis de choisir les NIL sur la base des évènements de recombinaisons les plus intéressants observés entre les marqueurs.

II.2.3. Phénotypage, analyses statistiques et cartographie fine du QTL

L'efficacité symbiotique de 23 NIL et leurs deux parents (Fleur11 et 12CS_044) a été évaluée en conditions contrôlées. La désinfection et la germination des graines, l'inoculation des plantes, les conditions de culture et le dispositif expérimental ont été réalisés comme décrits précédemment (voir section II.1.1, chapitre 5). Vingt-huit jours après inoculation, la teneur en chlorophylle des feuilles a été évaluée. L'expérimentation a été répétée deux fois et les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du package agricolae du logiciel R. La normalité et l'homogénéité de la variance ont été vérifiées respectivement avec les tests de Kolmogorov-Smirnov et de Levene. L'analyse de variance (ANOVA) a été réalisée pour chaque expérimentation afin d'estimer les effets génotype et répétition en utilisant le modèle linéaire standard :

$$y_{ij} = \mu + G_i + r_j + \varepsilon_{ij}$$

avec, y_{ij} = valeur observée du génotype i dans la répétition j; μ = valeur moyenne de population ; G_i = effet du génotype i ; r_j = effet de la répétition j ; ε_{ij} = erreur résiduelle.

Pour cartographier finement le QTL, les variations phénotypiques observées d'une part entre les NIL, et d'autre part entre les NIL et leurs parents, ont été comparées. Par la suite, les différences et/ ou similitudes phénotypiques ont été associées au segment chromosomique sauvage présent dans chaque NIL pour préciser la position du QTL.

III. Résultats

III.1. Analyses RNA-Seq

III.1.1. Variabilité de la réponse à l'inoculation entre les lignées et Fleur11

Des variations phénotypiques associées à la SFA ont été observées entre les lignées et Fleur11 21 jours après inoculation. Aucune différence de teneur en chlorophylle des feuilles (SPAD) n'a été observée entre les génotypes dans le traitement sans azote (-N). Tandis que, dans le traitement inoculé (-N + ISRA400), les CSSL ont montré des teneurs en chlorophylle de feuilles significativement inférieures à celle de Fleur11 (Figure 38).

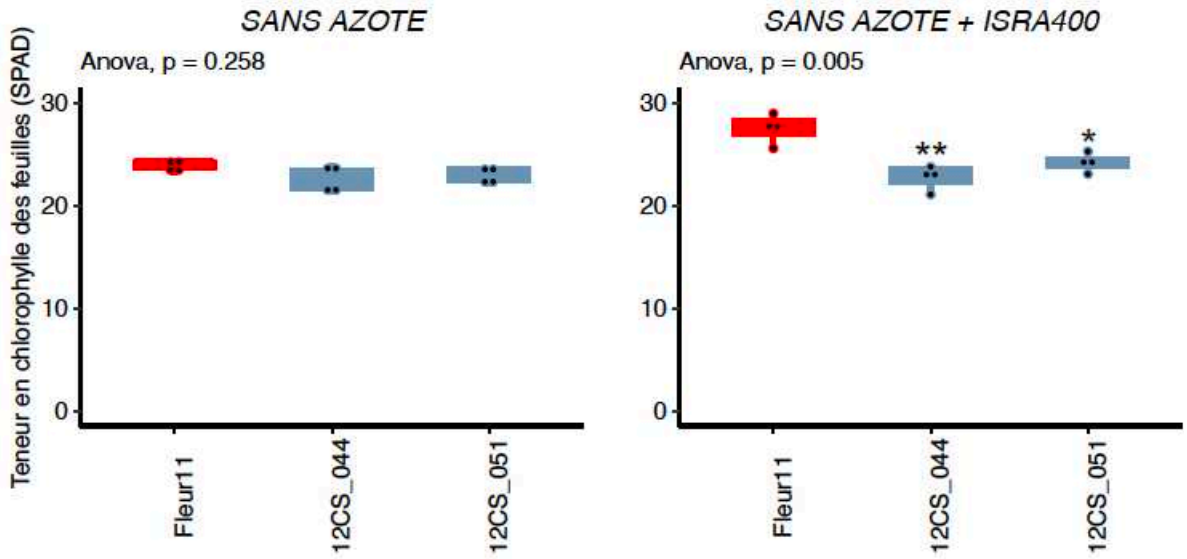


Figure 38. Variation de la teneur en chlorophylle des feuilles

* et **indiquent respectivement la significativité à $p < 0.05$, $p < 0.01$ avec le test de Dunnett.

L'observation de la cinétique de nodulation a révélé que, Fleur11 a formé des nodules immatures (couleur blanche) à 12 jai, et des nodules matures (couleur rose) à 21 jai (Planche 8a-c). L'analyse cytologique des coupes de nodules de Fleur11 à 21 jai a montré une structure tissulaire de type aeschynomenoïde comprenant : une zone centrale infectée par des bactéries différenciées en bactéroïdes (en forme arrondie) ; un parenchyme périphérique constitué de cellules non infectées ; et des faisceaux vasculaires (Planche 8d-e). Concernant les lignées, nous avons observé une structure nodulaire globalement similaire à celle de Fleur11 à 21 jai. En revanche, les nodules formés par la lignée 12CS_051 semblent plus petits que ceux de Fleur11 et immatures (Planche 8f-h). Les coupes de nodules ont révélé que très peu de bactéries étaient différenciées en bactéroïdes (Planche 8i-j). Chez la lignée 12CS_044, nous avons observé des nodules immatures, de très petite taille, avec des cellules très peu infectées, et la présence de quelques bactéroïdes dans l'espace intercellulaire (Planche 8k-o).

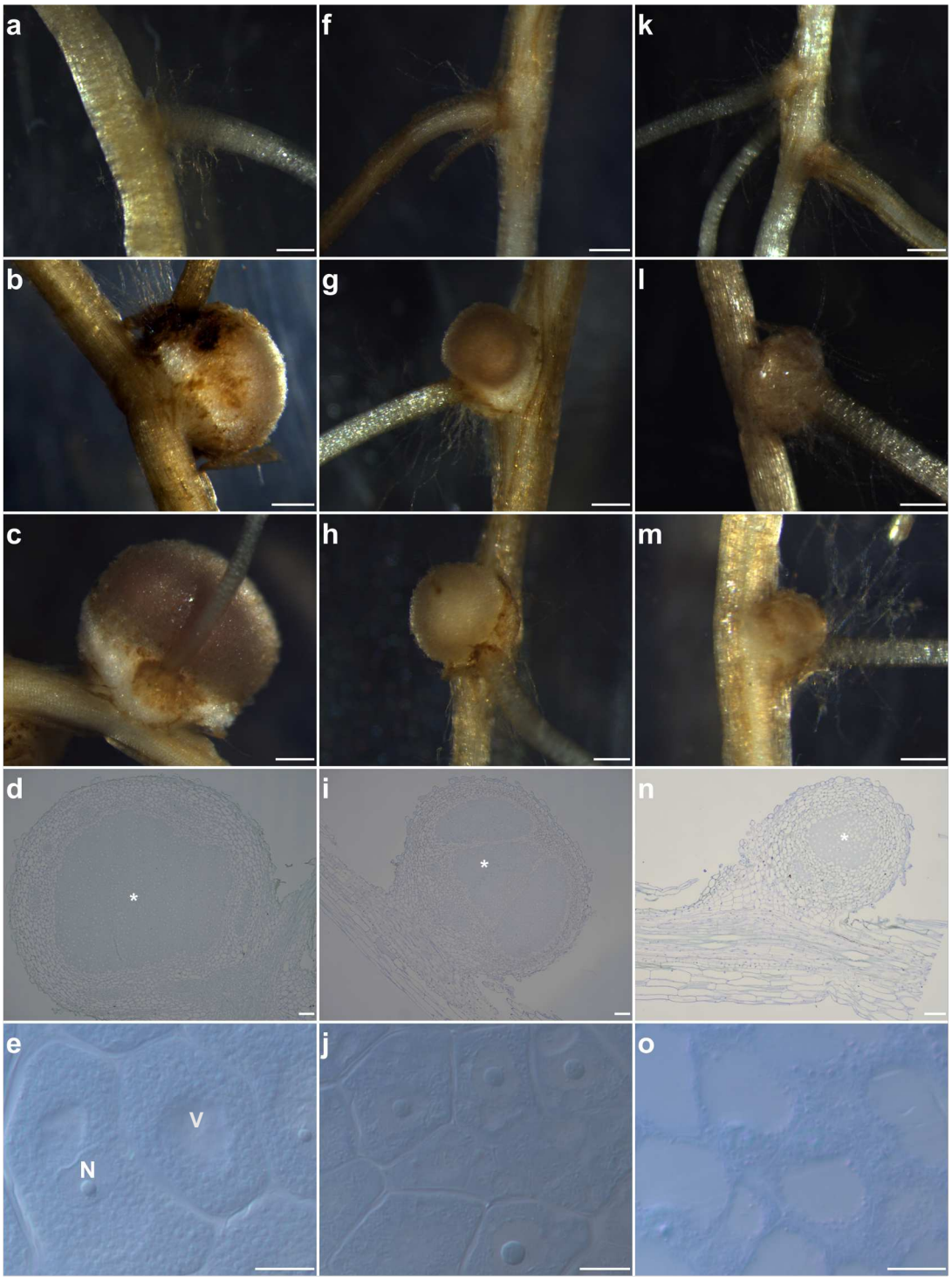


Planche 8. Comparaison de la cinétique de nodulation et des caractéristiques cytologiques des nodules entre la variété Fleur11 et 02 CSSL inoculées avec *Bradyrhizobium vignae* ISRA400. Fleur11, 12CS_051 et 12CS-044 sont représentées par colonne respectivement de la gauche vers la droite. a-c, f-h et k-m présentent la progression de la nodulation respectivement à 0, 12 et 21 jours après inoculation (barre d'échelle = 500 µm). d, i et n montent la structure tissulaire des nodules 21 jours après inoculation (barre d'échelle = 100 µm). e, j et o présentent l'infection des cellules végétales et la différentiation des bactérie en bactéroïdes (barre d'échelle = 10 µm). Les astérisques correspondent aux zones de d, i et n agrandies en e, j et o. N= nucléole entouré par la membrane nucléaire ; V= vacuole.

III.1.2. Statistiques du séquençage des ARNm et de leur alignement

La figure 39 présente l'analyse de la qualité des séquences de tous les échantillons. Au total, plus de 84% des séquences brutes avaient un Phred Score > 30. Les informations sur le séquençage et l'alignement sont récapitulées dans le tableau XV. Après le contrôle de la qualité des séquences, 1,03 milliards de séquences (100 pb) de bonne qualité ont été dénombrées avec une moyenne d'environ 43 millions de séquences par échantillon. Le pourcentage en GC était compris entre 43 et 44%. L'alignement a montré qu'environ 97,1 à 99,2 % de séquences de bonne qualité ont été alignées à des locus uniques ou multiples sur le génome de référence d'*A. hypogaea* var. Tifrunner. Environ 68 à 75 % des reads ont été alignés sur les exons, 18 à 22% sur les introns, et 8 à 10% sur les régions intergéniques.

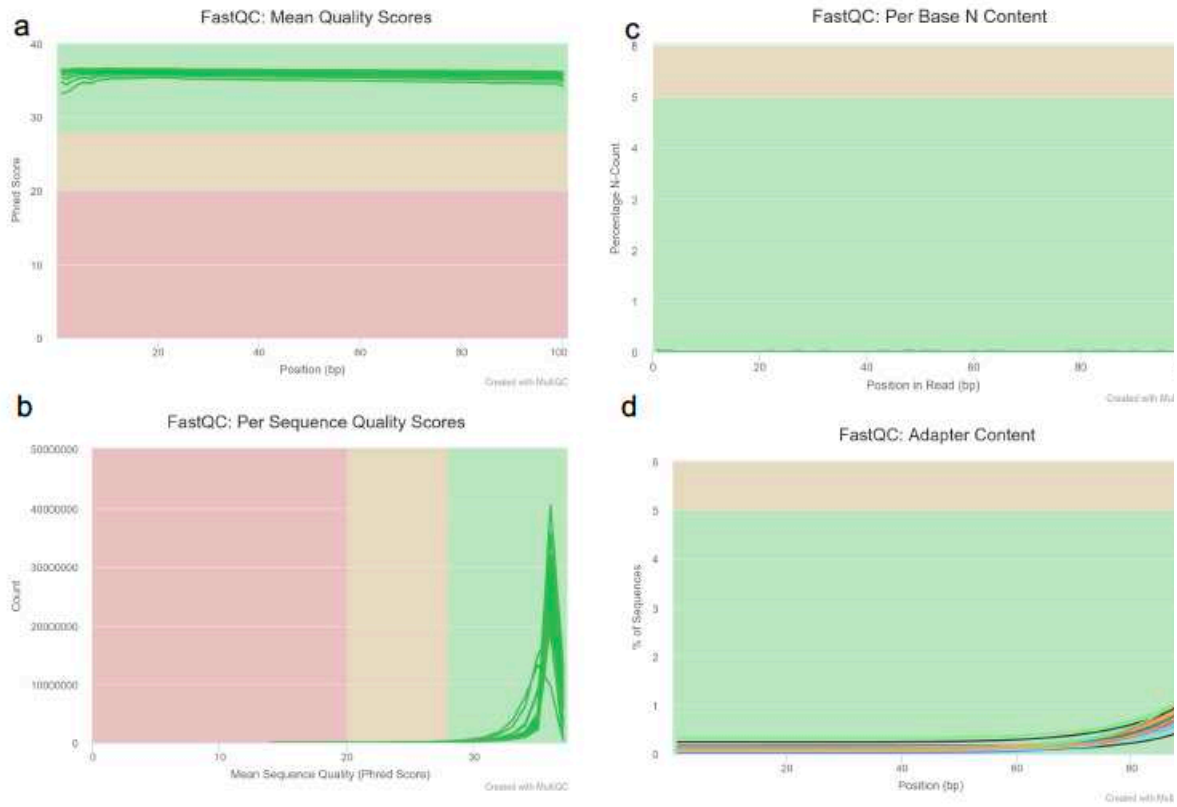


Figure 39. Analyse de la qualité des séquences des échantillons

(a) et (b) présentent respectivement la distribution des Phred Score par base et par séquence. Chaque échantillon est représenté par une ligne. La qualité des bases et des séquences est très bonne avec un Phred Score > 30 (une probabilité de 1/1000 qu'il ait une erreur de base durant l'étape de *base calling*). (c) montre la teneur en base « N ». L'absence de « N » indique qu'il n'y a pas d'ambiguïté sur la lecture des bases. (d) indique le pourcentage de séquences d'adaptateurs détecté à chaque base. On observe moins de 1% d'adaptateurs en fin de séquence.

Tableau XV : Tableau récapitulatif des statistiques du séquençage et de l'alignement

Stade d'extraction des ARNm (jours)	Échantillons	Séquences de bonne qualité	Séquences alignées (%)	%GC
Jour 0 avant inoculation (témoin)	Fleur11-R1	48 524 882	47 935 326 (98,9)	44
	Fleur11-R2	55 373 294	54 624 504 (98,8)	44
	Fleur11-R3	39 761 571	39 256 907 (98,8)	44
	Fleur11-R4	63 333 970	62 426 988 (98,6)	44
	12CS_051-R1	46 901 833	46 281 288 (98,8)	44
	12CS_051-R2	54 639 793	53 953 310 (98,8)	44
	12CS_051-R3	46 637 528	46 102 779 (98,9)	44
	12CS_051-R4	42 717 481	42 055 568 (98,5)	44
	12CS_044-R1	32 292 336	31 301 666 (97,1)	44
	12CS_044-R2	42 295 335	41 606 368 (98,7)	43
	12CS_044-R3	51 423 054	50 602 364 (98,5)	44
	12CS_044-R4	48 042 164	47 264 273 (98,5)	44
Jour 21 après inoculation (21 jai)	Fleur11-R1	38 307 683	37 896 008 (99)	43
	Fleur11-R2	44 110 257	43 630 936 (99,1)	44
	Fleur11-R3	36 824 753	35 782 430 (97,6)	44
	Fleur11-R4	37 571 941	37 235 381 (99,2)	43
	12CS_051-R1	43 094 606	42 175 825 (98)	44
	12CS_051-R2	44 237 218	43 739 223 (99)	44
	12CS_051-R3	35 328 328	34 889 637 (98,8)	43
	12CS_051-R4	38 919 816	38 355 670 (98,6)	44
	12CS_044-R1	32 958 646	32 551 183 (98,9)	44
	12CS_044-R2	33 739 393	33 230 915 (98,6)	44
	12CS_044-R3	39 761 571	39 256 907 (98,8)	44
	12CS_044-R4	39 106 982	38 679 322 (99)	44

À la suite de l'alignement des reads et de la quantification des *counts* de chaque gène, nous avons effectué une vérification du clustering de tous les échantillons. À l'exception de l'échantillon 12CS_044-R3 inoculé, une classification hiérarchique réalisée sur les gènes les plus variables a révélé, un bon clustering des réplicas biologiques suivant les traitements (stades) et les génotypes (Figure 40). Le biais observé avec l'échantillon 12CS_044-R3 pourrait s'expliquer par une erreur d'étiquetage survenue durant les étapes d'extraction des ARN totaux et de constructions des banques, ou alors par une hétérogénéité du lot de graines au départ de

l'expérimentation. Dans la suite de nos analyses, l'échantillon 12CS_044-R3 a été supprimé du jeu de données.

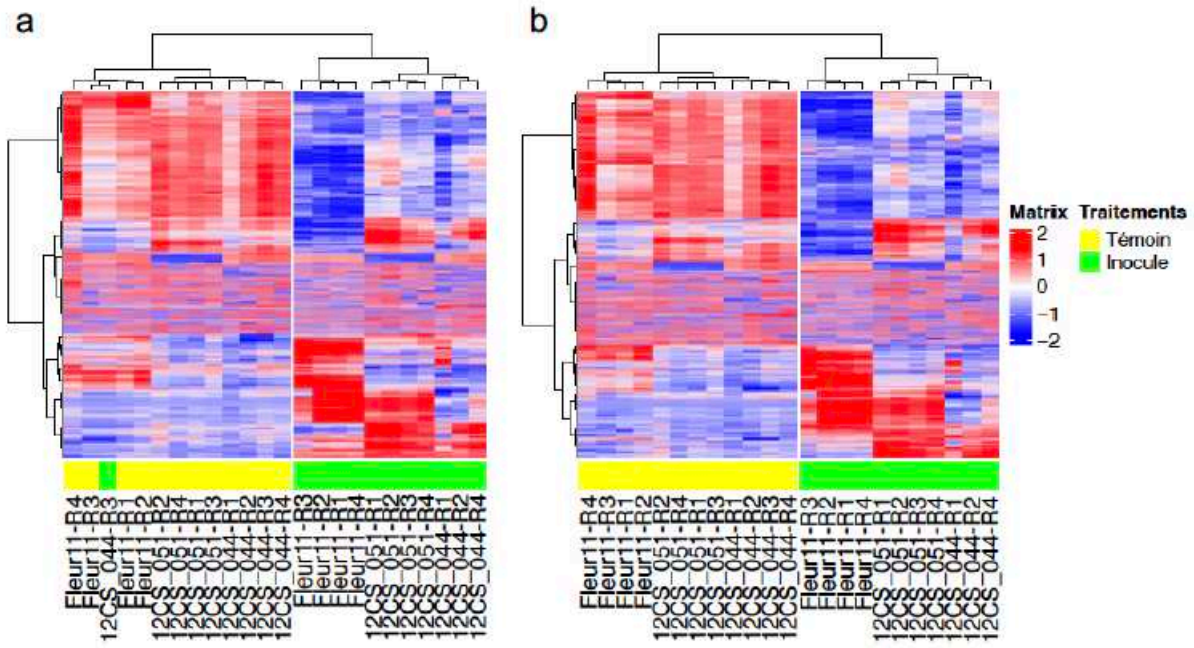


Figure 40. Dendrogramme basé sur une classification hiérarchique des gènes les plus variables. (a) et (b) illustrent respectivement le dendrogramme avec et sans l'échantillon 12CS_044-R3.

III.1.3. Identification des gènes différentiellement exprimés (DEGs)

Pour chaque génotype, 40985 gènes ont été analysés, et les DEGs ont été identifiés (*p*-value ajustée ≤ 0,05 et log2FC en valeur absolue ≥ 2) en comparant les échantillons « témoin » et « inoculé » à l'aide du package bioconductor EdgeR. Au total 4054, 2392 et 2622 DEGs ont été identifiés respectivement chez Fleur11, 12CS_051 et 12CS_044 (Figure 41a). Globalement, pour tous les génotypes, le nombre de gènes surexprimés a été plus important que le nombre de gènes sous-exprimés. Les DEGs de chaque CSSL ont été comparés à ceux de Fleur11 afin de déterminer les DEGs spécifiques et partagés (Figure 41b et c). La majorité des gènes sous-exprimés (49-55%) et surexprimés (46-50 %) chez Fleur11 n'étaient partagés avec aucune lignée. Cette distribution des DEGs traduit à priori une différence importante dans la régulation de gènes entre un génotype avec une nodulation fonctionnelle (Fleur11) et des génotypes avec une nodulation peu fonctionnelle ou altérée (12CS_051 et 12CS_044). Le niveau de significativité (*p*-value) de la différence d'expression de gènes (log2FoldChange) entre les échantillons témoin et inoculé est illustré par un volcanoplot à la figure 42.

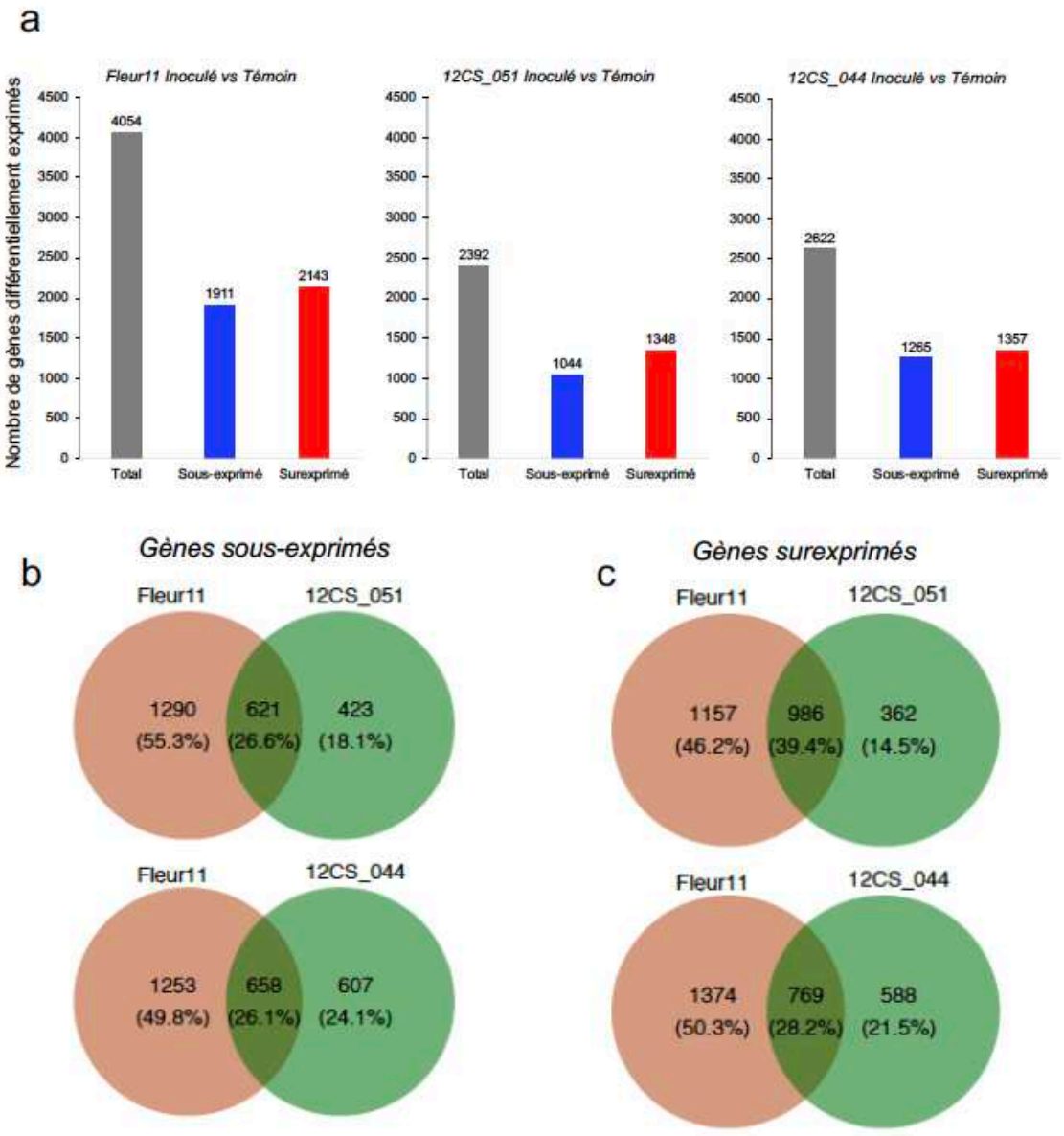


Figure 41. Identification des gènes différentiellement exprimés chez tous les génotypes

(a) Statistiques du nombre de DEGs identifiés par génotype. (b) et (c) : Diagrammes de Venn des gènes sous-exprimés et surexprimés respectivement.

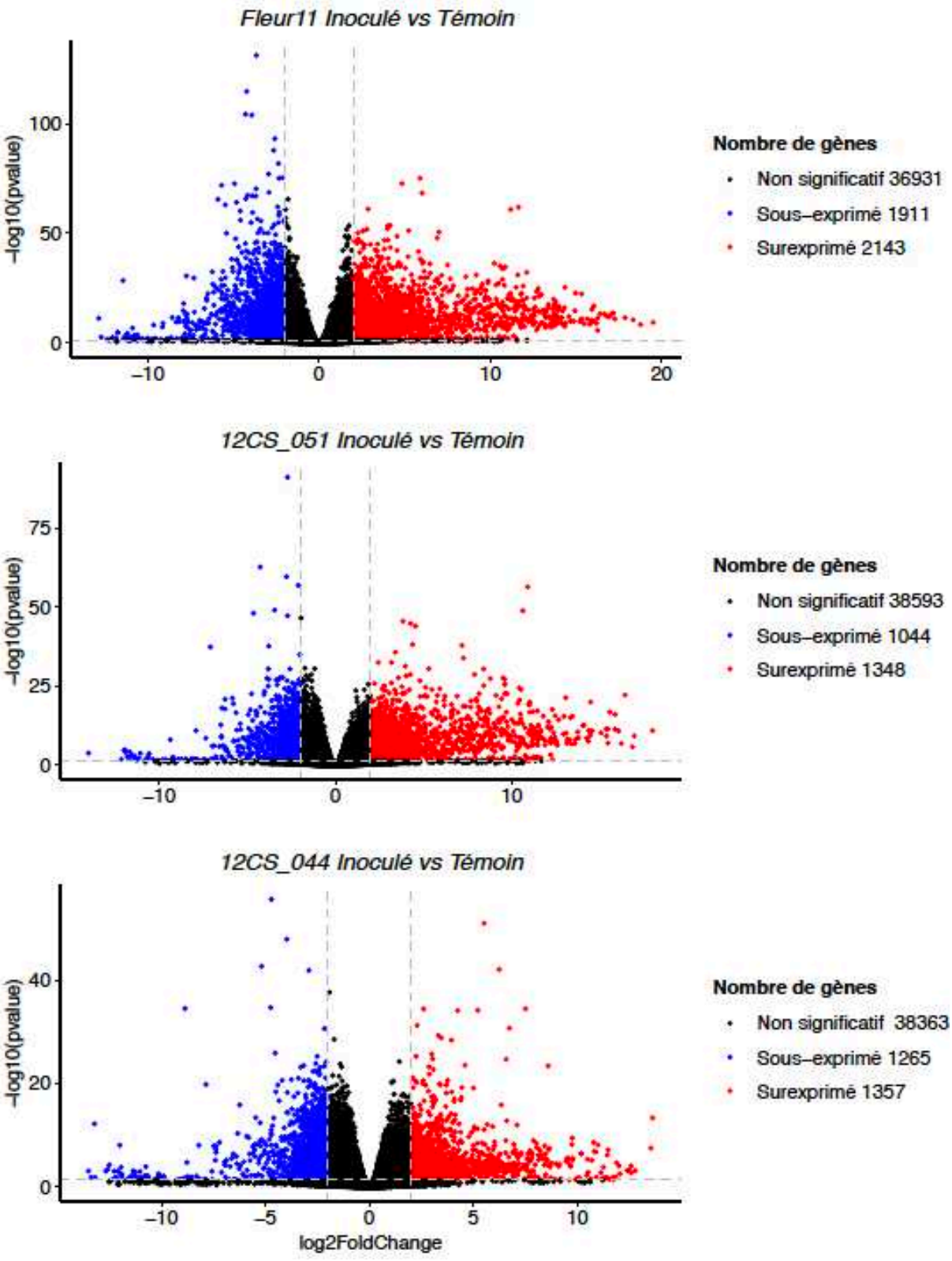


Figure 42. Niveau de significativité ($p \leq 0.05$) de la différence d'expression des gènes (log2FoldChange ≤ -2 ou ≥ 2) entre les échantillons non inoculé et inoculé à 21 jours après inoculation

III.1.4. Analyse fonctionnelle des transcriptomes

III.1.4.1. Description fonctionnelle du transcriptome de Fleur11

Une analyse d'enrichissement de termes GO des 4054 DEGs détectés chez Fleur11 a permis d'identifier les processus biologiques (PB), les fonctions moléculaires (FM) et les composants cellulaires (CC) impliqués dans le processus de nodulation entre 0 et 21 jai. Au total 59 termes GO (20 PB, 28 FM, 11 CC) ont été significativement enrichis (Annexe 4). Parmi les termes GO les plus représentés dans les processus biologiques, on retrouve le transport de l'oxygène, les processus d'oxydoréduction, les processus métaboliques, le système de défense de la plante (réponse au stress oxydatif et aux stimulus biotiques) et la photosynthèse (Figure 43a). Au niveau des fonctions moléculaires, les termes GO associés à la synthèse de l'hémoglobine (liaisons de l'hème et de cation Fer), à la liaison des molécules de dioxygène (O_2) et aux activités catalytiques (oxydoréductase, peroxydase, hydrolase), ont été parmi les plus représentés (Figure 43b). Les composants cellulaires ont regroupé, les termes GO essentiellement impliqués dans les modifications des structures membranaires de la cellule (Figure 43c). Un enrichissement similaire de termes GO des DEGs identifiés durant le processus de nodulation avait été précédemment rapporté dans d'autres études chez l'arachide cultivée (Karmakar *et al.*, 2018; Raul *et al.*, 2022). Ces observations nous ont permis de valider le profil transcriptomique de base de la variété Fleur11, et d'analyser les différences par rapport aux transcriptomes des CSSL.

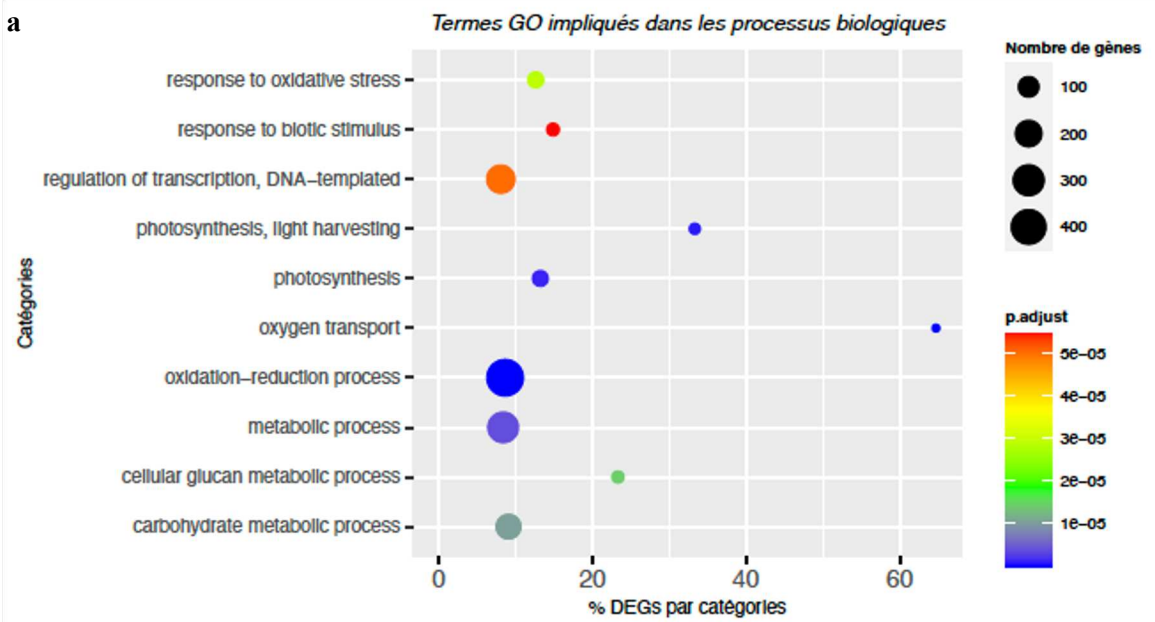


Figure 43. (Suite)

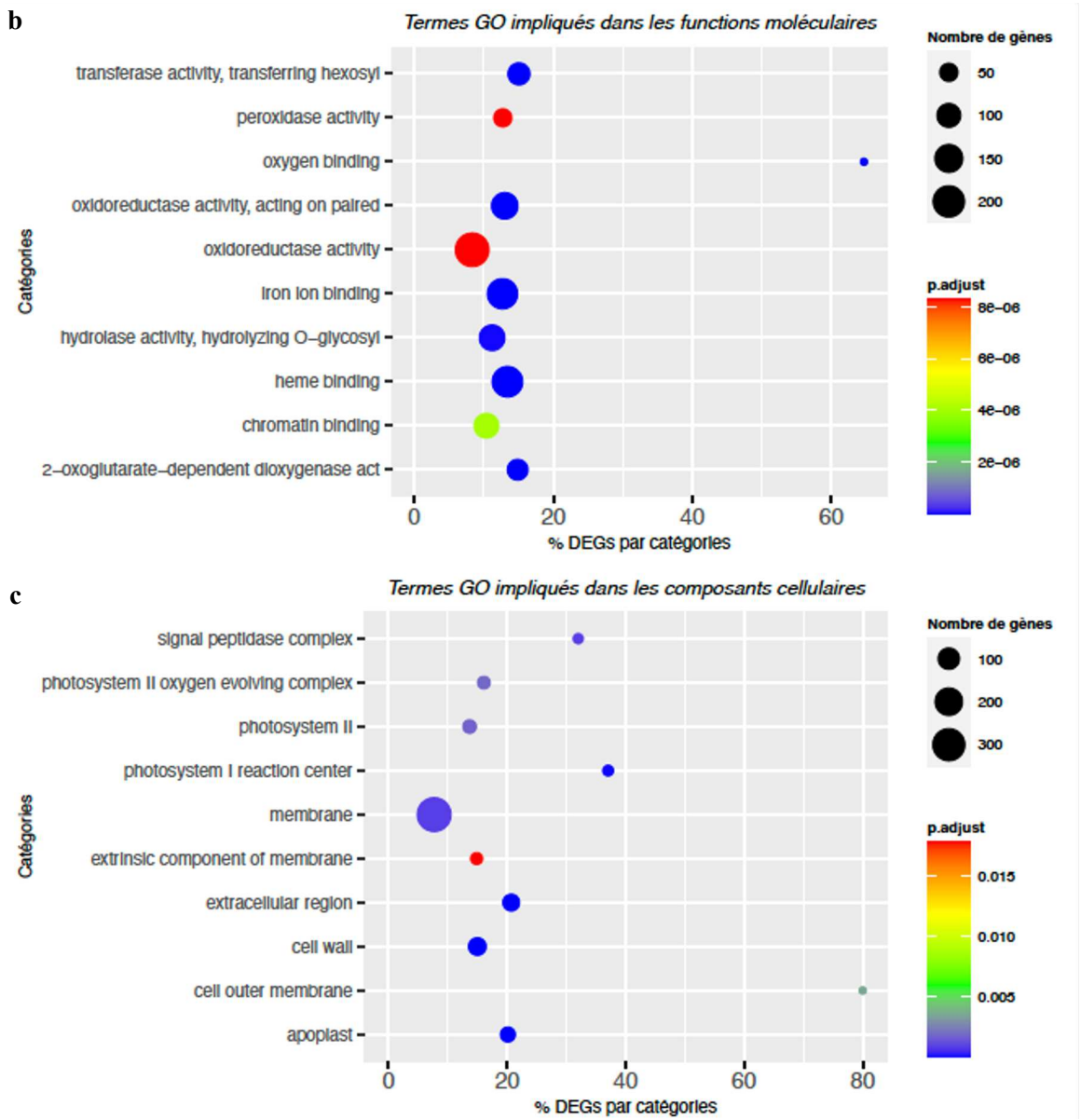


Figure 43. Termes GO les plus représentés parmi les DEGs identifiés durant le processus de nodulation chez Fleur11.
(a), (b) et (c) indiquent respectivement les termes GO impliqués dans les processus biologiques, les fonctions moléculaires, et les composants cellulaires. La *p*-value (p.adjust) indique la significativité de la surreprésentation des termes GO.

III.1.4.2. Comparaisons des transcriptomes de Fleur11 et des lignées

Pour identifier les fonctions de gènes associées aux différences de performances symbiotiques observées entre Fleur11 et chaque lignée, une analyse d'enrichissement de termes GO a été réalisée sur les DEGs surexprimés et sous-exprimés spécifiques à chaque génotype.

- ***Comparaison entre Fleur11 vs 12CS_051***

Au total 2334 gènes sous-exprimés et 2505 gènes surexprimés ont été identifiés chez Fleur11et la lignée 12CS_051 (Figure 41b-c). L'analyse comparative des profils d'expression de ces DEGs a montré des différences considérables dans la régulation de nombreux gènes (Figure 44). Certains gènes sous-exprimés chez Fleur11 ont été surexprimés chez 12CS_051 et vice-versa. Par exemple, une régulation inverse de gènes a été observée dans les clusters 2 et 3 des gènes sous-exprimés (Figure 44a), et les clusters 1 et 3 des gènes surexprimés (Figure 44b).

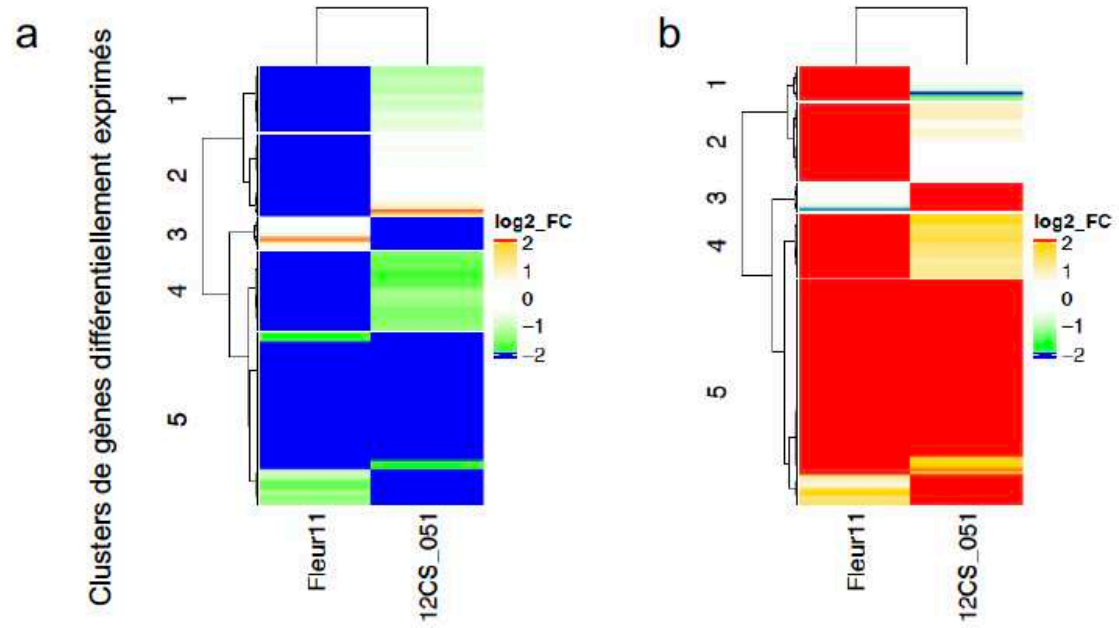


Figure 44. Heatmaps des gènes sous-exprimés (a) et surexprimés (b) chez Fleur11 et 12CS_051 Les DEGs des deux génotypes sont regroupés en « clusters » suivant leur niveau d'expression (log2_FC : log2FoldChange).

Au total 1290 gènes sous-exprimés et 1157 gènes surexprimés chez Fleur11 ont été détectés uniquement chez Fleur11 (Figure 41b et c). L'analyse fonctionnelle des gènes sous-exprimés a révélé 24 termes GO significativement enrichis (Annexe 4), parmi lesquels ceux qui sont impliqués dans la réponse aux stimuli biotiques et au métabolisme du carbone (photosynthèse) (Figure 45a). La même analyse réalisée sur les gènes surexprimés a permis d'identifier 11 termes GO significativement enrichis. Parmi lesquels, on retrouve essentiellement les termes GO impliqués dans les activités enzymatiques d'oxydo-réduction et la régulation des processus métaboliques (Figure 45b).

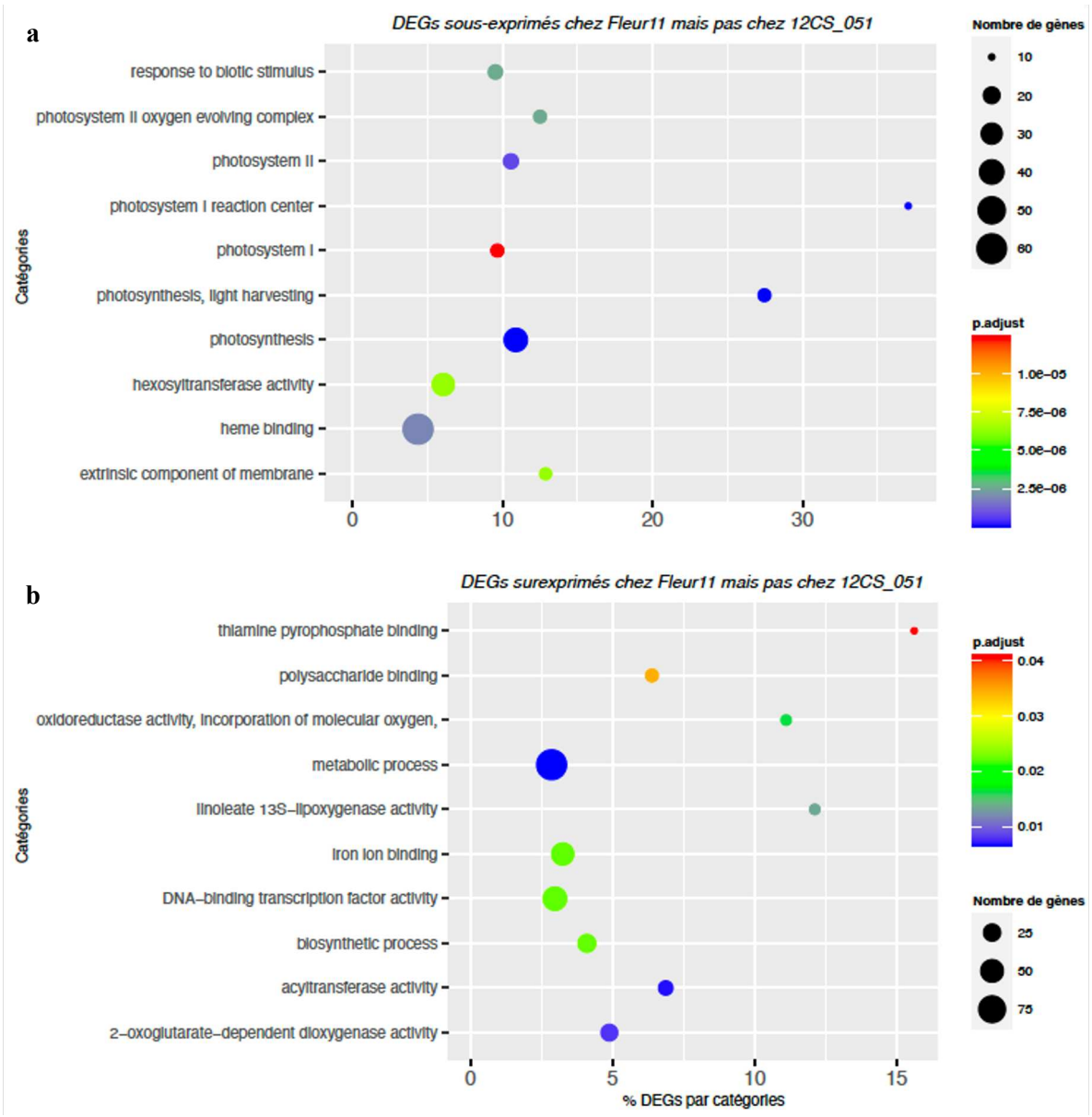


Figure 45. Top 10 de termes GO des gènes sous-exprimés (a) et surexprimés (b) chez Fleur11, mais pas chez 12CS_051
La *p*-value (p.adjust) indique la significativité de la surreprésentation des termes GO.

Une analyse d'enrichissement de termes GO a été également effectuée sur 423 gènes sous-exprimés et 362 gènes surexprimés uniquement chez la lignée 12CS_051 (Figure 41b et c). Les résultats ont montré que 15 termes GO ont été significativement représentés dans les gènes sous-exprimés (Annexe 4). Les termes GO impliqués dans la réponse à un stress oxydatif, la modification de la paroi cellulaire et l'inhibition des activités enzymatiques ont été parmi les plus représentées (Figure 46a). Dans les gènes sur-exprimés 09 termes GO ont été significativement enrichis, parmi lesquels on retrouve la réduction des molécules de O_2 et les activités de la protéine Sérine/Thréonine kinase (Figure 46b).

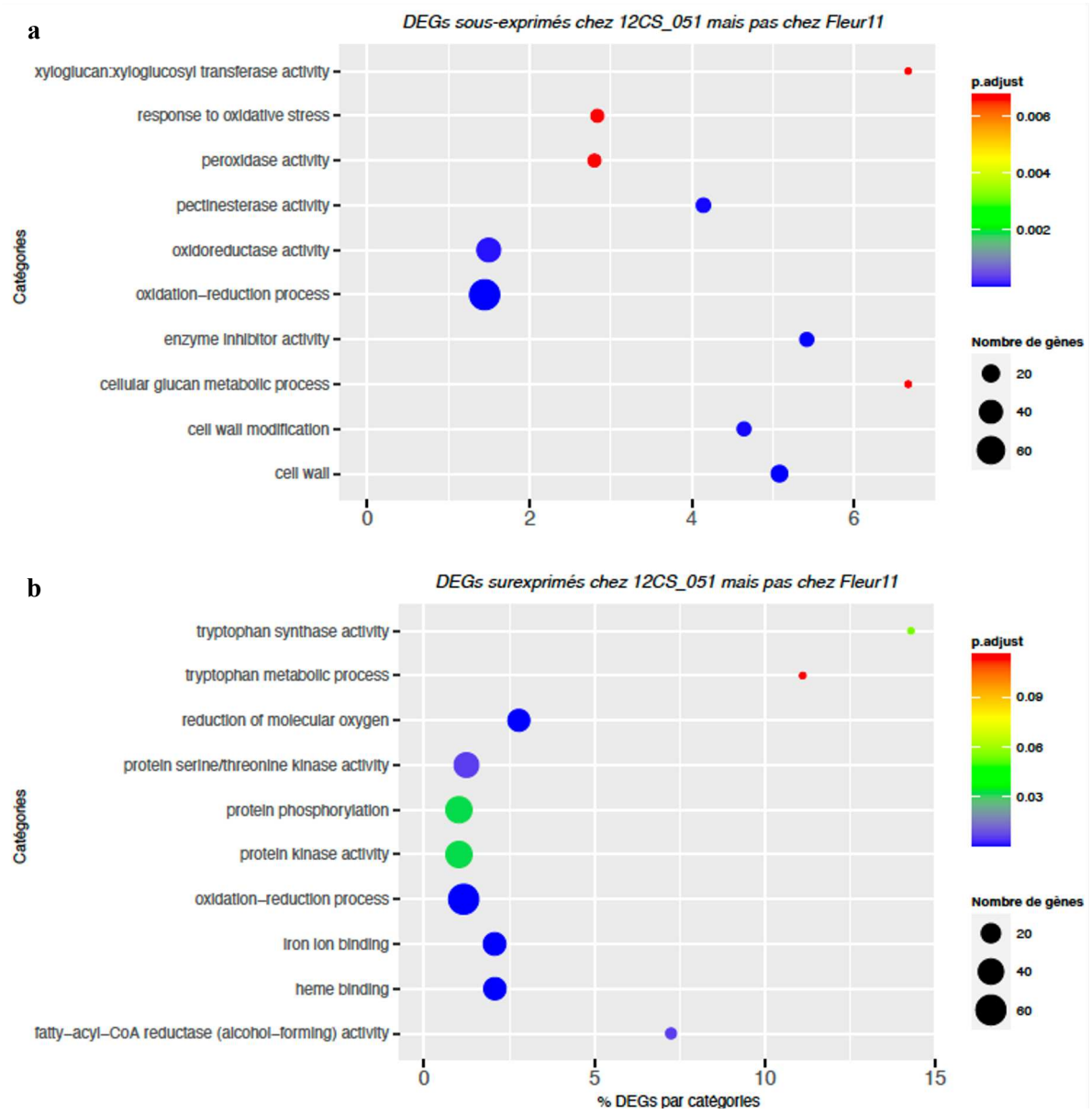


Figure 46. Top 10 de termes GO des gènes sous-exprimés et surexprimés chez 12CS_051, mais pas chez Fleur11

La *p*-value (p.adjust) indique, la significativité de la surreprésentation des termes GO.

– ***Comparaison entre Fleur11 vs 12CS_044***

Au total 2518 gènes sous-exprimés et 2731 gènes surexprimés ont été détectés chez Fleur11et la lignée 12CS_44 (Figure 41b et c). L'analyse comparative des profils d'expression des DEGs identifiés a révélé des fortes variations dans la régulation des gènes (Figure 47a). Par exemple, sur le heatmap des gènes sous-exprimés, certains gènes du cluster 1 ont été réprimés chez Fleur11, et induits chez 12CS_044. Tandis que l'opposé a été observé pour les gènes des clusters 2 et 3 (Figure 47b). Des résultats similaires ont été observés dans les clusters 1 et 2 sur le heatmap des gènes surexprimés.

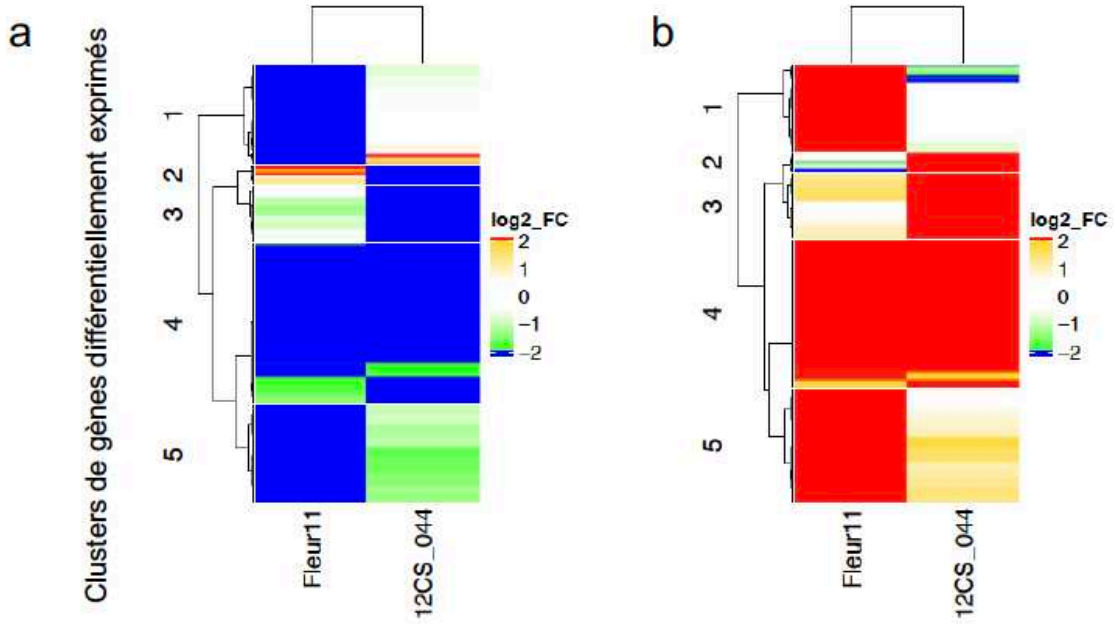


Figure 47. Heatmaps des gènes sous-exprimés (a) et surexprimés (b) chez Fleur11 et 12CS_044
Les DEGs des deux génotypes sont regroupés en « clusters » suivant leur niveau d'expression (log2_FC : log2FoldChange).

La comparaison de gènes différentiellement exprimés entre Fleur11 et la lignée 12CS_044 a montré que 1253 gènes sous-exprimés et 1374 gènes surexprimés ont été détectés uniquement chez Fleur11 (Figure 41b-c). L'analyse fonctionnelle des gènes sous-exprimés a permis d'identifier 20 termes GO significativement enrichis (Annexe 4). Les termes GO liés à la réponse aux stimuli biotiques et ceux de la synthèse de la matière organique ont été parmi les plus représentés (Figure 48a). Concernant les gènes surexprimés 09 termes GO ont été significativement représentés, dont certains sont été impliqués dans les activités et processus d'oxydoréduction, et dans la régulation de l'oxygène (liaison et transport des molécules de O_2) (Figure 48b).

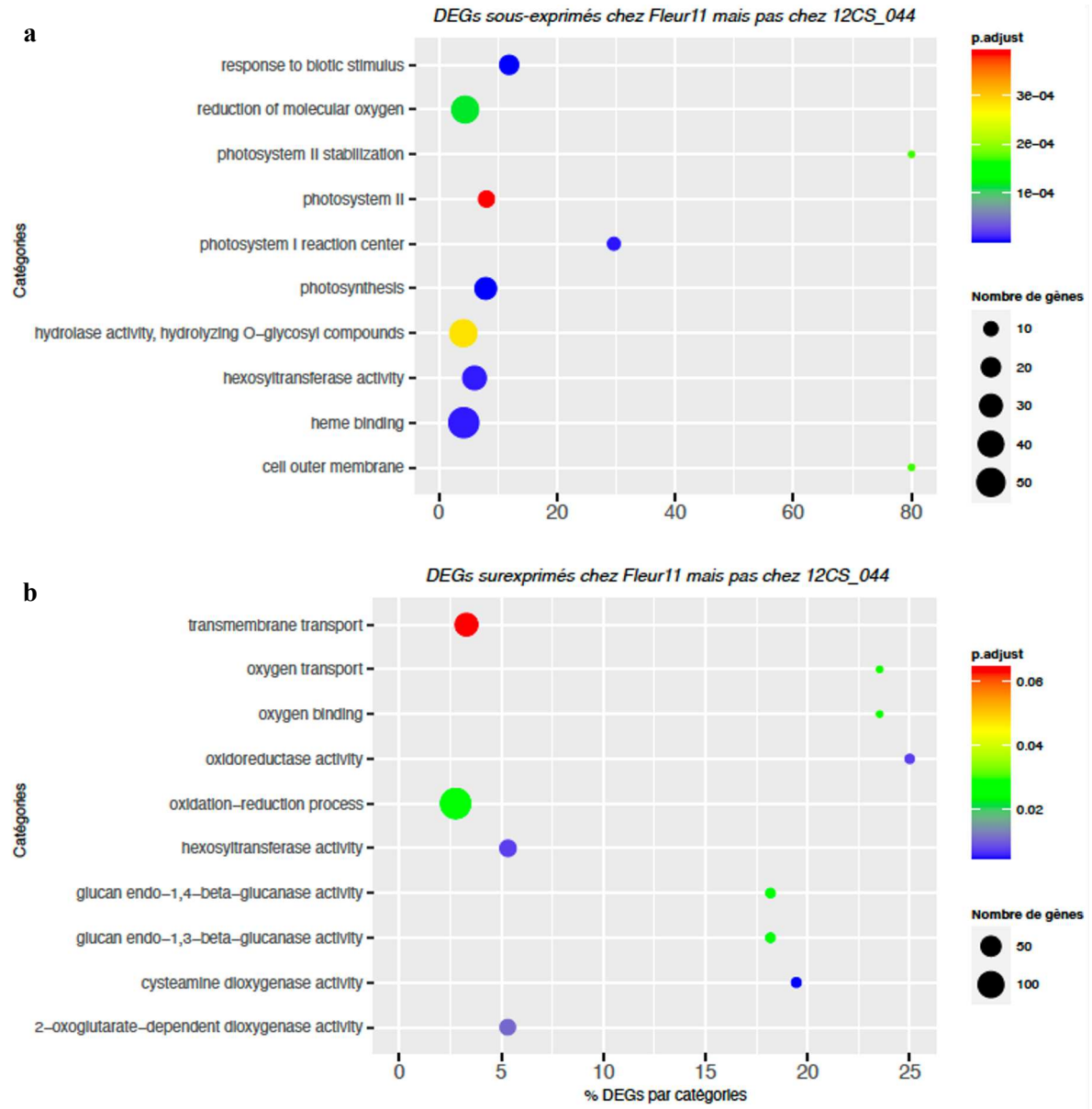


Figure 48. Top 10 de termes GO des gènes sous-exprimés (a) et surexprimés (b) chez Fleur11, mais pas chez 12CS_044

La *p*-value (p.adjust) indique, la significativité de la surreprésentation des termes GO.

Au total 607 gènes sous-exprimés et 588 gènes surexprimés ont été identifiés uniquement chez la lignée 12CS_051 par rapport à Fleur11 (Figure 41b et c). Les résultats de l'analyse d'enrichissement des gènes sous-exprimés ont révélé 16 termes GO significativement enrichis (Annexe 4). Parmi ces termes GO, les plus enrichis se trouvent ceux qui interviennent dans l'espace intercellulaire (apoplasme), la réponse à un stress oxydatif, l'inhibition d'activité enzymatique, et la structure de la paroi cellulaire (Figure 49a). Dans les gènes surexprimés, 18 termes GO ont été significativement représentés, parmi lesquels ceux impliqués dans les

processus métaboliques, la réduction des molécules de O_2 et l'activité de la protéine Sérine/Thréonine kinase (Figure 49b).

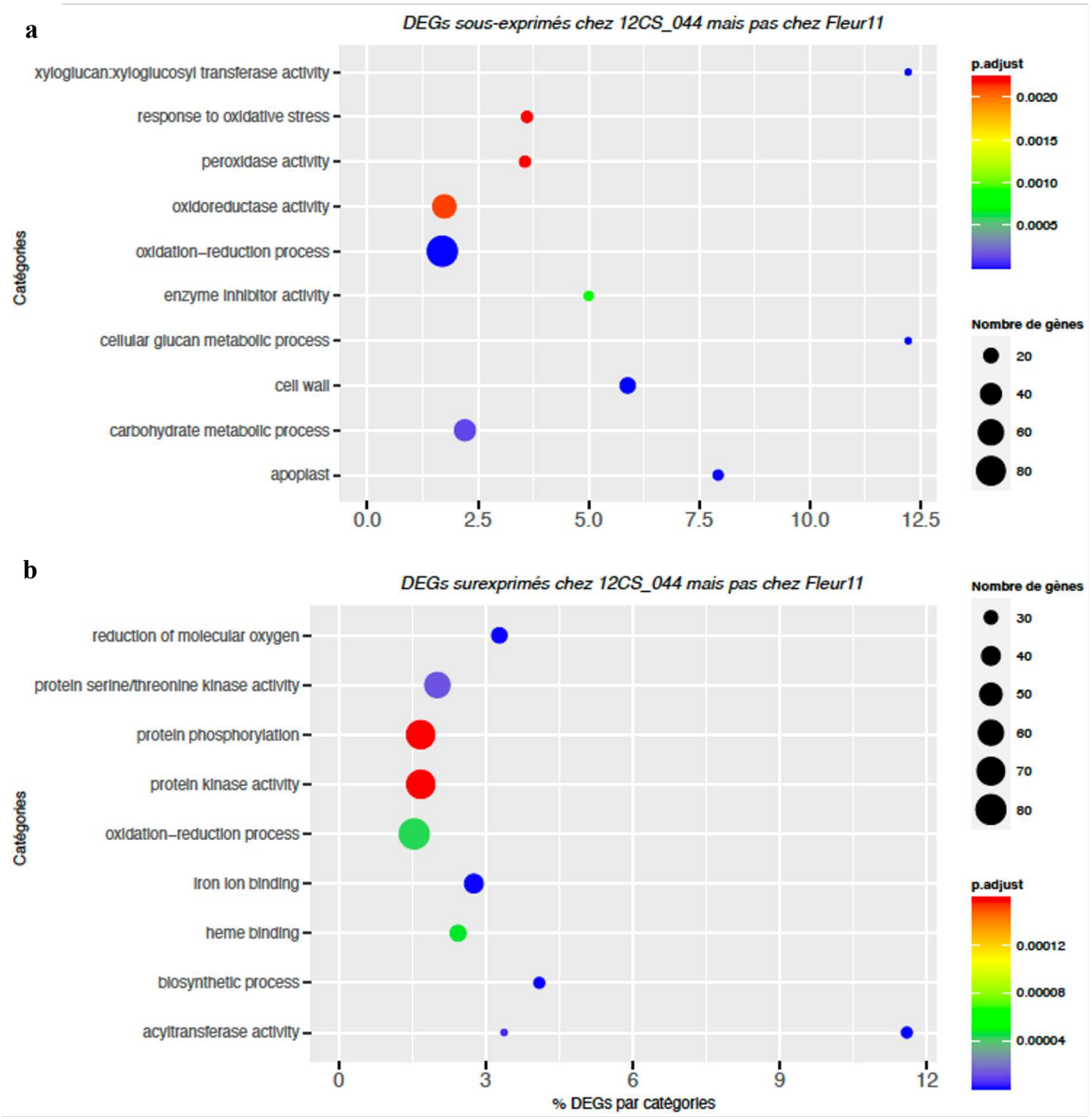


Figure 49. Top 10 de termes GO des gènes sous-exprimés (a) et surexprimés (b) chez 12CS_044, mais pas chez Fleur11
La *p*-value (p.adjust) indique, la significativité de la surreprésentation des termes GO.

III.1.4.3. Analyse de l'expression des orthologues de gènes symbiotiques

Une analyse phylogénétique a été réalisée pour identifier des orthologues de gènes symbiotiques et étudier leurs profils d'expression chez l'arachide. Cette analyse a permis d'identifier les orthologues de 282 gènes symbiotiques en utilisant 13 légumineuses comme référence, parmi les lesquelles les espèces modèles *L. japonicus* et *M. truncatula*. Par la suite,

nous avons recherché parmi les DEGs de chaque génotype les orthologues de gènes symbiotiques sur et sous exprimés. Nous en avons identifié 126 (40 sous-exprimés et 86 surexprimés) chez Fleur11, 76 (19 sous-exprimés et 57 surexprimés) chez 12CS_051 et 87 12CS_044 chez (28 sous-exprimés et 59 surexprimés). Les DEGs symbiotiques de chaque lignée ont été comparés à ceux de Fleur11, afin déterminer les gènes différemment régulés et leurs fonctions dans le processus de nodulation.

- ***Comparaison entre Fleur11 et 12CS_051***

L'analyse comparative entre les DEGs symbiotiques de Fleur11 et de 12CS_051 a permis d'identifier 28 gènes sous-exprimés et 40 gènes surexprimés uniquement chez Fleur11, tandis que 07 gènes sous-exprimés et 11 surexprimés ont été spécifiques à la lignée 12CS_051. Les DEGs spécifiques à Fleur11 ont été majoritairement associés à l'infection du nodule [*LjNPL* (enzyme lyase), *MtAGO5* (multidomain protein)], la signalisation précoce [*MtCHS* (enzyme synthase)], l'organogénèse du nodule [*MtCRE1* (histidine kinase), *MtPIN1/2/3/4* (auxin efflux), *MtRR5/9/11* (response regulator) ou *MtEFD* (ethylene response)] et la reconnaissance bactérienne [*MtLYK9* et *MtLYR10* (nod factor receptor) ou *MtLYR2* (immunity LCO receptor)] (Figures 50 et 51). Quelques gènes impliqués dans le fonctionnement du nodule [*AeGlb3/2* (Globins), *MtMTP2* (zinc efflux) ou *LjFEN1* (homocitrate synthase)] ont également été identifiés (Figures 50 et 51). Par ailleurs, les DEGs spécifiques à 12CS_051 sont surtout impliqués dans la signalisation précoce [*MtCHS* (enzyme synthase) ou *MtCHR* (enzyme oxydoreductase)] et la formation du symbiosome [*MtTIP1g* (water chanels)] (Figures 50 et 51).

- ***Comparaison entre Fleur11 et 12CS_044***

Au total 78 DEGs symbiotiques (22 gènes sous-exprimés et 56 surexprimés) ont été identifiés uniquement chez Fleur11, tandis que 10 gènes sous-exprimés et 29 surexprimés ont été détectés uniquement chez 12CS_044. Les DEGs spécifiques à Fleur11, ont été majoritairement impliqués dans l'organogenèse du nodule [*LjNIN* (transcription factor), *MtRR5/9/11* (response regulator), *MtCRE1* (histidine kinase) ou *MtEFD* (ethylene response factor)], l'infection du nodule [*MtAGO5* (multidomain protein), ou *LjNPL* (Enzyme Lyase)], la reconnaissance de bactérienne [*MtLYK9* et *MtLYR10* (nod factor receptor) ou *MtLYR2* (immunity LCO receptor)] et le fonctionnement du nodule [*AeGlb3/2* (Globins) ou *MtMOT1/2* (molybdate efflux)] (Figures 52 et 53). Concernant les DEGs spécifiques à 12CS_044, on retrouve les gènes associés à la reconnaissance de la bactérie [*GmRj2* (disease resistance protein), *MtLYR5*/*MtLYR6* (Epidermal nod factor receptor)], la signalisation précoce [*MtCHS* (enzyme

synthase) ou *MtCHR* (enzyme oxydoreductase)] et la formation du symbiosome [*MtTIP1g* (water chanels)] (Figures 52 et 53). Une régulation négative du gène *LjLSK1* (Enzyme Kinase) associé à l'autorégulation du nombre de nodule a également été identifiée (Figure 52).

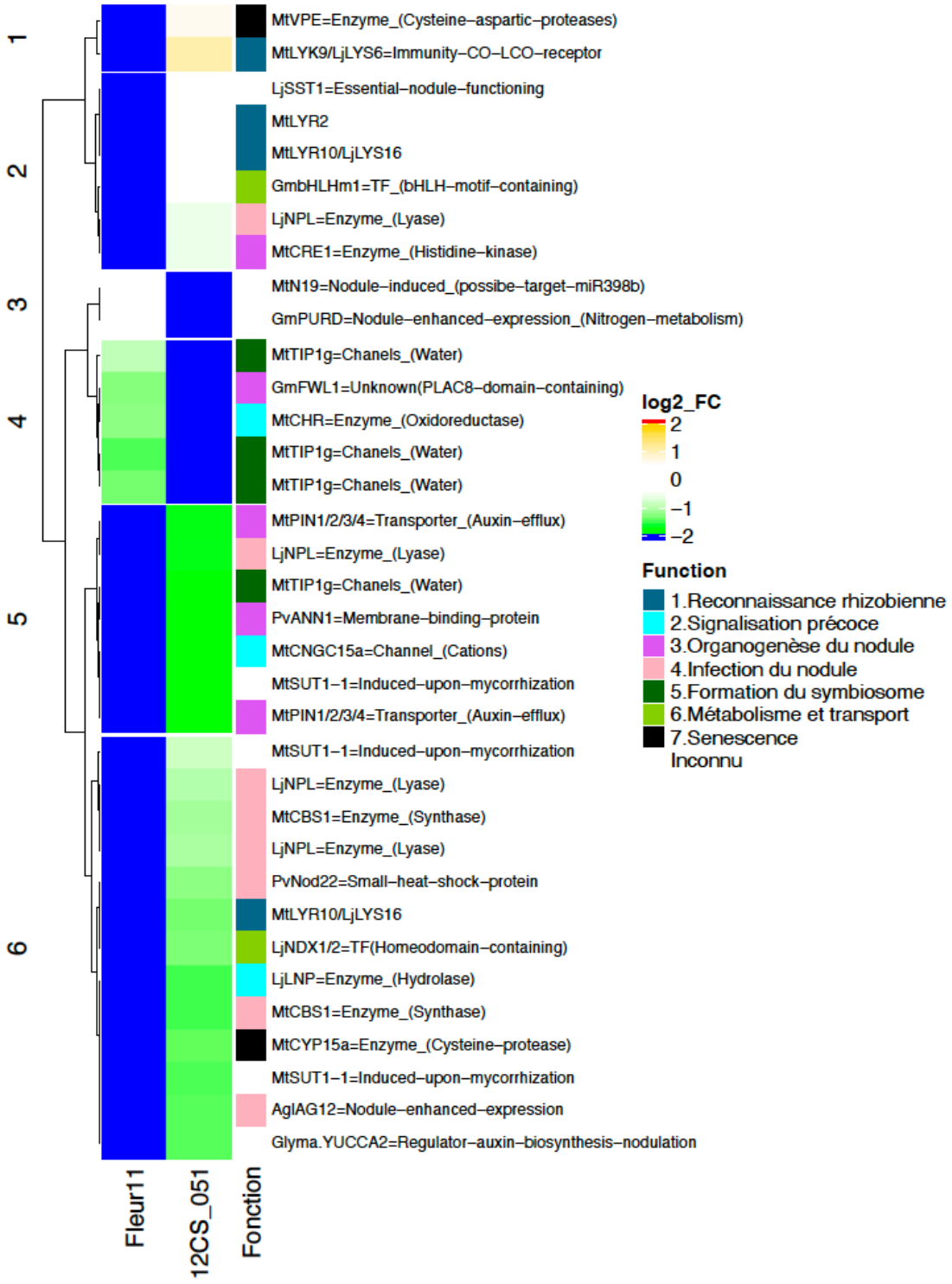


Figure 50. Heatmap des DEGs symbiotiques spécifiques sous-exprimés chez Fleur11 et 12CS_051
Les DEGs des deux génotypes sont regroupés en clusters (numérotés de 1à 6) suivant leur niveau d'expression (log2_FC : log2FoldChange).

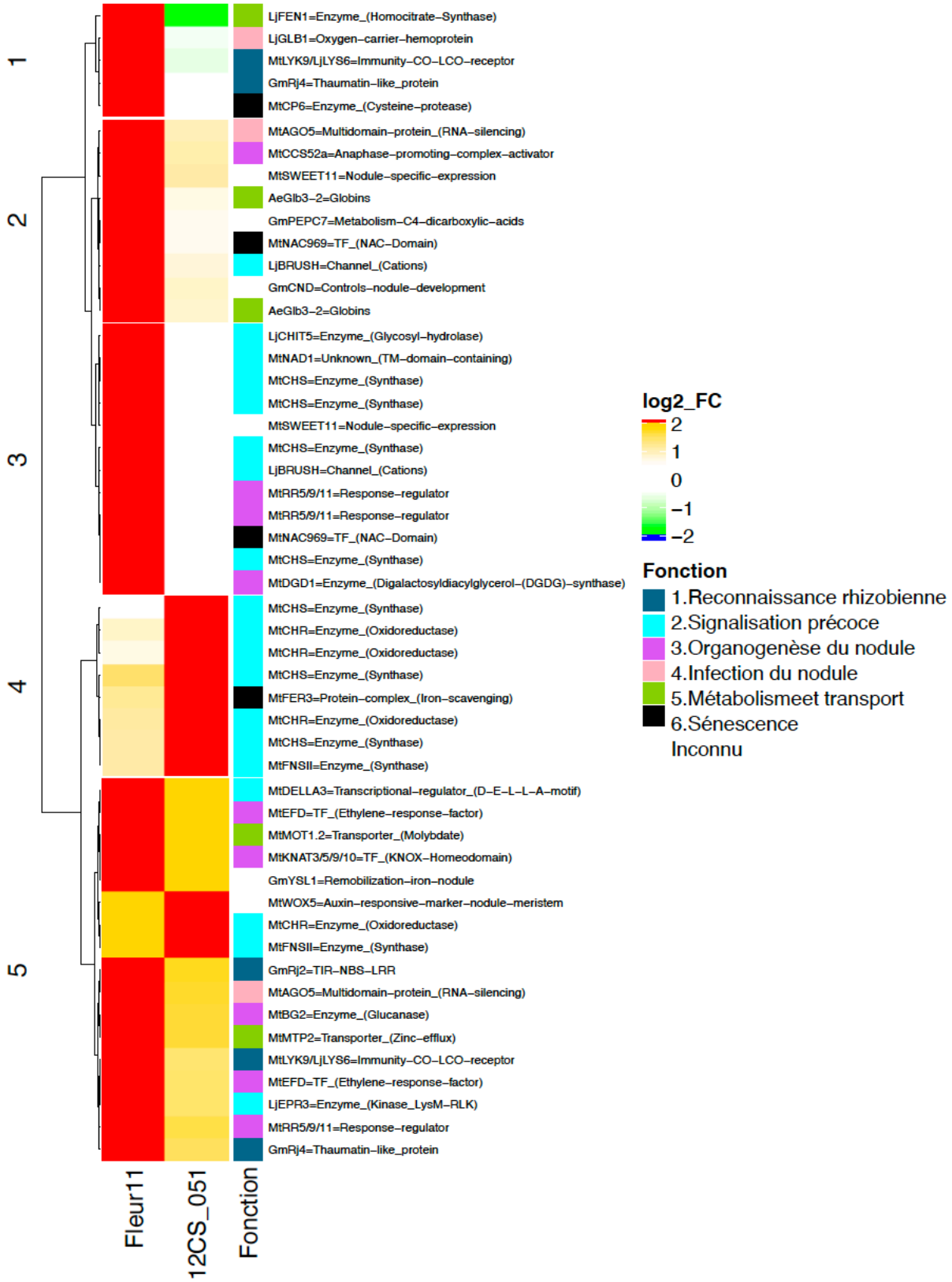


Figure 51. Heatmap des DEGs symbiotiques spécifiques surexprimés chez Fleur11 et 12CS_051

Les DEGs des deux génotypes sont regroupés en clusters (numérotés de 1à 5) suivant leur niveau d'expression (log2_FC : log2FoldChange).

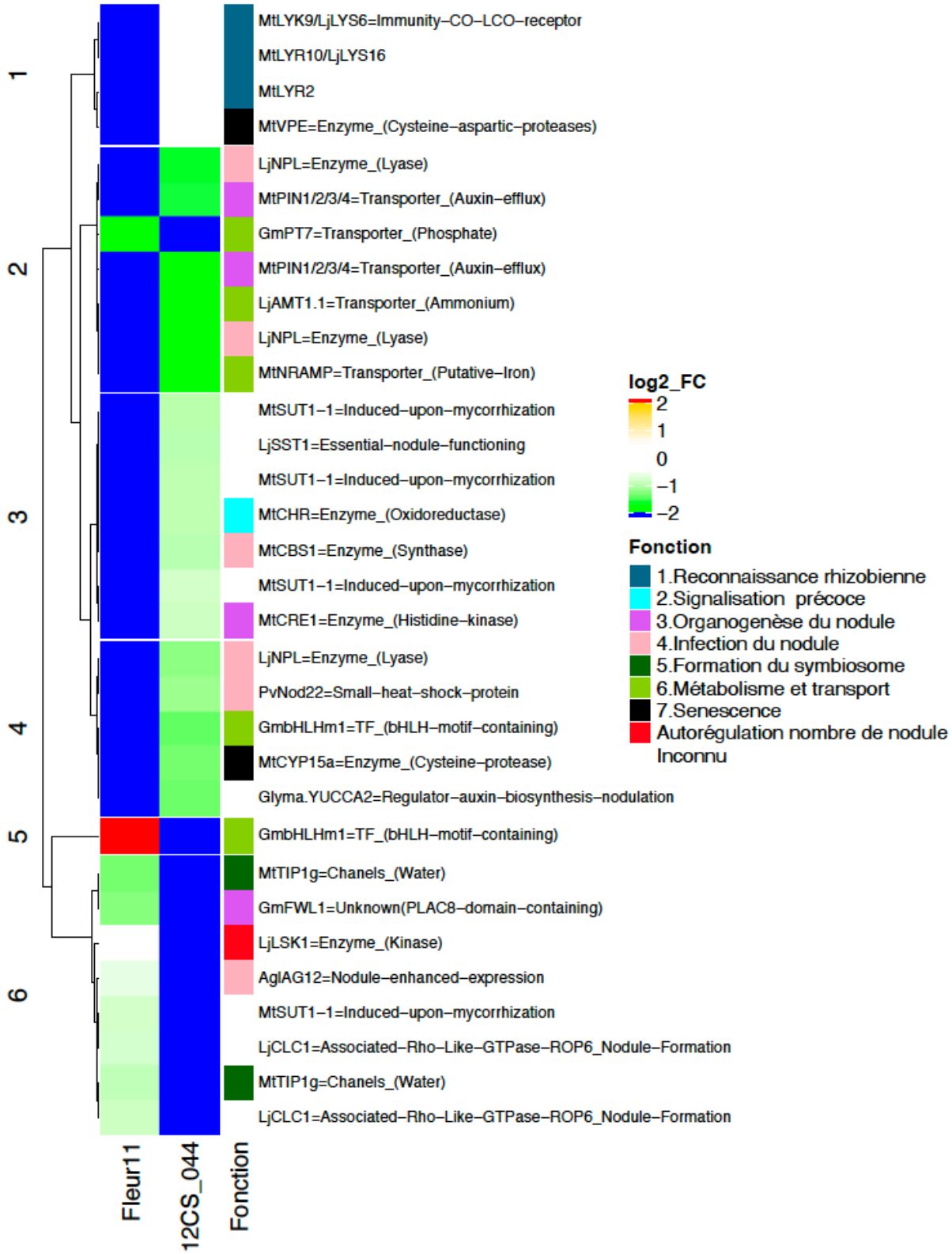


Figure 52. Heatmap des DEGs symbiotiques spécifiques sous-exprimés chez Fleur11 et 12CS_044

Les DEGs des deux génotypes sont regroupés en clusters (numérotés de 1à 6) suivant leur niveau d'expression (log2_FC : log2FoldChange).

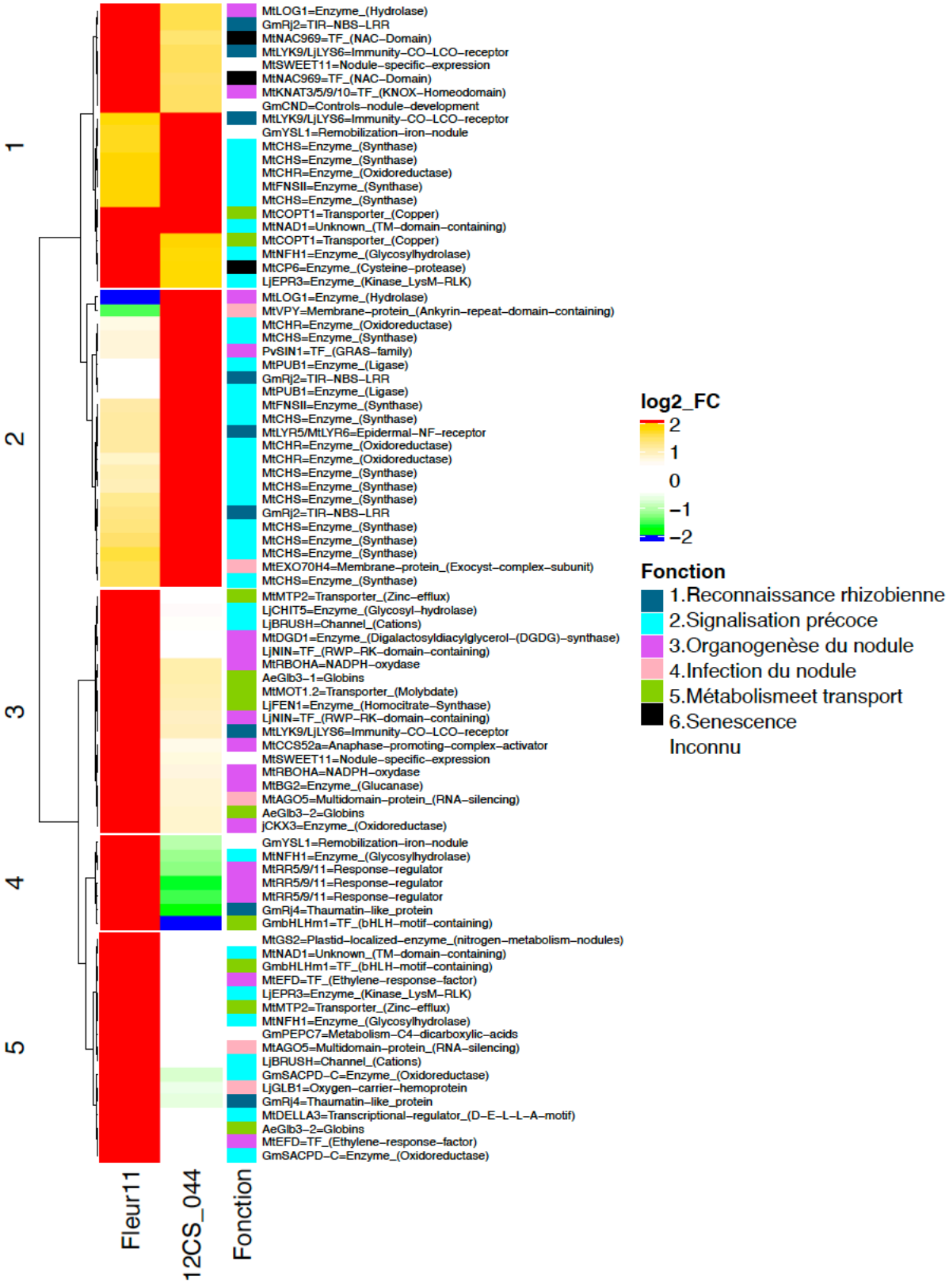


Figure 53. Heatmap des DEGs symbiotiques spécifiques surexprimés chez Fleur11 et 12CS_044
Les DEGs des deux génotypes sont regroupés en clusters (numérotés de 1à 6) suivant leur niveau d'expression (log2_FC : log2FoldChange).

III.1.5. Analyse de l'expression des gènes contenus dans les régions ciblées

Deux fragments de chromosomes sauvages associés à une diminution de la performance symbiotique ont été cartographiés sur le GL A02 de la lignée 12CS_051 et le GL B02 de la lignée 12CS_044. Les régions ciblées sont comprises entre les couples de marqueurs SSR Seq12E03-RM2H10 sur le GL A02 et Seq1B09-Ah3TC13E05 sur le GL B02 (Figure 17). En utilisant, la database de PeanutBase (https://peanutbase.org/gbrowse_peanut1.0), la taille du QTL et le nombre de gènes annotés dans la région ont été évalués dans le génome de l'arachide cultivée (variété Tifrunner). Le QTL localisé sur le GL A02 mesure environ 76 Mbp et contient 1180 gènes annotés. Sur le GL B02, la taille du QTL est d'environ 82,5 Mbp et on dénombre 1095 gènes annotés. Au total 10 et 06 orthologues de gènes symbiotiques ont été retrouvés dans le QTL respectivement sur le GL A02 et B02 (Tableau XVI). Une analyse comparative de l'expression des gènes contenus dans chaque QTL a été réalisée entre Fleur11 et les CSSL.

Tableau XVI : Identification des orthologues de gènes symbiotiques présents dans les régions ciblées sur les groupes de liaison A02 et B02

QTL	Gene ID	Orthologues			Fonction
		M. truncatula	*A. hypogaea*	*A. duranensis/ A. ipaensis*	
A02	*MtLAX2*	MtrunA17_Chr7g0241841	*Arahy.974NLB*	*Aradu.ZM0JI*	Organogenèse du nodule
	MtNOOT	MtrunA17_Chr1g0171771	*Arahy.D2XTM9*	*Aradu.31ZLJ*	
	GmARF8a/8b	MtrunA17_Chr5g0433301	*Arahy.TZ3SVZ*	*Aradu.STB9F*	
	MtSCARN	MtrunA17_Chr4g0004861	*Arahy.ENX9PF*	*Aradu.Z3EUJ*	Infection
	MtVAMP721	MtrunA17_Chr2g0291651	*Arahy.3N3RG9*	*Aradu.3XT84*	Formation du symbiosome
			Arahy.JUA6LJ	*Aradu.Q6WYU*	
	MtSymREM1	MtrunA17_Chr8g0386521	*Arahy.E67BSD*	-	
	LjFEN1	MtrunA17_Chr7g0226821	*Arahy.SVFK59*	*Aradu.0A06I*	Fonctionnement du nodule
		MtrunA17_Chr1g0213481	*Arahy.R43499*	*Aradu.F9JCM*	
				Aradu.TP8FN	
	LjAMT1.1	MtrunA17_Chr1g0168631	*Arahy.E0EAR0*	*Aradu.KH25W*	
	GmPT5	MtrunA17_Chr7g0261231	*Arahy.XB7U2C*	*Aradu.ZC0SW*	
				Aradu.E3REX	
	MtFER3	MtrunA17_Chr4g0005581	*Arahy.MAQ2UP*	*Aradu.N8FJN*	Senescence
B02	*MtLAX2*	MtrunA17_Chr7g0241841	*Arahy.B2YEC9*	*Araip.TU273*	Organogenèse du nodule
	MtNOOT	MtrunA17_Chr1g0171771	*Arahy.K4FBU4*	*Araip.RJS33*	

MtSCARN	MtrunA17_Chr4g0004861	*Arahy.6AJ8U6*	*Araip.0SG8W*	Infection
LjFEN1	MtrunA17_Chr7g0226821	*Arahy.I9TRT4*	*Araip.82ZQZ*	Formation du symbiosome
		Arahy.T5GDAR	*Araip.N3U2H*	
	MtrunA17_Chr1g0213481	*Arahy.14SFHV*	*Araip.J9L15*	
		Arahy.I3BSCY	*Araip.VLA9D*	
		Arahy.Y8K7VT	*Araip.X1RXQ*	
MtFER3	MtrunA17_Chr4g0005581	*Arahy.B2GHU0*	*Araip.S9G3C*	Senescence
GmBEHL1	MtrunA17_Chr5g0403631	*Arahy.ZGY2QD*	*Araip.C7RCE*	Autorégulation du nombre de nodules

III.1.5.1. Analyse des DEGs identifiés dans le QTL localisé sur le GL A02

Parmi les 1180 gènes annotés dans la région ciblée, 64 DEGs (29 sous-exprimés et 35 sur-exprimés) ont été détectés chez Fleur11. Tandis que, 26 DEGs (12 sous-exprimés et 14 surexprimés) ont été identifiés chez 12CS_051. La Figure 54 présente le profil d'expression des DEGs identifiés chez les deux génotypes, et l'annotation fonctionnelle des gènes régulés différemment entre les deux génotypes. Au total, 49 gènes (21 sous-exprimés et 28 surexprimés) ont été identifiés uniquement chez Fleur11, et 11 gènes (4 sous-exprimés et 7 surexprimés) ont été spécifiques à 12CS_051 (Figure 54a et b). L'analyse fonctionnelle n'a pas révélé des termes GO significativement enrichis. Toutefois, parmi les fonctions les plus représentées on a retrouvé le transport et le stockage cellulaire des ions Fer ou encore le système de défense de la plante (Figure 54c). Parmi les orthologues de gènes symbiotiques, deux gènes ont été détectés parmi les DEGs. Le gène *Arahy.R43499* a été surexprimé chez Fleur11 et faiblement sous-exprimé chez 12CS_051. Ce gène code un homocitrate synthase et intervient dans le fonctionnement du nodule. Le gène *Arahy.MAQ2UP* a été surexprimé chez 12CS_051 et faiblement exprimé chez Fleur11. Il code une protéine complexe impliquée dans la senescence des tissus.

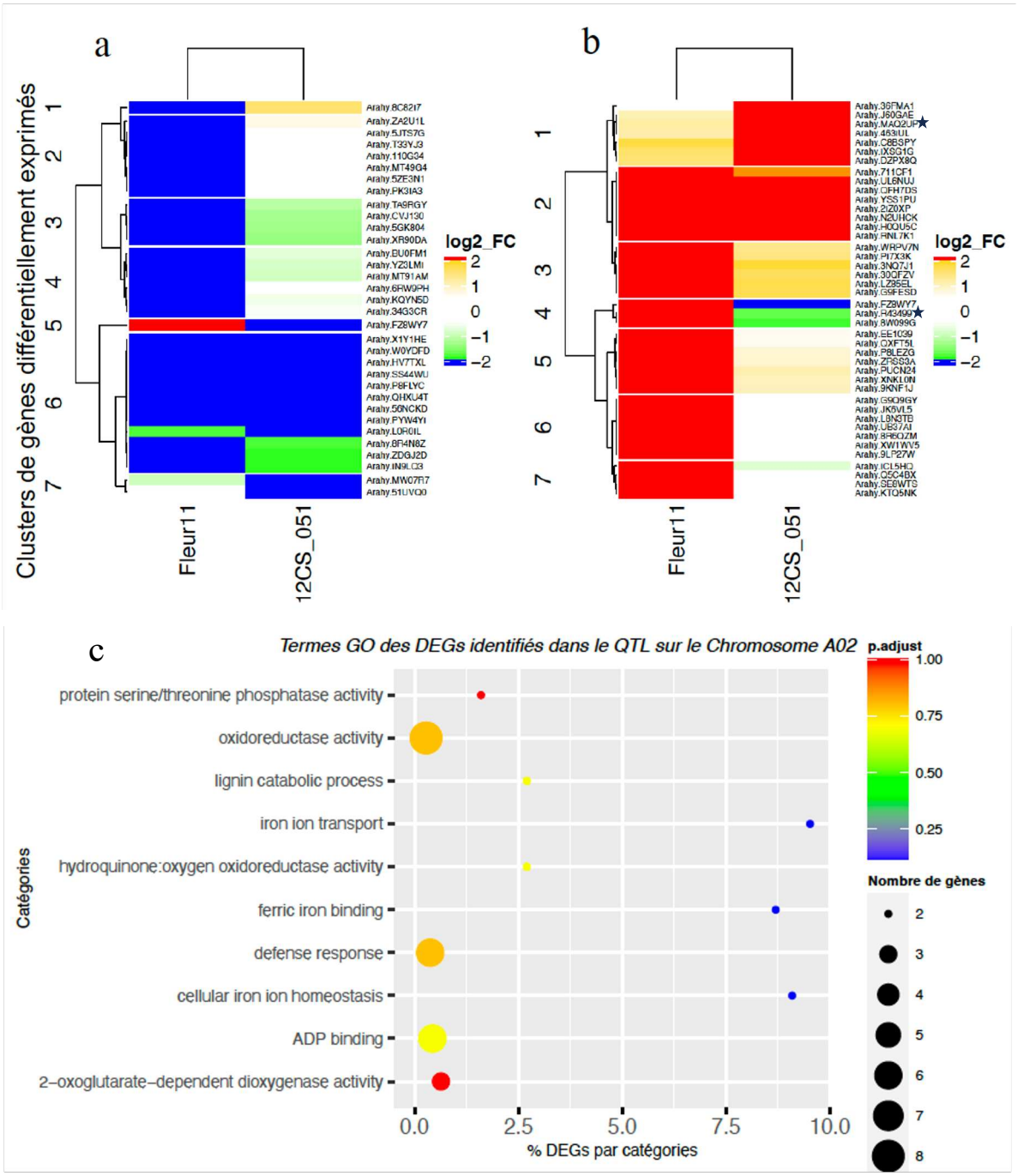


Figure 54. Profil d'expression et analyse fonctionnelle des DEGs identifiés dans le QTL sur le GL A02 de Fleur11 et 12CS_051

(a) et (b) correspondent respectivement aux heatmaps des gènes sous et sur exprimés. Les DEGs des deux génotypes sont regroupés en clusters (numérotés de 1à 7) suivant leur niveau d'expression (log2_FC : log2FoldChange). L'étoile indique les orthologues de gènes symbiotiques. (c) présente le top 10 des termes GO les plus enrichis. La *p*-value (p.adjust) indique, la significativité de la surreprésentation des termes GO.

III.1.5.2. Analyse des DEGs identifiés dans le QTL localisé sur le GL B02

Dans la région ciblée sur le GL B02, 55 gènes (23 sous-exprimés et 32 surexprimés) et 31 (12 sous-exprimés et 19 surexprimés) ont été identifiés respectivement chez Fleur11 et 12CS_044. Parmi les DEGs détectés chez Fleur11, 34 gènes (15 sous-exprimés et 19 surexprimés) n'étaient pas différentiellement exprimés chez 12CS_044. De même que 10 gènes (4 sous-exprimés et 7 surexprimés) identifiés chez 12CS_044, n'ont pas été détectés chez Fleur11 (Figure 55a et b). L'analyse fonctionnelle de ces DEGs n'a pas révélé des termes GO significativement enrichis. Cependant, parmi les fonctions les plus représentées, on retrouve le système de défense de la plante, la traduction du signal ou encore la division cellulaire (Figure 55c). Concernant, les orthologues de gènes symbiotiques, le gène *Arahy.Y8K7VT* a été surexprimé chez Fleur11 et 12CS_044. Ce gène intervient dans le fonctionnement du nodule.

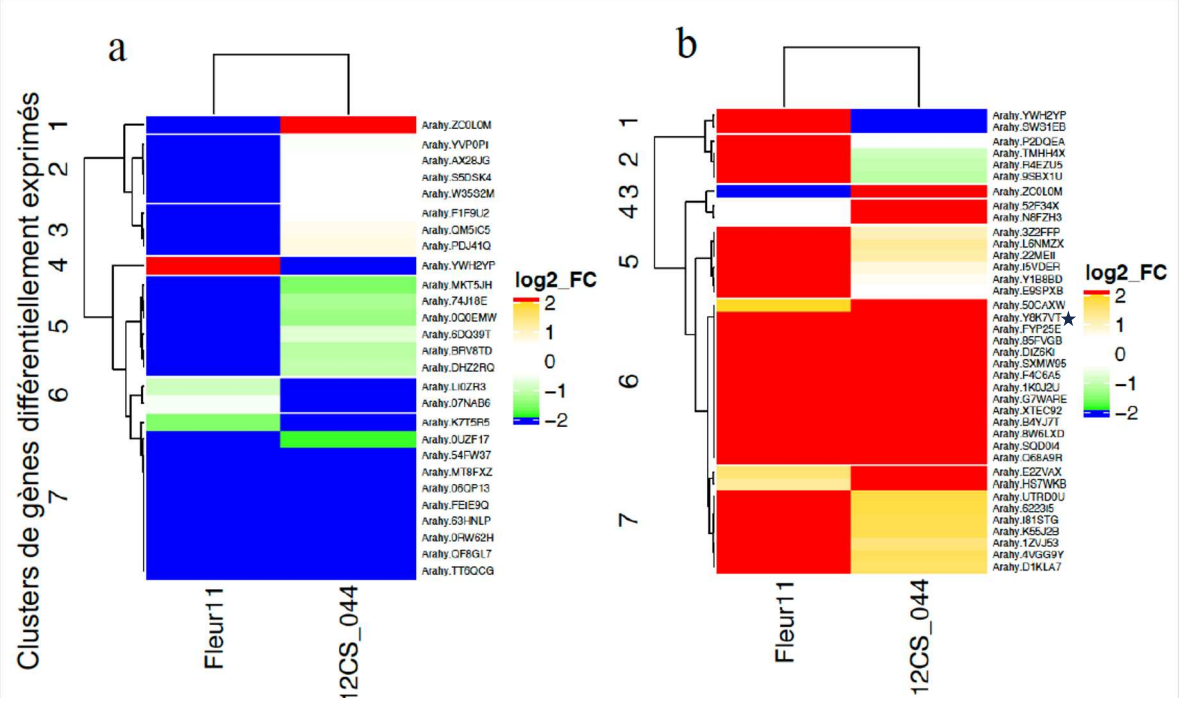


Figure 55. Suite

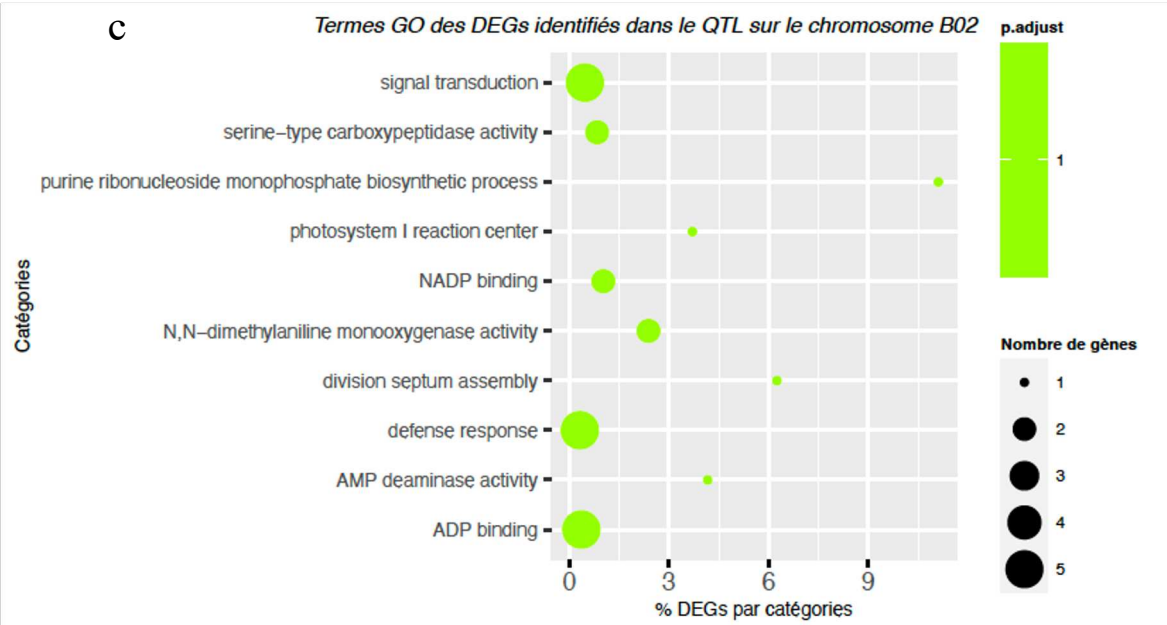


Figure 55. Profil d'expression et analyse fonctionnelle des DEGs identifiés dans le QTL sur le GL B02 de Fleur11 et 12CS_044

(a) et (b) correspondent respectivement aux heatmaps des gènes sous et sur exprimés. Les DEGs des deux génotypes sont regroupés en clusters (numérotés de 1à 7) suivant leur niveau d'expression (log2_FC : log2FoldChange). L'étoile indique les orthologues de gènes symbiotiques. (c) présente le top 10 des termes GO les plus enrichis. La *p*-value (p.adjust) indique, la significativité de la surreprésentation des termes GO.

III.2. Variation de la réponse à l'inoculation des NIL et cartographie fine de QTL

L'interaction d'une population de 23 NIL et leurs parents (la variété Fleur11 et la lignée 12CS_044) avec la souche efficace ISRA400 (*B. vignae*) a été évaluée durant deux expérimentations indépendantes en conditions contrôlées. La teneur en chlorophylle des feuilles a été utilisée comme indicateur de la performance symbiotique. La lignée 12CS_044 a montré une faible teneur en chlorophylle (Planche 9a), et a formé de petits nodules blancs non fixateurs de l'azote atmosphérique (phénotype Fix-) (Planche 9b). Par ailleurs, la variété Fleur11 a présenté une teneur en chlorophylle des feuilles élevée (Planche 9a), et a formé de gros nodules fixateurs d'azote (phénotype Fix+) (Planche 9c). Au sein de la population NIL, tous les génotypes ont formé des nodules. La distribution bimodale des valeurs de teneur en chlorophylle a permis de distinguer globalement deux principaux groupes (Planche 9a). Un groupe Fix- qui est constitué des individus avec un phénotype nodulant similaire à celui de 12CS_044, et une teneur en chlorophylle estimée par le SPAD comprise entre 10 et 30. Un groupe Fix+, qui comprend les individus avec un phénotype nodulant semblable à celui de

Fleur11, et une teneur en chlorophylle estimée par le SPAD, qui varie entre 30 et 50. La distribution bimodale des phénotypes indique, la ségrégation d'un seul gène. Les résultats de l'ANOVA ont montré un effet génotype significatif sur la teneur en chlorophylle des feuilles dans les deux expérimentations, et les comparaisons de moyennes ont révélé la présence de 3 groupes de NIL (Figure 56). Le groupe Fix- qui comprend les NIL significativement identiques à la lignée 12CS_044. Le groupe Fix+ qui contient les NIL significativement similaires à Fleur11. Et enfin, le groupe Fix+Fix- qui inclus les NIL significativement différentes à la fois de Fleur11, et de 12CS_044 (i.e., des NIL intermédiaires entre les deux parents). Ces résultats associés à la distribution bimodale des phénotypes indiquent une ségrégation monogénique, où les groupes Fix- et Fix+ sont constitués des individus homozygotes au gène, et le groupe Fix+Fix- qui comprendrait des individus hétérozygotes au gène.

Dans la première expérimentation, nous avons identifiés 11 NIL Fix+, 06 NIL Fix-, 06 NIL Fix+Fix- (Figure 56). Dans la deuxième expérimentation, deux NIL (7-1-15-3 et 7-35-16) n'ont pas été évaluées à cause des pathogènes fongiques endogènes aux graines, qui ont limité la viabilité des jeunes plantes. Les comparaisons de moyennes ont révélé 10 NIL Fix+, 05 NIL Fix- et 06 NIL Fix+Fix- (Figure 56). Au total, 07 NIL Fix+, 04 NIL Fix- et 04 NIL Fix+Fix- ont été systématiquement identifiées dans les deux expérimentations. En revanche, pour certaines NIL, la réponse à l'inoculation est très variable. C'est par exemple le cas des génotypes 7-8-58-10 et 2-9-100-9 qui ont un phénotype Fix+ et Fix+Fix- respectivement dans la première et la seconde expérimentation. De même que, le génotype 7-8-58-15 qui a un phénotype Fix- dans la première expérimentation et un phénotype Fix+Fix- dans la seconde.

La cartographie fine du QTL a été réalisée à partir des NIL ayant montré un phénotype stable dans les deux expérimentations. Elle a consisté à une analyse des différences et/ou similitudes phénotypiques et génotypiques observées d'une part entre les NIL et d'autre part entre les NIL et les parents. L'analyse de la cartographie des QTL a montré qu'il n'y a pas de concordance entre les recombinaisons observées dans la région ciblée et les phénotypes des NIL (Figure 57). En effet, les 04 NIL ayant un phénotype similaire à celui du parent 12CS_044, possèdent des fragments de chromosomes sauvages similaires ou chevauchants avec d'autres NIL ayant un phénotype différent. C'est par l'exemple le cas de NIL 2-9-100-3 (Fix+/Fix+) et 2-9-100-6 (Fix-/Fix-), qui possèdent des introgressions sauvages identiques. De même que, les NIL 7-8-58-1 (Fix-/Fix-) et 7-1-15-15 (Fix+Fix+), qui possèdent des fragments de chromosomes chevauchants. Par conséquent, les associations génotype × phénotype n'ont pas permis d'affiner la taille du QTL sur le GL B02.

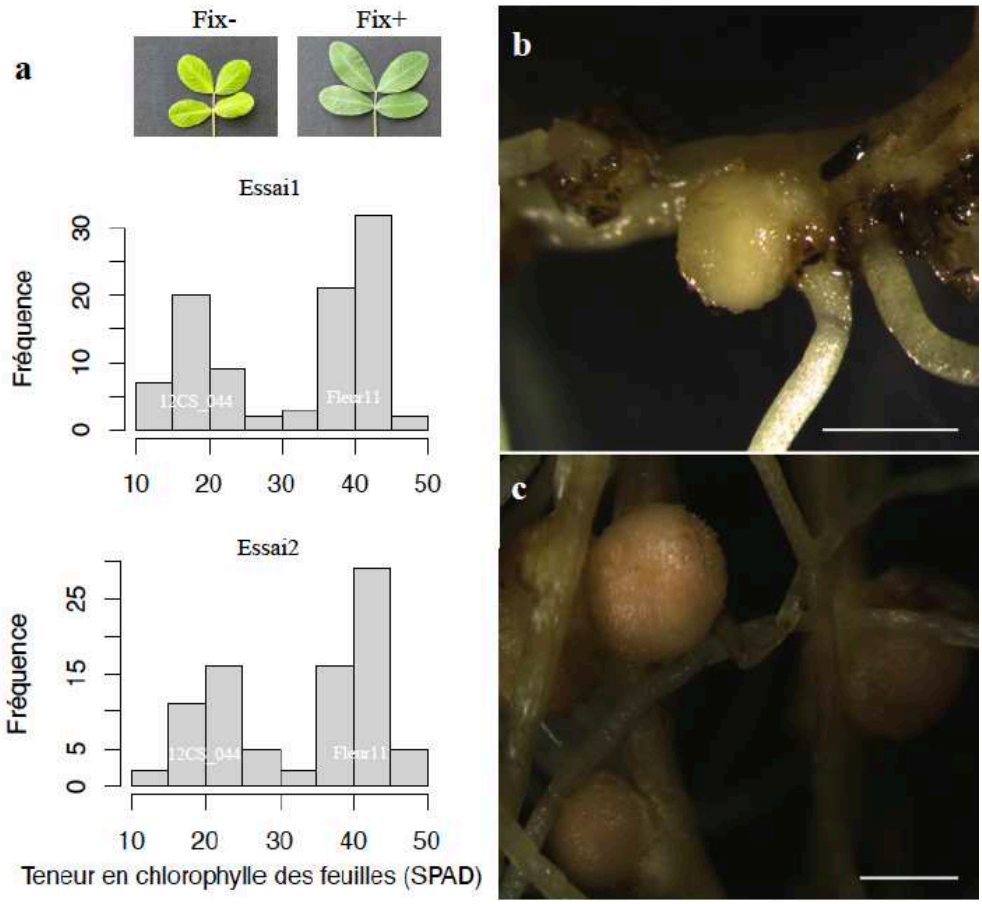


Planche 9. Variations phénotypiques de la réponse à l'inoculation au sein de la population NIL (a) Distribution des valeurs de teneur en chlorophylle des feuilles estimées par le SPAD ; (b) Nodule de la lignée 12CS_044 ; (c) Nodule de Fleur11. Barre échelle = 1 cm.

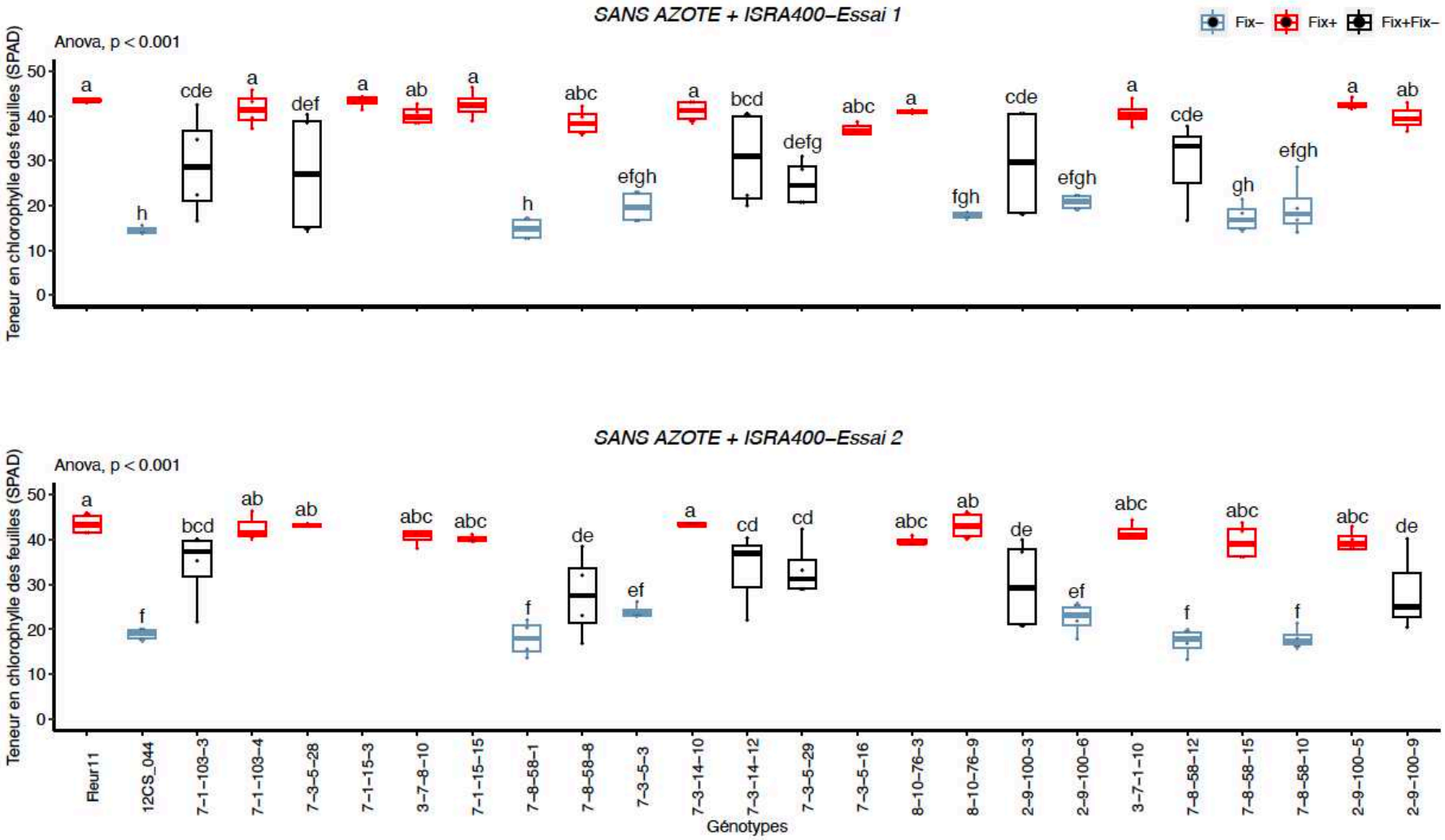
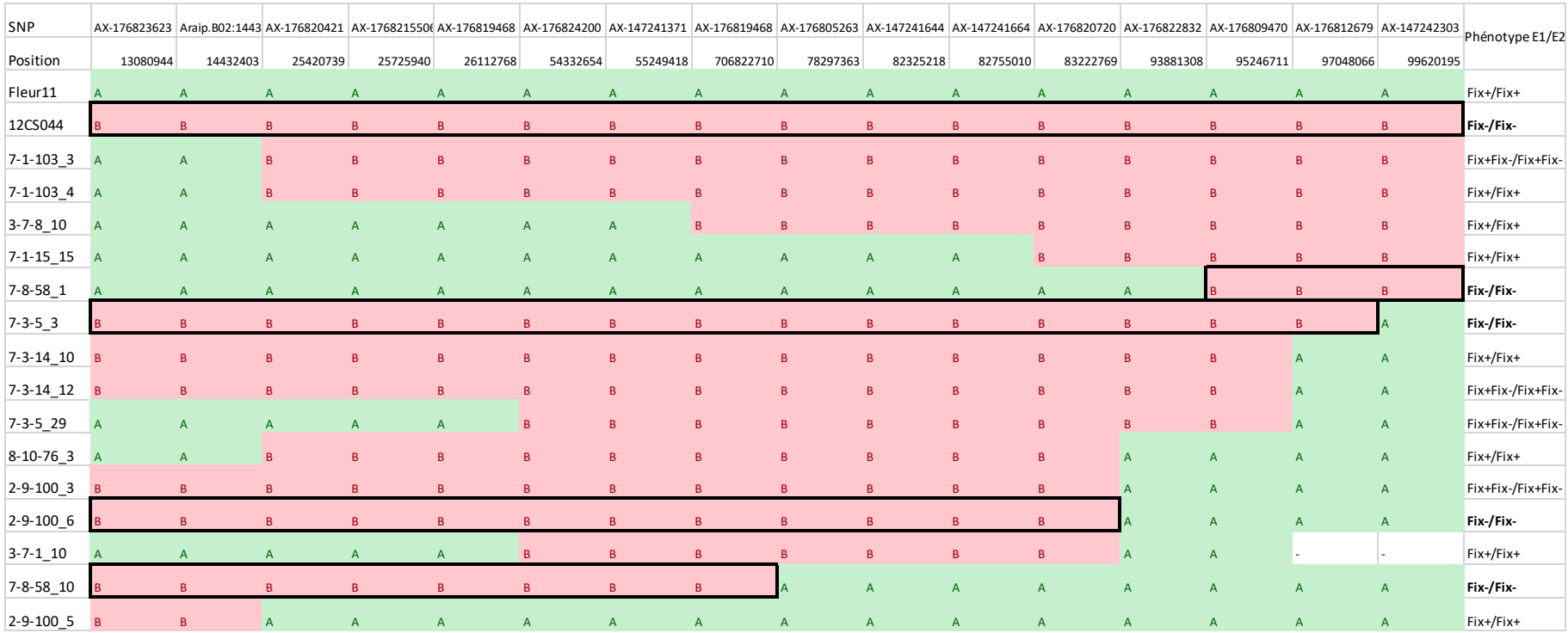


Figure 56. Variation de la teneur en chlorophylles des feuilles au sein de la population NIL

Les moyennes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes avec le test de Duncan au seuil de 5%. Fix- : NIL similaires à 12CS_044 ; Fix+ : NIL similaires à Fleur11 ; Fix+Fix- : NIL différentes de Fleur11 et de 12CS_044.



SNP	AX-176823623	Araip.B02:1443	AX-176820421	AX-176821550	AX-176819468	AX-176824200	AX-147241371	AX-176819468	AX-176805263	AX-147241644	AX-147241664	AX-176820720	AX-176822832	AX-176809470	AX-176812679	AX-147242303	Phénotype E1/E2
Position	13080944	14432403	25420739	25725940	26112768	54332654	55249418	706822710	78297363	82325218	82755010	83222769	93881308	95246711	97048066	99620195	
Fleur11	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Fix+/Fix+
12CS044	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	**Fix-/Fix-**
7-1-103_3	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	Fix+Fix-/Fix+Fix-
7-1-103_4	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	Fix+/Fix+
3-7-8_10	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	Fix+/Fix+
7-1-15_15	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	Fix+/Fix+
7-8-58_1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	**Fix-/Fix-**
7-3-5_3	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	**Fix-/Fix-**
7-3-14_10	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	Fix+/Fix+
7-3-14_12	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	Fix+Fix-/Fix+Fix-
7-3-5_29	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	Fix+Fix-/Fix+Fix-
8-10-76_3	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	Fix+/Fix+
2-9-100_3	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	Fix+Fix-/Fix+Fix-
2-9-100_6	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	**Fix-/Fix-**
3-7-1_10	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	-	-	Fix+/Fix+
7-8-58_10	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	**Fix-/Fix-**
2-9-100_5	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Fix+/Fix+

Figure 57. Associations génotype × phénotype des NIL ayant montré un phénotype stable dans les deux expérimentations

La lettre A et le fond vert indiquent le génotype de Fleur11 (*A. hypogaea*). La lettre B et le fond rouge correspondent au génotype sauvage (*A. ipaensis*) de la lignée 12CS_044. E1 et E2 désignent respectivement les expérimentations 1 et 2. Les fragments de chromosomes sauvages portés par les NIL ayant un phénotype similaire à celui la lignée 12CS_044 sont représentés par des contours noirs.

IV. Discussion

IV.1. Analyse des profils transcriptomiques durant le processus de nodulation chez Fleur11 et les lignées

L'interaction de la variété Fleur11 avec la souche bactérienne *B. vignae* ISRA400 est caractérisée par la formation de gros nodules infectés par des bactéries différentiées en bactéroïdes et fixateurs d'azote (Planche 8a-e). Bien que, les lignées 12CS_051 et 12CS_044 aient formé des nodules avec la souche ISRA400, ces derniers ont été de petite taille, et ont montré une faible colonisation des cellules par des bactéries différentiées en bactéroïdes (Planche 8f-o). Cette altération du processus de nodulation s'est manifestée par une teneur en chlorophylle des lignées significativement inférieure à celle de Fleur11 (Figure 38). Ces observations suggèrent que les introgressions sauvages portées par ces lignées auraient fortement limité la fixation d'azote, et seraient impliquées dans les étapes tardives du processus de nodulation. Pour comprendre au niveau moléculaire les différences phénotypiques observées, une approche RNA-Seq a été utilisée afin d'analyser le profil d'expression des gènes durant le processus symbiotique chez les lignées et leur parent récurent Fleur11. En examinant le nombre de DEGs identifiés chez chaque génotype, nous avons observé que le nombre de DEGs de Fleur11 était quasiment le double du nombre de DEGs de chaque lignée (Figure 41a-c). Ce qui indique une différence considérable dans la régulation de gènes durant le processus de nodulation. L'analyse fonctionnelle comparative entre Fleur11 et les CSSL a montré une expression différentielle importante pour de nombreux gènes impliqués dans des voies métaboliques liées à la symbiose telles que le système de défense de la plante, le transport du O_2, ou encore la réponse aux stress oxydatif (Figures 45, 46, 48 et 49). Plusieurs gènes impliqués dans l'immunité de la plante et le transport du O_2 ont été respectivement sous-exprimés et surexprimés uniquement chez Fleur11. Les mécanismes de défense de la plante jouent un rôle crucial dans l'établissement et le maintien de la symbiose légumineuse-*rhizobia* (Gourion *et al.*, 2015; Gully *et al.*, 2018; Vlk *et al.*, 2022). Karmakar *et al.* (2018) ont montré que l'établissement d'une symbiose efficace chez l'arachide, est associé à une inhibition de l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'immunité de la plante. La régulation du O_2 est également un facteur clé de la symbiose légumineuse-*rhizobia* (Layzell, 2000). Plusieurs études ont montré que des nodules fixateurs sont caractérisés par une surexpression des gènes qui régulent la synthèse de protéines telles que les leghémoglobines, qui sont impliquées dans le transport du O_2 (Ott *et al.*, 2005; Quilbé *et al.*, 2021; Hakim *et al.*, 2023). Dans l'interaction légumineuse-*rhizobia*, la réponse au stress oxydatif peut consister à la synthèse d'antioxydants afin limiter les dommages oxydatifs dans la cellule (Chang *et al.*, 2009). Nos résultats ont

montré une régulation négative des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif uniquement chez les lignées. Muñoz *et al.* (2015) ont rapporté une augmentation de la synthèse des antioxydants durant la nodulation chez l'arachide. Par conséquent, une expression différentielle des gènes associés à l'immunité de la plante et la régulation de l'oxygène, pourrait se manifester par des différences importantes dans le processus symbiotique entre Fleur11 et les CSSL.

L'analyse fonctionnelle comparative entre les DEG de Fleur11 et des CSSL a également permis de montrer une expression différentielle de plusieurs orthologues de gènes symbiotiques. Les DEGs symbiotiques identifiés uniquement chez Fleur11 ont été majoritairement associés aux étapes d'organogénèse, d'infection et de fonctionnement du nodule (Figures 50-53). Parmi ces DEGs, on retrouve plusieurs gènes importants de la voie de signalisation symbiotique tels que les orthologues de *LjNIN* (transcription factor), *MtEFD* (ethylene response), *MtCRE1* (histidine kinase) ou *MtRR5/9/11* (response regulator) qui jouent un rôle essentiel dans la formation et le développement du nodule. Par exemple chez la lignée 12CS_044, les deux orthologues de *LjNIN* étaient très peu exprimés, tandis qu'ils étaient fortement exprimés chez Fleur11. Une altération de l'expression de *LjNIN/MtNIN* peut affecter considérablement la formation et le développement du nodule, ou encore peut aboutir à une suppression de l'organogénèse du nodule chez *L. japonicus* et *M. truncatula* (Schauser *et al.*, 1999; Marsh *et al.*, 2007). De plus, *LjNIN* est un gène clé qui contrôle l'activation d'autres gènes nécessaires à l'organogénèse tels que *MtCRE1*, *MtNSP1/2*, *MtRR5/9/11* et *MtEFD* (Roy *et al.*, 2020). D'autres DEGs symbiotiques impliqués dans l'infection [*LjNPL* (enzyme lyase), *MtAGO5* (multidomain protein)] et le fonctionnement du nodule [*LjFEN1* (homocitrate synthase), *MtMTP2* (zinc efflux) ou *AeGlb3/2* (Globins)] ont été identifiés uniquement chez Fleur11. La surexpression de *AeGlb3/2* chez Fleur11 traduirait la synthèse de la leghémoglobine et la formation de nodules fonctionnels. En revanche, les lignées ont montré une très faible expression *AeGlb3/2*, qui expliquerait de la formation de nodules peu ou pas fonctionnels. Quilbé *et al.* (2021) ont montré une régulation positive de *AeGlb3/2* durant la nodulation chez *A. evenia*. Une perte de fonction des gènes qui codent la leghémoglobine dans les nodules conduit à une senescence précoce du nodule chez *L. japonicus* (Wang *et al.*, 2019a). Par ailleurs, quelques DEGs symbiotiques ont été identifiés uniquement chez les CSSL. Parmi ces DEGs, on retrouve des gènes essentiellement impliqués dans la signalisation précoce [*MtCHS* (enzyme synthase) ou *MtCHR* (enzyme oxydoreductase)] et la formation du symbiosome [*MtTIP1g* (water chanels)] (Figures 50-53). *MtCHS* et *MtCHR* interviennent dans la production de flavonoïdes, qui sont des signaux moléculaires de la plante indispensables aux étapes précoces de la symbiose (Wasson *et al.*,

2006; Zhang *et al.*, 2009). *MtTIP1g* a été fortement sous-exprimé chez les lignées par rapport à Fleur11. Gavrin *et al.* (2014) ont montré que l'inhibition de l'expression de *MtTIP1g* empêche la formation du symbiosome et conduit à la formation de nodules Fix- chez *M. truncatula*.

En résumé, l'analyse comparative des transcriptomes de Fleur11 et des CSSL a montré, des différences importantes dans l'expression de nombreux DEGs impliqués dans l'immunité de la plante et la régulation de l'oxygène. Concernant les orthologues de gènes symbiotiques, nous avons observé une expression différentielle des gènes impliqués dans différentes étapes de la symbiose dont les plus représentées sont la signalisation précoce, l'organogénèse du nodule, l'infection, la formation du symbiosome et le fonctionnement du nodule. Ce qui indique une dérégulation considérable de la machinerie symbiotique chez les CSSL. Il est intéressant de signaler que les variations observées au niveau de l'expression des gènes chez les CSSL durant le processus symbiotique, s'accordent avec la réduction du nombre de nodules, la faible infection des cellules ou la formation de tissu nécrosé (réactions de défense) observées chez ces mêmes CSSL dans le chapitre 2.

IV.2. Analyse des DEGs dans les régions ciblées

Une introgression de chromosome sauvage localisée sur le GL A02 de la lignée 12CS_051, et le GL B02 de la lignée 12CS_044 a été associée à une diminution de la performance symbiotique par rapport à Fleur11. Le QTL sur les GLs A02 (environ 76 Mbp) et B02 (environ 82,5 Mbp) contient respectivement 1180 et 1095 gènes annotés dans le génome de l'arachide cultivée. L'analyse comparative de l'expression des gènes contenus dans la région du QTL, a montré des différences entre Fleur11 et les lignées. L'analyse fonctionnelle a révélé que ces DEGs étaient impliqués dans des fonctions liées à la SFA telles que l'immunité de la plante, la division cellulaire et la senescence des tissus à travers le transport et le stockage des ions Fer (Figures 54 et 55). Concernant les orthologues de gènes symbiotiques, 10 et 06 gènes ont été annotés dans la région ciblée respectivement sur le GL A02 et B02 (Tableau XVI). Ces gènes sont impliqués dans les étapes allant de l'organogénèse à la senescence du nodule dans le processus symbiotique.

Dans la région ciblée sur le GL A02, deux orthologues de gènes symbiotiques ont été identifiés parmi les DEGs de Fleur11 et 12CS_051. *Arahy.R43499/LjFEN1* a été surexprimé chez Fleur11 et régulé négativement chez 12CS_051. Il a été démontré que dans la symbiose légumineuse-*rhizobia*, la plante peut fournir au symbiote bactérien un cofacteur essentiel au fonctionnement de la nitrogénase à travers l'expression d'une homocitrate synthase (*FEN1*) (Hakoyama *et al.*, 2009; Nouwen *et al.*, 2017). Les mutants fen1 forment des nodules normaux, mais infectés par

des bactéries non différenciées et incapables de fixer l'azote (Fix-) chez *L. japonicus* (Hakoyama *et al.*, 2009). *Arahy.MAQ2UP/ MtFER3* est le second orthologue de gène symbiotique identifié parmi les DEGs dans le QTL sur le GL A02. Ce gène a été surexprimé uniquement chez la lignée 12CS_051 et faiblement induit chez Fleur11. Dhanushkodi *et al.* (2018) ont montré que l'inhibition de l'expression de *MtFER3* dans les nodules de *M. truncatula* est liée un mécanisme de senescence précoce de nodules et à la réduction de la croissance des plantes dans des conditions de stress hydrique. Ces résultats suggèrent que le gène *Arahy.MAQ2UP*/*MtFER3* ne serait pas à l'origine du phénotype observée chez la lignée 12CS_051.

Dans le QTL situé sur le GL B02, un orthologue de gène symbiotique a été identifié parmi les DEGs de Fleur11 et 12CS_044. *Arahy.Y8K7VT/LjFEN1* a été surexprimé chez les deux génotypes. Toutefois, l'expression de *Arahy.Y8K7VT* a été au moins 03 fois plus élevée chez Fleur11 (log2FoldChange = 14.2) par rapport à 12CS_044 (log2FoldChange = 4.15). Ces résultats pourraient expliquer la faible différentiation des bactéries en bactéroïdes observée dans les nodules de 12CS_044 (Planche 8k-o). Cependant, une diminution de l'expression de *Arahy.Y8K7VT* chez 12CS_044 ne permet pas d'expliquer la réduction de la taille du nodule et la faible colonisation des cellules par les bactéries.

L'analyse RNA-Seq a permis d'apprécier le profil d'expression des gènes compris dans les QTL ciblés. Le gène *Arahy.R43499* pourrait être un gène candidat pertinent permettant d'expliquer le phénotype de la lignée 12CS_051. En revanche, chez la lignée 12CS_044, l'analyse transcriptomique dans la région ciblée n'a pas permis l'identification d'un gène candidat qui serait responsable du phénotype de la lignée 12CS_044.

IV.3. Analyse de la cartographie fine de QTL

Pour faciliter l'identification de gènes candidats dans les QTL associés à la SFA sur les GLs A02 et B02, nous avons réalisé des croisements entre deux lignées (12CS_051 et 12CS_044) et la variété Fleur11, afin de développer des populations NIL. Dans le croisement 12CS_051 × Fleur11, très peu de plantes ayant recombinées dans la région ciblée sur le GL A02, ont été obtenues à la génération F_3 et aucune NIL n'a été développée (Figure 37). Plusieurs études ont montré qu'au sein des populations de ségrégation dérivées de croisements interspécifiques, la recombinaison peut être fortement supprimée ou réduite dans certaines introgressions sauvages chez la tomate (Chetelat *et al.*, 2000; Canady *et al.*, 2006; Tam *et al.*, 2011) et l'arachide cultivée (Nagy *et al.*, 2010; Chu *et al.*, 2016). Cette suppression de la recombinaison peut s'expliquer par une divergence entre les chromosomes homéologues de l'espèce sauvage et l'espèce

cultivée. Chez des espèces allopolyploïdes comme l'arachide cultivée, un évènement de recombinaison homéologue (échange entre le sous-génome A et le sous-génome B) pourrait également affecter l'appariement des chromosomes homologues, et réduire la fréquence des recombinaisons intraspécifiques dans la région. Des échanges de chromosomes homéologues ont déjà été rapportés chez l'arachide (Leal-Bertioli *et al.*, 2015; Nguepjop *et al.*, 2016). Nous pensons que, le faible taux de recombinaison obtenu dans la région ciblée sur le GLA02, pourrait être lié à un évènement de recombinaison homéologue. Toutefois, des études supplémentaires de génomique structurales seront nécessaires pour vérifier cette hypothèse. Dans le croisement 12CS_044 × Fleur11, nous avons obtenu 23 NIL présentant des recombinaisons intéressantes dans le QTL sur le GL B02 (Figures 37 et 57). L'interaction de ces NIL et de leurs parents avec la souche *B. vignae* ISRA400 a montré un effet génotype significatif sur les variations de la teneur en chlorophylle des feuilles. Cependant, aucune concordance a été observée entre les variations phénotypiques et les évènements de recombinaisons dans le QTL au sein de la population NIL (Figures 56 et 57). Ces résultats suggèrent que le (s) gène (s) responsable (s) ces variations phénotypiques ne se trouvent pas dans la région ciblée. Par conséquent, nous supposons que la lignée 12CS_044 aurait dans son génome au moins un fragment de chromosome sauvage surnuméraire qui n'a pas été détecté pendant le génotypage, et qui serait à l'origine de son phénotype Fix- de la lignée. Cette hypothèse est la plus plausible, car la lignée 12CS_044 est issue d'une population CSSL développée à l'aide de marqueurs SSR, ne couvrant qu'environ 88% de la carte génétique de l'arachide (Fonceka *et al.*, 2012b). Le re-génotypage de cette population CSSL à l'aide des marqueurs SNP à haute densité a montré que les SNP étaient moins polymorphes particulièrement sur le sous-génome B, ce qui pourrait causer la détection de moins d'introgressions sauvages (Gimode, 2019). L'utilisation de marqueurs SNP pour re-génotyper des populations CSSL qui avaient été développées à l'aide des marqueurs SSR, a révélé la présence de fragments surnuméraires chez le riz (Xu *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2015).

Si la position du QTL peut-être remise en cause, le phénotype de la CSSL 12CS_044 a bien été présent dans sa descendance. La distribution bimodale observée suggère la ségrégation d'un seul gène au sein de la population NIL. Une distribution bimodale de la résistance à la rouille blanche (*Albugo candida*) chez le chou champêtre (*Brassica rapa*) a été associée à une ségrégation monogénique (Kole *et al.*, 2002). Zhang *et al.* (2006) ont montré que les proportions mendéliennes attendues pour la ségrégation d'un seul gène, étaient liées à une distribution bimodale du nombre de grain de la panicule du riz (*Oryza sativa*) au sein d'une population 175 NIL F_2. Les comparaisons de moyennes d'une part entre les NIL, et d'autre part entre NIL et

leurs parents ont permis d'identifier 3 groupes phénotypiques de NIL : (i) un groupe de NIL similaires à Fleur11 « Fix+ » ; (ii) un deuxième groupe de NIL similaire à 12CS_044 « Fix- » ; (iii) et enfin un troisième groupe de NIL intermédiaires différentes des deux parents « Fix+Fix- » (Figure 56). En supposant que les différences de performance symbiotique observées dans cette étude entre Fleur11, la CSSL 12CS_044, et les NIL, soient causées par la ségrégation d'un gène « *Fix* », nous désignons par Fix+Fix+ et Fix-Fix-, les génotypes au locus du gène respectivement chez Fleur11 et la CSSL 12CS_044. Les proportions génotypiques mendéliennes attendues des individus $F_{3:4}$ phénotypés seraient de 3/8 Fix+Fix+, 2/8 Fix+Fix- et 3/8 Fix-Fix- (Annexe 5). La détection d'un groupe de NIL intermédiaires, et la variation du phénotype de certaines NIL entre les deux expérimentations au sein de la population NIL en F_4, pourraient s'expliquer par une hétérozygotie au gène des individus F_3. Étant donné que, le gène *Fix* ne se trouve pas dans la zone ciblée avec les marqueurs moléculaires, les allèles au locus de gène n'ont pas été fixés, et ségrégent dans la descendance.

Suivant les valeurs de la distribution bimodale, l'analyse du phénotype de l'ensemble des individus évalués a montré des proportions phénotypiques 59/98 (60.2 %) individus Fix+ et 39/98 (39.8%) individus Fix- dans la première expérimentation. Dans la seconde expérimentation, nous avons observé les proportions phénotypiques 53/87 (60.9%) individus Fix+ et 34/87 (39.1%) individus Fix-. S'il y a dominance au gène *Fix* de l'allèle cultivé sur l'allèle sauvage, les génotypes hétérozygotes Fix+Fix- au locus du gène auront un phénotype Fix+. Tandis que, les génotypes homozygotes au gène Fix+Fix+ et Fix-Fix- auront respectivement les phénotypes Fix+ et Fix-. Les proportions phénotypiques attendues suivant la ségrégation mendélienne seront de 3/8 + 2/8 (62.5%) individus Fix+ et 3/8 (37.5%) individus Fix- (Annexe 5). Le test de Khi carré (X^2) a montré que au sein de 5%, il n'y a pas de différences entre les proportions phénotypiques attendues et observées i.e., $X^2_{calculé} < X^2_{lu}$ (Annexe 6). Par conséquent, la variation phénotypique entre Fleur11 et la lignée 12CS_044 serait causée par un seul gène, dont l'allèle cultivé présent chez Fleur11 est dominant, et l'allèle sauvage porté par la lignée 12CS_044 est récessif. Le groupe de NIL intermédiaires Fix+Fix- serait en réalité constitué d'un mélange d'individus ayant le phénotype de Fleur11 ou celui de 12CS_044.

V. Conclusion

L'analyse RNA-Seq et la cartographie fine de QTL sont des techniques utilisées dans le domaine de la recherche pour la compréhension des bases moléculaires des caractères d'intérêts. Dans ce chapitre nous avons combiné ces deux techniques afin d'étudier le

mécanisme génétique de la SFA chez l'arachide cultivée. L'analyse comparative des transcriptomes globaux entre un génotype efficace dans la SFA (Fleur11) et deux génotypes inefficaces dans SFA (CSSL12CS_051 et 12CS_044) a mis en évidence des différences importantes dans l'expression de nombreux gènes impliqués dans le système de défense de la plante et le transport de l'oxygène. Le gène *Arahy.R43499* qui est un orthologue du gène symbiotique *LjFEN1*, a été détecté parmi les gènes différentiellement exprimé dans la région du QTL sur le GL A02 entre Fleur11 et 12CS_051. Ce gène code un homocitrate essentiel au fonctionnement de la nitrogénase, et serait un gène candidat prometteur permettant d'expliquer les variations phénotypiques observées chez la lignée 12CS_051. Par ailleurs, le développement et le phénotypage de population NIL n'ont pas permis d'affiner la taille des QTL ciblés. Cependant, les variations phénotypiques obtenues au sein des NIL ont montré qu'un seul gène serait responsable de la différence de performance symbiotique entre Fleur11 et 12CS_044. Ces résultats fournissent des informations utiles à la compréhension des bases moléculaires de la SFA chez l'arachide cultivée. Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour affiner la taille du QTL et valider le gène candidat identifié.

CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit de thèse visent à exploiter la variabilité génétique d'une population de croisements interspécifiques pour décrypter les bases génétiques et moléculaires de la symbiose fixatrice d'azote (SFA) chez l'arachide cultivée, et utiliser ses connaissances dans les programmes de sélection. Ce chapitre fait une synthèse et une analyse globale des principaux résultats obtenus.

I. Identification des QTL associés aux caractères de SFA et contribution des allèles sauvages

Les populations de croisements interspécifiques ont été largement utilisées en amélioration variétale chez l'arachide, pour l'identification de QTL et d'allèles sauvages qui ont des effets favorables pour de nombreux caractères d'intérêt agronomique tels que la résistance aux maladies, l'amélioration des composantes du rendement et de la qualité nutritionnelle des graines ou encore la tolérance à la sècheresse (Fonceka *et al.*, 2012a; Burow *et al.*, 2014b; Khera *et al.*, 2019; Tossim *et al.*, 2020; Alyr *et al.*, 2020; Gimode *et al.*, 2023). Cependant, aucune étude à notre connaissance n'a exploité les populations de croisements interspécifiques pour identifier les QTL associés aux caractères de SFA et pour évaluer la contribution des allèles d'origine sauvage pour l'amélioration de la performance symbiotique de l'arachide cultivée. Dans les chapitres 2 et 3 de cette thèse nous avons évalué la variabilité des caractères liés à la SFA au sein d'une population de 83 lignées de substitutions de segments chromosomiques (CSSL) dont le génotype est connu (Fonceka *et al.*, 2012b), dérivée du croisement entre la variété cultivée Fleur11 et le tétraploïde synthétique AiAd, qui combine les génomes des espèces sauvages (*Arachis duranensis* et *Arachis ipaensis*) à l'origine de l'arachide cultivée. L'évaluation en conditions semi-contrôlées de la population CSSL en conditions sans azote (-N), avec azote (+N), et sans azote + *Bradyrhizobium vignae* ISRA400 (-N+ISRA400), a permis d'identifier des variations phénotypiques spécifiques au traitement -N+ISRA400 dans deux expérimentations indépendantes, et de cartographier 37 QTL associés à la teneur en chlorophylle des feuilles et la biomasse totale. Parmi ces QTL identifiés, 04 QTL majeurs ont été systématiquement détectés dans les deux expérimentations. La population CSSL a été également évaluée durant 3 années successives sur des parcelles paysannes très peu fertilisées et carencées en nutriments (particulièrement l'azote et le phosphore). L'association des données phénotypiques et génotypiques a permis l'identification de 09 QTL associés aux caractères de SFA (teneur en azote total et pourcentage en azote fixé des fanes), et 31 QTL associés aux composantes du rendement (poids de gousses et poids de fanes). Cependant, parmi les QTL liés à la SFA en champ, aucun n'a été détecté dans plus d'un environnement. En outre, aucun QTL

de SFA identifié en conditions semi-contrôlées, n'a été détecté en champ. La SFA est un caractère polygénique, fortement dépendant des conditions environnementales et dont la quantification est fastidieuse en conditions naturelles (Arrendell *et al.*, 1988; Dwivedi *et al.*, 2005, 2015; Santos *et al.*, 2013; Batstone *et al.*, 2020). Ce qui pourrait en partie justifier les difficultés, qu'ont les sélectionneurs à cibler ce caractère dans les programmes de sélection variétale. Parmi les QTL associés aux composantes du rendement, 04 QTL ont été détectés dans au moins deux des trois environnements en milieu paysan. Sachant qu'au sein de la même population CSSL, ces QTL n'avaient pas été détectés dans plusieurs environnements sur des parcelles fertilisées (Tossim, 2014), nous déduisons que ces QTL pourraient être spécifiques aux conditions de faible fertilité du sol. En outre, 03 QTL parmi les 04 QTL stables associés aux composantes du rendement avaient précédemment été associés aux caractères de SFA (teneur en chlorophylle des feuilles et biomasse totale) en conditions semi-contrôlées. Ce qui suggère que la performance agronomique, serait liée à la capacité à fixer l'azote dans les conditions de faible fertilité en milieu paysan. Cependant, les faibles corrélations observées avec les caractères de SFA évalués en conditions naturelles, n'ont pas permis d'établir une relation directe entre ces variations agronomiques à l'efficacité symbiotique. Pour expliquer ce résultat nous avons émis deux hypothèses. La première hypothèse suggère que les génotypes les plus performants dans la SFA ne seraient pas les plus productifs en termes de gousses. de Freitas *et al.* (2012) ont rapporté que les performances agronomiques de 07 génotypes de niébé n'étaient pas liées à leurs capacités à fixer l'azote atmosphérique dans les conditions de faible fertilité du sol. La seconde hypothèse suppose, que l'azote ne soit pas le facteur le plus limitant pour le rendement de l'arachide dans les conditions de faible fertilité des champs paysans utilisées dans cette étude. Une étude de fertilité des sols et de nutrition minérale des plantes dans les parcelles paysannes de Diohine a été menée dans le cadre du projet ORACLE. Elle a révélé que l'apport d'engrais phosphaté ou de fumier riche en phosphate entraîne une augmentation considérable des composantes du rendement de l'arachide cultivée, tandis que des effets contre-productifs ont été observés avec des engrais avec peu de phosphate et beaucoup d'azote (Cathy Clermont *et al.*, communication personnelle). Ces résultats indiquent que dans les sols appauvris de Diohine, le phosphore serait le nutriment le plus limitant. La SFA est un processus biologique, très couteux en énergie, qui nécessite 16 moles d'ATP pour convertir une mole de N_2, en azote assimilable par la plante (Udvardi & Poole, 2013). Une carence en phosphore affecte la croissance et les composantes du rendement chez l'arachide et le haricot commun (Olivera *et al.*, 2004; Yakubu *et al.*, 2010; Asante *et al.*, 2020).

Il est communément admis qu'à l'inverse des espèces sauvages qui sont répandues dans les environnements naturels, les espèces cultivées sont plus adaptées aux systèmes agricoles avec un apport élevé en fertilisants, réduisant ainsi leur dépendance à la SFA (Pérez-Jaramillo *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020). Des études ont montré que, les bénéfices nets issus de la SFA sont plus élevés chez les espèces sauvages et les variétés traditionnelles par rapport aux variétés modernes chez plusieurs légumineuses (Provorov & Tikhonovich, 2003; Kiers *et al.*, 2007; Porter & Sachs, 2020). Il serait donc envisageable d'utiliser les espèces sauvages pour restaurer ou optimiser le potentiel symbiotique des espèces cultivées de légumineuses. Globalement, les allèles sauvages aux QTL identifiés durant cette étude ont causé des effets négatifs considérables sur les performances symbiotiques et les composantes du rendement en conditions de faible fertilité. Ces effets négatifs se traduisent par une faible croissance des CSSL en comparaison à la variété Fleur11 en l'absence de fertilisant. Ce qui pourrait être la conséquence d'une incompatibilité entre les CSSL et les *rhizobia* natifs des sols du Sénégal. Ces résultats suggèrent que les processus d'adaptation et de sélection variétale auraient eu des impacts positifs sur la SFA de l'arachide cultivée au Sénégal. En revanche, des impacts négatifs de la domestication et de la sélection variétale sur la SFA ont été rapportés chez d'autres légumineuses cultivées telles que le soja, le pois, le pois chiche et la fève (Mutch & Young, 2004; Kiers *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2019). Chez le niébé, aucune altération de la SFA n'a été observée entre les génotypes sauvages et les variétés traditionnelles cultivées en Afrique (Ortiz-Barbosa *et al.*, 2022). La domestication et les évènements de sélection qui lui ont succédé semblent avoir eu des impacts différents sur le potentiel symbiotique des légumineuses cultivées. L'interaction légumineuse-*rhizobia* est la résultante d'un processus de co-adaptation ou de co-évolution entre les deux partenaires durant les processus de domestication et de sélection variétale, sous l'influence des pratiques agricoles et des facteurs environnementaux (Weese *et al.*, 2015; Regus *et al.*, 2017b). Nous pensons que l'incompatibilité symbiotique observée entre les CSSL et les *rhizobia* du Sénégal, pourrait être la conséquence d'une absence de co-adaptation entre les deux symbiotes, sachant que les espèces sauvages qui ont été utilisées dans le développement de la population CSSL sont originaires d'Amérique du Sud. Cette hypothèse est confortée par des études antérieures, qui ont montré que l'arachide cultivée au Sénégal nodulent et fixent efficacement l'azote atmosphérique avec les *rhizobia* natifs très proches des souches de *Bradyrhizobium* sp. isolés dans les nodules de légumineuses autochtones du Sénégal comme le niébé ou *Faidherbia albida* (Krasova-Wade *et al.*, 2003; Zaiya *et al.*, 2018). Ce qui suggère que l'arachide cultivée au Sénégal se serait adaptée à sa nouvelle aire géographique, en acquérant la capacité à noduler

avec de nouveaux symbiotes bactériens. Des travaux préliminaires réalisés au sein de l'équipe BALI/UMR PHIM, ont montré qu'en conditions contrôlées les espèces sauvages *A. duranensis* et *A. ipaensis*, étaient incapables de former des nodules fixateurs avec la souche *B. vignae* ISRA400 (Svistoonoff *et al.* communication personnelle). Ainsi, on pourrait supposer que les QTL de SFA identifiés au sein de cette population CSSL, seraient des QTL d'incompatibilité symbiotique avec la souche *B. vignae* ISRA400.

II. Comment quantifier la SFA en conditions naturelles ?

À l'instar des autres caractères d'intérêt qui affectent la partie souterraine de la plante, la SFA n'a pas été spécifiquement ciblée durant l'amélioration variétale des légumineuses cultivées (Pérez-Jaramillo *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020; Porter & Sachs, 2020). En outre, les difficultés liées à sa quantification en conditions naturelles constituent un frein pour les sélectionneurs (Santos *et al.*, 2013). Dans cette étude, nous avons mesuré l'abondance en azote isotopique ^{15}N ($\delta^{15}N$) des fanes à la récolte afin de quantifier le pourcentage d'azote fixé (%Ndfa) durant le cycle de développement. Nos résultats ont montré que, le %Ndfa au sein de la population CSSL variait entre 35 et 75%. Toutefois, des faibles corrélations ont été observées entre le %Ndfa et la teneur en azote total (TN) des fanes. Ces résultats pourraient s'expliquer par un biais dans la quantification du $\delta^{15}N$, qui serait liée d'une part à l'hétérogénéité de la poudre des fanes après le broyage. La qualité du broyage peut être une source importante d'erreurs dans la quantification du $\delta^{15}N$ (Peoples *et al.*, 2009b). Et d'autre part, à des faibles teneurs en azote des fanes à la récolte, dues à une remobilisation importante de l'azote des feuilles et des tiges vers les graines. Cette hypothèse pourrait également expliquer les faibles relations observées entre le %Ndfa, la TN et les composantes du rendement. De nombreuses études ont montré qu'en fonction des légumineuses 30 à 100% de l'azote contenu dans les graines proviendraient de la remobilisation de l'azote stocké dans ses parties végétatives durant le cycle de développement (Zeiher *et al.*, 1982; Peoples *et al.*, 1983; Ramaekers *et al.*, 2013; Pampana *et al.*, 2016). Nous pensons qu'une remobilisation de l'azote a abouti à une TN des fanes à la récolte relativement faible, et cette teneur pourrait être insuffisante pour une mesure précise du $\delta^{15}N$ (bruit de mesure) à partir de petites quantités d'aliquotes, ce qui rendrait alors impossible la discrimination efficace des génotypes selon leur capacité à fixer l'azote atmosphérique. Cette hypothèse a été confortée par des résultats récents réalisés en laboratoire, qui ont montré que l'augmentation de la quantité de poudre à prélever pour l'aliquote permet de stabiliser les valeurs de $\delta^{15}N$. Quel serait le meilleur indicateur de la SFA en champ ? Des recherches

réalisées sur le haricot commun et le soja ont recommandé d'utiliser le %Ndfa et/ou la TN des graines à la récolte pour discriminer les génotypes sur la base de leur potentiel symbiotique et faciliter l'intégration de la SFA dans les programmes de sélection (Ramaekers *et al.*, 2013; Kamfwa *et al.*, 2015, 2019; Polania *et al.*, 2016; Barbosa *et al.*, 2018; Liyanage *et al.*, 2023). Le %Ndfa des fanes, avant le remplissage des gousses, peut également être considéré comme un indicateur pertinent du potentiel symbiotique d'un génotype (Wivstad *et al.*, 1987).

III. Les fragments de chromosomes sauvages affectent la compatibilité de l'arachide cultivée avec les *rhizobia*

La compatibilité légumineuse-*rhizobia* est l'élément déterminant dans l'établissement et le fonctionnement de la symbiose entre les deux partenaires (Wang *et al.*, 2012). Dans le chapitre 4 de cette thèse, nous avons mis en évidence une incompatibilité de fixation d'azote ou incompatibilité tardive entre certaines CSSL et des *Bradyrhizobium* natifs du Sénégal. Cette incompatibilité se traduisait par une diminution de l'activité de la nitrogénase, du nombre et/ou du poids de nodules, et une altération de la survie des bactéries à l'intérieur des nodules. Ces résultats pourraient expliquer la faible croissance des CSSL (12CS_004, 12CS_044 et 12CS_051) observée sur des parcelles paysannes du bassin arachidier, qui sont carencées en azote. Par ailleurs, l'inoculation avec les *Bradyrhizobium* isolés des sols d'Argentine (dans la zone de provenance de l'arachide cultivée) a montré que ces lignées établissaient une symbiose beaucoup plus efficace, à travers une augmentation considérable du nombre de nodules et de la teneur en chlorophylle des feuilles (Svistoonoff *et al.* communication personnelle) (Annexe 7). La variété cultivée Fleur11, quant-à-elle, formait des nodules efficaces aussi bien avec les souches natives d'Argentine et du Sénégal (Svistoonoff *et al.* communication personnelle) (Annexe 7), suggérant ainsi que dans l'interaction symbiotique avec les *rhizobia*, la variété Fleur11 serait moins spécifique que les CSSL. Au regard de ces résultats préliminaires, nous pouvons suggérer que l'introduction de l'arachide cultivée au Sénégal aurait conduit à la sélection de variétés à haute promiscuité.

La promiscuité de l'arachide cultivée par rapport à celles des CSSL pourrait être liée à une réponse immunitaire de la plante, déclenchée par des effecteurs bactériens reconnus par les CSSL porteuses de certains allèles sauvages aux QTL. Ces effecteurs qui sont sécrétés par le système de sécrétion de type III (T3SS), pourraient être impliqués dans l'incompatibilité symbiotique observée entre les CSSL et les *rhizobia* du Sénégal. Plusieurs études ont montré que la compatibilité légumineuse-*rhizobia* peut être modulée par des effecteurs du T3SS (Okazaki *et al.*, 2013, 2016; Teulet *et al.*, 2019; Songwattana *et al.*, 2021; Ratu *et al.*, 2023).

Ces effecteurs peuvent en fonction de la plante hôte, bloquer ou favoriser le processus de nodulation en interagissant avec le mécanisme de défense de la plante. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai participé au cours de cette thèse, à l'extraction de l'ADN génomique et au séquençage du génome complet de 13 *rhizobia* (11 souches du Sénégal et 02 d'Argentine) en collaboration avec le Pr Louis Tisa (Université du New Hampshire, USA) et Dr Fernando Ibañez (Université de Rio Cuarto, Argentine). Les résultats de l'analyse comparative des génomes des *rhizobia* utilisés dans cette étude, ont révélé que certains effecteurs (NopT, NopM et NopAJ) présents chez les souches du Sénégal, sont absents chez les souches d'Argentine (Ibanez et al., communication personnelle). Les allèles sauvages présents aux QTL de SFA chez les CSSL auraient, par exemple, pu restaurer la fonction de reconnaissance de ces effecteurs et entraîné des réactions de défense de la plante, que nous avons observées tant au niveau cytologique, que transcriptionnel, perturbant ainsi le processus de nodulation. Très peu d'informations sont disponibles sur le rôle des effecteurs du T3SS dans l'établissement de la SFA chez l'arachide cultivée.

IV. Les fragments de chromosomes sauvages affectent l'expression des gènes durant le processus de nodulation chez l'arachide cultivée

Le chapitre 5 de cette thèse a été consacré d'une part à une analyse RNA-Seq pour étudier le profil d'expression des gènes durant le processus de nodulation chez la variété cultivée Fleur11 et deux CSSL (12CS_051 et 12CS_044), respectivement compatible et incompatibles dans l'interaction symbiotique avec les *Bradyrhizobium* efficaces du Sénégal, et d'autre part, à la cartographie fine du QTL (fragment de chromosome sauvage) responsable des variations phénotypiques observées chez chaque CSSL par rapport à Fleur11. L'analyse comparative des profils transcriptomiques de Fleur11 et des CSSL a révélé une expression différentielle de nombreux gènes impliqués dans des voies métaboliques associées à la nodulation telles que les mécanismes de défense et la régulation de l'oxygène. L'immunité de la plante est un facteur clé dans l'établissement et le maintien de l'interaction légumineuse-*rhizobia* (Gourion *et al.*, 2015; Gully *et al.*, 2018; Karmakar *et al.*, 2018; Vlk *et al.*, 2022). La surexpression de plusieurs gènes impliqués dans les mécanismes de défense chez les CSSL, peut être associée à une réaction d'hypersensibilité de plante, qui ne reconnaît pas la bactérie comme un symbiote compatible. Ces résultats sont en accord avec les observations cytologiques des nodules de ces lignées dans les chapitres 2, 4 et 5, où la forte réduction de la viabilité des bactéries/bactéroïdes dans les nodules et/ou l'apparition de tissus nécrosés dans les nodules, s'apparentait à un mécanisme de senescence précoce du nodule (sanctions des nodules peu ou pas fixateurs). Par ailleurs,

l'expression différentielle des gènes impliqués dans la régulation de l'oxygène (transport de l'oxygène et réponse au stress oxydatif) est un indicateur pertinent de la formation de nodules fixateurs chez Fleur11 et de nodules peu ou pas fixateurs chez les CSSL. Une analyse réalisée sur les orthologues de gènes symbiotiques connus a révélé que, les gènes différemment régulés entre Fleur11 et les CSSL interviennent principalement dans la signalisation précoce, l'organogénèse du nodule, l'infection, la formation du symbiosome et le fonctionnement du nodule. Ce qui indique que les fragments de chromosomes sauvages présents chez les CSSL, affectent considérablement toutes les étapes du processus de nodulation. Dans le chapitre 2 de cette thèse, l'association des données génotypiques et phénotypiques a montré que, l'incompatibilité symbiotique des lignées 12CS_051 et 12CS_044 était associée à des QTL localisés sur les groupes de liaison (GL) homéologues A02 et B02. L'analyse de l'expression des gènes contenus dans la région du QTL ciblé sur le GL A02 de la lignée 12CS_051, a permis d'identifier un gène candidat prometteur. Il s'agit du gène *Arahy.R43499/LjFEN1* qui joue un rôle important dans le fonctionnement du nodule, en codant pour un homocitrate synthase, qui est indispensable à la synthèse du cofacteur Fe-Mo de la nitrogénase (Hakoyama *et al.*, 2009; Nouwen *et al.*, 2017). La répression de l'expression de ce gène chez la lignée 12CS_051 pourrait altérer le fonctionnement de la nitrogénase et conduire à la formation de nodules peu fixateurs. Le rôle de *LjFEN1* dans le processus de nodulation chez l'arachide n'a pas encore élucidé. Nous pensons que les faibles quantités d'azote fixé par les nodules pourraient conduire à l'activation d'un mécanisme de sanctions par la plante, comme observé dans les chapitres 2 et 4. Concernant le QTL ciblé sur le GL B02 de la lignée 12CS_044, l'analyse RNA-Seq n'a pas permis de mettre en évidence un potentiel gène candidat, parmi les orthologues de gènes symbiotiques. Ce qui indique que le gène responsable du phénotype de la lignée pourrait ne pas se trouver dans la région ciblée.

La cartographie fine de QTL est l'une des approches les plus employées en génétique des plantes pour préciser la position d'un QTL et identifier le gène responsable de la variation d'un caractère (Jaganathan *et al.*, 2020). Elle repose sur la fréquence des recombinaisons et la densité des marqueurs dans la région du QTL au sein de la descendance d'un croisement. Dans notre étude, nous avons densifié les régions ciblées sur le GL A02 (environ 76 Mbp) de la lignée 12CS_051 et le GL B02 (environ 82,5 Mbp) de la lignée 12CS_044 avec des marqueurs SNP, et réalisé un croisement entre chaque lignée et la variété Fleur11, afin de développer des lignées quasi-isogéniques (NIL). Dans le croisement avec la lignée 12CS_051, aucune NIL a été obtenue. Ce résultat pourrait s'expliquer par un évènement de recombinaison homéologue dans la région ciblée, qui affecterait l'appariement des chromosomes homologues durant la méiose.

Des études récentes ont rapporté que des évènements de recombinaison homéologue peuvent survenir à des fréquences très variables sur les GLs 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 de l'arachide cultivée (Leal-Bertioli *et al.*, 2015; Nguepjop *et al.*, 2016). Toutefois, des analyses supplémentaires de génomique structurale sont nécessaires pour conforter cette hypothèse. Dans le croisement avec la lignée 12CS_044, nous avons obtenu 23 NIL présentant des recombinaisons homologues intéressantes dans la région ciblée sur le GL B02. L'association des données génotypiques et phénotypiques obtenues à l'issue de deux expérimentations d'évaluation de la performance symbiotique des NIL, n'a pas permis de valider la position du QTL sur le GL B02. Ce qui suggère que, le gène responsable du phénotype de la lignée 12CS_044 se trouverait dans un fragment de chromosome supplémentaire non détecté par le génotypage. Lorsque le gène responsable de la variation du caractère se trouve dans le QTL ciblé, les NIL constituent un matériel de choix pour préciser la position du QTL. Par exemple, l'utilisation d'une population NIL a permis de réduire la taille d'un QTL (de 5,2 Mb à 168,37 kb) contrôlant la taille de la graine et de la gousse chez l'arachide et faciliter l'identification de 03 gènes candidats prometteurs sur le GL A07 (Alyr *et al.*, 2020). De même, les NIL ont permis d'affiner la taille des QTL (de 28-47 cM à 6.9 -15.1 cM) impliqués dans la résistance au mildiou sur les chromosomes 4, 5 et 11 de la tomate (Brouwer & St Clair, 2004). En revanche, lorsque le gène ne se trouve pas dans la région ciblée, les NIL permettent également de corriger la position du QTL. C'est par exemple, le cas de certains QTL associés à l'architecture racinaire chez le riz à partir d'une population de lignées recombinées (RIL) et dont la position n'a pas été validée à travers le développement des NIL dans la région des QTL identifiés (Shen *et al.*, 2001).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse s'inscrivent dans le cadre de la compréhension des mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans la symbiose fixatrice d'azote (SFA) chez l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea*), à travers l'utilisation d'une population de 83 lignées substitutions de segments chromosomiques (CSSL). La population CSSL utilisée est issue du croisement entre la variété cultivée Fleur11 et un tétraploïde synthétique AiAd (*Arachis ipaensis* × *Arachis duranensis*)$^{4\times}$, qui combine les génomes des ancêtres les plus probables de l'arachide cultivée. Dans un premier temps, des régions génomiques/QTL (quantitative trait loci) associées aux caractères de SFA ont été identifiées, et la contribution des allèles sauvages dans l'amélioration du potentiel symbiotique de l'arachide cultivée a été évaluée. Dans un second temps, les effets des QTL identifiés sur la spécificité symbiotique des génotypes correspondants ont été décrits. Enfin, l'analyse RNA-Seq et la cartographie fine de QTL ont été utilisées afin d'identifier des gènes candidats responsables des variations phénotypiques observées. L'évaluation en conditions semi-contrôlées de la performance symbiotique de la population CSSL et de leur parent récurrent la variété Fleur11 inoculées avec le symbiote bactérien efficace *Bradyrhizobium vignae* ISRA400 natif des sols du Sénégal, a permis d'identifier 04 QTL stables associés à la SFA sur les groupes de liaison (GL) A02, A03, A08, et B02. Les allèles sauvages à tous les QTL identifiés ont entraîné une diminution considérable de la performance symbiotique des CSSL correspondantes, suggérant un potentiel effet positif du processus de domestication et de la sélection variétale sur la SFA de l'arachide cultivée. En outre, 03 QTL parmi les 04 QTL identifiés ont également été associés à une forte diminution des performances agronomiques en l'absence de fertilisation azotée dans les parcelles paysannes. L'étude de l'effet des QTL identifiés sur la spécificité symbiotique avec une diversité de *Bradyrhizobium* sp. natifs des sols du Sénégal, a révélé une incompatibilité tardive ou de fixation d'azote entre les CSSL et les souches bactériennes efficaces. Ce qui a permis de postuler que la SFA serait la résultante d'une co-adaptation/co-évolution entre les deux partenaires. Cette hypothèse a été confortée par une étude préliminaire, qui a montré que ces CSSL formaient une symbiose efficace avec des *Bradyrhizobium* sp. natifs des sols d'Argentine, et isolés dans l'aire géographique de provenance de l'arachide cultivée. Au niveau moléculaire, l'analyse comparative des transcriptomes de la variété Fleur11 et des CSSL 12CS_051 et 12CS_044 (qui portent des allèles sauvages aux QTL respectivement sur les GLs A02 et B02) a montré des différences importantes dans l'expression de nombreux gènes impliqués principalement dans l'immunité de la plante et le transport de l'oxygène. L'analyse de l'expression des gènes contenus dans le QTL ciblé sur le GL A02 a permis d'identifier un

gène candidat prometteur. Il s'agit du gène *Arahy.R43499/LjFEN1*, qui intervient dans le fonctionnement du nodule, en codant une homocitrate synthase essentielle à l'activité de la nitrogénase des bactéroïdes. En revanche, l'analyse de l'expression des gènes contenus dans le QTL ciblé sur le GL B02 n'a pas permis l'identification d'un gène candidat. De plus, le développement et l'évaluation de 23 lignées quasi-isogéniques (NIL) dans la région du QTL ont révélé que le gène responsable du phénotype de la lignée 12CS_044, ne se trouverait pas dans le fragment de chromosome sauvage situé sur le GL B02. Ce qui indique, que la lignée 12CS_044 possèderait un autre fragment de chromosome sauvage dans son génome qui n'a pas été détecté par le génotypage. Les résultats obtenus dans ce travail de thèse apportent de nouvelles informations utiles aux sélectionneurs, pour l'orientation du développement de nouvelles variétés, en éliminant aux QTL liés à la SFA, les allèles d'origine sauvage défavorables. Ils contribuent également à la compréhension des mécanismes génétiques impliqués dans le processus de nodulation chez l'arachide.

LIMITES DE L'ÉTUDE ET PERSPECTIVES

Au cours cette thèse de nombreux résultats intéressants ont été obtenus. Toutefois, il convient de signaler quelques limites inhérentes à nos choix méthodologiques, et de dégager quelques axes de réflexion pour les études ultérieures. Nous avons cartographié des QTL associés à la symbiose fixatrice d'azote (SFA) chez l'arachide cultivée au Sénégal, et observé que les allèles sauvages aux QTL réduisaient l'efficacité symbiotique des CSSL correspondantes. Ce qui a permis de suggérer que les accessions des espèces sauvages (*A. ipaensis* et *A. duranensis)* utilisées dans le développement de cette population CSSL, ne constituent pas des réservoirs d'allèles favorables pour améliorer la SFA de l'arachide cultivée au Sénégal. Cependant, pour étayer cette hypothèse, il est nécessaire de conduire des études similaires avec d'autres populations de croisements interspécifiques, développées à partir d'autres accessions ou espèces sauvages d'arachide. À notre connaissance, très peu d'informations sont disponibles sur le potentiel symbiotique des espèces sauvages et des tétraploïdes synthétiques sauvages régulièrement utilisés dans le développement des différentes populations de croisements. Le projet Div-n-Fix en cours de réalisation au sein de nos équipes de recherches, s'intéresse à l'efficacité symbiotique de différentes accessions d'espèces sauvages, ainsi que à la diversité des *rhizobia* qu'elles recrutent dans les sols du Sénégal et d'Argentine. Ces informations pourraient être très utiles dans l'orientation du choix du meilleur parent, pour améliorer la SFA de l'arachide. Par ailleurs, la quantification de la SFA en champ constitue un frein important à la sélection de ce caractère. Pour contourner cette contrainte, il serait intéressant d'étudier au

préalable la répartition de l'azote fixé dans les différents organes de la plante d'arachide durant son cycle de croissance.

Bien que, la population CSSL utilisée dans cette étude nous a permis d'identifier des QTL associés à la SFA, la taille du QTL (plusieurs dizaines de Mbp), complique l'identification du gène responsable de la variation du caractère. La faible résolution génomique est reconnue comme étant une limite à l'utilisation des populations biparentales (Xu *et al.*, 2017). De plus, seule la diversité génique présente chez les parents est analysée au sein de la population. Une approche alternative serait une cartographie de QTL à partir d'une collection d'accessions en utilisant une approche d'étude d'association à l'échelle du génome (GWAS : Genome Wide Association Study). Elle a l'avantage de fournir une meilleure résolution génomique (Xu *et al.*, 2017). En outre, elle constitue un outil de choix pour capturer la variabilité naturelle d'un caractère donné (Xu *et al.*, 2017). Un projet de thèse en cours au sein de nos équipes exploite l'approche GWAS pour cartographier les QTL de SFA au sein d'une collection de 300 accessions africaines.

Nous avons également mis en évidence une incompatibilité de fixation entre les CSSL et des *Bradyrhizobium* du Sénégal, mais les mécanismes génétiques impliqués n'ont pas encore été identifiés. La symbiose efficace des CSSL avec les *Bradyrhizobium* d'Argentine, suggère que des effecteurs sécrétés par le système de sécrétion de type III (T3SS) absents chez ces bactéries et présents chez les *rhizobia* du Sénégal pourraient être impliqués dans la spécificité symbiotique plus restreinte des CSSL en comparaison à Fleur11. Pour tester cette hypothèse, nous proposons de cibler ces effecteurs, et de générer des mutants « perte de fonction » et « gain de fonction » avec les souches du Sénégal et d'Argentine, et de tester l'incidence de ces mutations sur le phénotype des CSSL. Il peut aussi être intéressant d'inoculer les CSSL et Fleur11 avec un mélange de *Bradyrhizobium*, afin d'évaluer l'impact des QTL sur le choix du partenaire symbiotique. En outre, l'isolement et la caractérisation des *rhizobia* isolés des nodules de Fleur11 et des CSSL évaluées en champ paysan, pourrait apporter une première partie de la réponse.

Les observations cytologiques combinées à l'Analyse RNA-Seq indiquent que l'incompatibilité symbiotique observée serait une incompatibilité tardive. Cependant, nous ne disposons pas d'informations claires sur les étapes précoces du processus de nodulation chez ces CSSL. Pour ce faire, nous suggérons d'une part de réaliser une analyse séquentielle (0 dpi, 4 dpi, 8 dpi, 12dpi et 21 dpi) de l'expression des gènes durant la symbiose. Des échantillons d'ARN prélevés à 12 dpi sont en cours de séquençage. D'autre part, nous proposons de décrire le processus d'infection et d'organogénèse du nodule chez Fleur11 et les CSSL, en utilisant une souche

ISRA400 marquée (fluorescente). Enfin, l'analyse RNA-Seq et la cartographie fine du QTL identifié sur le GL B02 n'ont pas permis de valider la position du QTL, ce qui suggère que la couverture génomique au sein de la population n'est pas optimale. Par conséquent, il est indispensable de densifier le génome avec de nouveaux marqueurs moléculaires (microsatellites ou SNP) afin de rechercher d'éventuels fragments de chromosomes sauvages surnuméraires.

En supposant que, la cartographie de QTL associés aux caractères de la SFA permette d'améliorer l'efficacité symbiotique de l'arachide cultivée au Sénégal, et d'intégrer spécifiquement la SFA dans les programmes de sélection variétale, il serait intéressant d'évaluer l'apport de ces variétés à fort potentiel symbiotique à l'échelle de l'agrosystème paysan. Il s'agirait d'apprécier les impacts (i) sur la fertilité du sol à travers les systèmes de la rotation culturales (mil et sorgho), (ii) sur l'alimentation du bétail, (iii) et enfin sur les revenus des paysans, i.e., économie d'achat d'engrais inorganiques et les rentes issues de la vente des graines ou des fanes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams, M.A., Buchmann, N., Sprent, J., Buckley, T.N., Turnbull, T.L., 2018. Crops, Nitrogen, Water: Are Legumes Friend, Foe, or Misunderstood Ally? Trends in Plant Science 23, 539–550. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.02.009

Adhikari, K., Bhandari, S., Acharya, S., 2021. An Overview of Azolla in Rice Production: A Review. Reviews in Food and Agriculture (RFNA) 2, 4–8.

Aguilar, O.M., Collavino, M.M., Mancini, U., 2022. Nodulation competitiveness and diversification of symbiosis genes in common beans from the American centers of domestication. Sci Rep 12, 4591. https://doi.org/10.1038/s41598-022-08720-0

Aguilar, O.M., Riva, O., Peltzer, E., 2004. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. PNAS 101, 13548–13553. https://doi.org/10.1073/pnas.0405321101

Allen, O.N., Allen, E.K., 1940. Response of the Peanut Plant to Inoculation with *Rhizobia*, with Special Reference to Morphological Development of the Nodules. Botanical Gazette 102, 121–142. https://doi.org/10.1086/334940

Alwi, N., Wynne, J.C., Rawlings, J.O., Schneeweis, T.J., Elkan, G.H., 1989. Symbiotic Relationship between *Bradyrhizobium* Strains and Peanut. Crop Science 29, cropsci1989.0011183X002900010011x.https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900010011x

Alyr, M.H., Pallu, J., Sambou, A., Nguepjop, J.R., Seye, M., Tossim, H.-A., Djiboune, Y.R., Sane, D., Rami, J.-F., Fonceka, D., 2020. Fine-Mapping of a Wild Genomic Region Involved in Pod and Seed Size Reduction on Chromosome A07 in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). Genes 11, 1402. https://doi.org/10.3390/genes11121402

Angelini, J., Castro, S., Fabra, A., 2003. Alterations in root colonization and nodC gene induction in the peanut–*rhizobia* interaction under acidic conditions. Plant Physiology and Biochemistry 41, 289–294. https://doi.org/10.1016/S0981-9428(03)00021-4

Angelini, J., Taurian, T., Morgante, C., Ibáñez, F., Castro, S., Fabra, A., 2005. Peanut nodulation kinetics in response to low pH. Plant Physiology and Biochemistry 43, 754–759. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.05.012

Anim-Somuah, H., Henson, S., Humphrey, J., Robinson, E., 2013. Strengthening Agri-Food Value Chains for Nutrition: Mapping Value Chains for Nutrient-Dense Foods in Ghana (IDS Evidence Report No. Evidence Report;2). Institute of Development Studies (IDS).

Arrenddell, S., Wynne, J.C., Elkan, G.H., Isleib, T.G., 1985. Variation for Nitrogen Fixation Among Progenies of a Virginia × Spanish Peanut Cross1. Crop Science 25, cropsci1985.0011183X002500050033x.https://doi.org/10.2135/cropsci1985.0011183X002500050033x

Arrendell, S., Wynne, J.C., Elkan, G.H., Schneeweis, T.J., 1986. Bidirectional Selection for Nitrogenase Activity and Shoot Dry Weight Among Late Generation Progenies of a Virginia x Spanish Peanut Cross. Peanut Science 13, 86–89. https://doi.org/10.3146/i0095-3679-13-2-12

Arrendell, S., Wynne, J.C., Elkan, G.H., Schneeweis, T.J., 1988. Selection Among Early Generation Peanut Progeny for Enhanced Nitrogen Fixation1. Peanut Science 15, 90–93. https://doi.org/10.3146/i0095-3679-15-2-12

Asante, M., Ahiabor, B.D.K., Atakora, W.K., 2020. Growth, Nodulation, and Yield Responses of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) as Influenced by Combined Application of Rhizobium Inoculant and Phosphorus in the Guinea Savanna Zone of Ghana. International Journal of Agronomy 2020, e8691757. https://doi.org/10.1155/2020/8691757

Ashfaq, M., Rasheed, A., Sajjad, M., Ali, M., Rasool, B., Javed, M.A., Allah, S.U., Shaheen, S., Anwar, A., Ahmad, M.S., Mubashar, U., 2022. Genome wide association mapping of yield and various desirable agronomic traits in Rice. Mol Biol Rep 49, 11371–11383. https://doi.org/10.1007/s11033-022-07687-5

Atkins, C.A., 1987. Metabolism and translocation of fixed nitrogen in the nodulated legume. Plant Soil 100, 157–169. https://doi.org/10.1007/BF02370939

Azani, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B., Boatwright, J.S., Borges, L.M., Brown, G.K., Bruneau, A., Candido, E., Cardoso, D., Chung, K.-F., Clark, R.P., Conceição, A. de S., Crisp, M., Cubas, P., Delgado-Salinas, A., Dexter, K.G., Doyle, J.J., Duminil, J., Egan,

A.N., Estrella, M. de la, Falcão, M.J., Filatov, D.A., Fortuna-Perez, A.P., Fortunato, R.H., Gagnon, E., Gasson, P., Rando, J.G., Tozzi, A.M.G. de A., Gunn, B., Harris, D., Haston, E., Hawkins, J.A., Herendeen, P.S., Hughes, C.E., Iganci, J.R.V., Javadi, F., Kanu, S.A., Kazempour-Osaloo, S., Kite, G.C., Klitgaard, B.B., Kochanovski, F.J., Koenen, E.J.M., Kovar, L., Lavin, M., Roux, M. le, Lewis, G.P., Lima, H.C. de, López-Roberts, M.C., Mackinder, B., Maia, V.H., Malécot, V., Mansano, V.F., Marazzi, B., Mattapha, S., Miller, J.T., Mitsuyuki, C., Moura, T., Murphy, D.J., Nageswara-Rao, M., Nevado, B., Neves, D., Ojeda, D.I., Pennington, R.T., Prado, D.E., Prenner, G., Queiroz, L.P. de, Ramos, G., Filardi, F.L.R., Ribeiro, P.G., Rico-Arce, M. de L., Sanderson, M.J., Santos-Silva, J., São-Mateus, W.M.B., Silva, M.J.S., Simon, M.F., Sinou, C., Snak, C., Souza, É.R. de, Sprent, J., Steele, K.P., Steier, J.E., Steeves, R., Stirton, C.H., Tagane, S., Torke, B.M., Toyama, H., Cruz, D.T. da, Vatanparast, M., Wieringa, J.J., Wink, M., Wojciechowski, M.F., Yahara, T., Yi, T., Zimmerman, E., 2017. A new subfamily classification of the *Leguminosae* based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). TAXON 66, 44–77. https://doi.org/10.12705/661.3

Barbosa, N., Portilla, E., Buendia, H.F., Raatz, B., Beebe, S., Rao, I., 2018. Genotypic differences in symbiotic nitrogen fixation ability and seed yield of climbing bean. Plant Soil 428, 223–239. https://doi.org/10.1007/s11104-018-3665-y

Batstone, R.T., Peters, M.A.E., Simonsen, A.K., Stinchcombe, J.R., Frederickson, M.E., 2020. Environmental variation impacts trait expression and selection in the legume–rhizobium symbiosis. American Journal of Botany 107, 195–208. https://doi.org/10.1002/ajb2.1432

Bechara, M.D., Moretzsohn, M.C., Palmieri, D.A., Monteiro, J.P., Bacci, M., Martins, J., Valls, J.F., Lopes, C.R., Gimenes, M.A., 2010. Phylogenetic relationships in genus *Arachis* based on ITS and 5.8S rDNA sequences. BMC Plant Biology 10, 255. https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-255

Behm, J.E., Geurts, R., Kiers, E.T., 2014. *Parasponia*: a novel system for studying mutualism stability. Trends in Plant Science 19, 757–763. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.08.007

Bertioli, D.J., Cannon, S.B., Froenicke, L., Huang, G., Farmer, A.D., Cannon, E.K.S., Liu, X., Gao, D., Clevenger, J., Dash, S., Ren, L., Moretzsohn, M.C., Shirasawa, K., Huang, W., Vidigal, B., Abernathy, B., Chu, Y., Niederhuth, C.E., Umale, P., Araújo, A.C.G., Kozik, A., Do Kim, K., Burow, M.D., Varshney, R.K., Wang, X., Zhang, X., Barkley, N., Guimarães, P.M., Isobe, S., Guo, B., Liao, B., Stalker, H.T., Schmitz, R.J., Scheffler, B.E., Leal-Bertioli, S.C.M., Xun, X., Jackson, S.A., Michelmore, R., Ozias-Akins, P., 2016. The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. Nature Genetics 48, 438–446. https://doi.org/10.1038/ng.3517

Bertioli, D.J., Jenkins, J., Clevenger, J., Dudchenko, O., Gao, D., Seijo, G., Leal-Bertioli, S.C.M., Ren, L., Farmer, A.D., Pandey, M.K., Samoluk, S.S., Abernathy, B., Agarwal, G., Ballén-Taborda, C., Cameron, C., Campbell, J., Chavarro, C., Chitikineni, A., Chu, Y., Dash, S., El Baidouri, M., Guo, B., Huang, W., Kim, K.D., Korani, W., Lanciano, S., Lui, C.G., Mirouze, M., Moretzsohn, M.C., Pham, M., Shin, J.H., Shirasawa, K., Sinharoy, S., Sreedasyam, A., Weeks, N.T., Zhang, X., Zheng, Z., Sun, Z., Froenicke, L., Aiden, E.L., Michelmore, R., Varshney, R.K., Holbrook, C.C., Cannon, E.K.S., Scheffler, B.E., Grimwood, J., Ozias-Akins, P., Cannon, S.B., Jackson, S.A., Schmutz, J., 2019. The genome sequence of segmental allotetraploid peanut *Arachis hypogaea*. Nature Genetics 51, 877–884. https://doi.org/10.1038/s41588-019-0405-z

Bertioli, D.J., Moretzsohn, M.C., Madsen, L.H., Sandal, N., Leal-Bertioli, S.C., Guimarães, P.M., Hougaard, B.K., Fredslund, J., Schauser, L., Nielsen, A.M., Sato, S., Tabata, S., Cannon, S.B., Stougaard, J., 2009. An analysis of synteny of *Arachis* with *Lotus* and *Medicago* sheds new light on the structure, stability and evolution of legume genomes. BMC Genomics 10, 45. https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-45

Bertioli, D.J., Seijo, G., Freitas, F.O., Valls, J.F.M., Leal-Bertioli, S.C.M., Moretzsohn, M.C., 2011. An overview of peanut and its wild relatives. Plant Genetic Resources 9, 134–149. https://doi.org/10.1017/S1479262110000444

Betts, J.H., Herridge, D.F., 1987. Isolation of Soybean Lines Capable of Nodulation and Nitrogen Fixation under High Levels of Nitrate Supply1. Crop Science 27, cropsci1987.0011183X002700060014x.https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183X002700060014x

Beye, A., Diakhate, P.B., Diouf, O., Faye, A., Obour, A.K., Stewart, Z.P., Assefa, Y., Min, D., Prasad, P.V.V., 2022. Socio-Economic Constraints of Adopting New Cowpea Varieties in Three Agro-Ecological Zones in the Senegalese Peanut Basin. Sustainability 14, 14550. https://doi.org/10.3390/su142114550

Bhanu, A., Y, G., MN, S., 2017. Advanced Backcross QTL Method: A Brief Overview. Trends in Biosciences 10, 20–25.

Birthal, P.S., Rao, P.P., Nigam, S.N., Bantilan, M.C.S., Bhagavatula, S., 2010. Groundnut and soybean economies in Asia: facts, trends and outlook. Groundnut and soybean economies in Asia: facts, trends and outlook. 86.

Blanco, M., Villarroya, I., 2002. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. TrAC Trends in Analytical Chemistry 21, 240–250. https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00404-1

Bloch, S.E., Ryu, M.-H., Ozaydin, B., Broglie, R., 2020. Harnessing atmospheric nitrogen for cereal crop production. Current Opinion in Biotechnology, Energy Biotechnologyy ● Environmental Biotechnology 62, 181–188. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.024

Boddey, R.M., Fosu, M., Atakora, W.K., Miranda, C.H.B., Boddey, L.H., Guimaraes, A.P., Ahiabor, B.D.K., 2017. Cowpea (*Vigna unguiculata*) crops in africa can respond to inoculation with rhizobium. Experimental Agriculture 53, 578–587. https://doi.org/10.1017/S0014479716000594

Bogino, P., Banchio, E., Bonfiglio, C., Giordano, W., 2008. Competitiveness of a *Bradyrhizobium* sp. Strain in Soils Containing Indigenous *Rhizobia*. Curr Microbiol 56, 66–72. https://doi.org/10.1007/s00284-007-9041-4

Bogino, P., Banchio, E., Rinaudi, L., Cerioni, G., Bonfiglio, C., Giordano, W., 2006. Peanut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp. in soils of Argentina. Annals of Applied Biology 148, 207–212. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2006.00055.x

Bonaldi, K., Gherbi, H., Franche, C., Bastien, G., Fardoux, J., Barker, D., Giraud, E., Cartieaux, F., 2010a. The Nod Factor–Independent Symbiotic Signaling Pathway: Development of *Agrobacterium rhizogenes*–Mediated Transformation for the Legume *Aeschynomene indica*. MPMI 23, 1537–1544. https://doi.org/10.1094/MPMI-06-10-0137

Bonaldi, K., Gourion, B., Fardoux, J., Hannibal, L., Cartieaux, F., Boursot, M., Vallenet, D., Chaintreuil, C., Prin, Y., Nouwen, N., & Giraud, E., 2010b. Large-Scale Transposon Mutagenesis of Photosynthetic *Bradyrhizobium* Sp. Strain ORS278 Reveals New Genetic Loci Putatively Important for Nod-Independent Symbiosis with *Aeschynomene indica*. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 23(6), 760-770. https://doi.org/10.1094/MPMI-23-6-0760

Boogerd, F.C., van Rossum, D., 1997. Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. FEMS Microbiol Rev 21, 5–27. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00342.x

Bourcy, M., Brocard, L., Pislariu, C.I., Cosson, V., Mergaert, P., Tadege, M., Mysore, K.S., Udvardi, M.K., Gourion, B., Ratet, P., 2013. *Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions. New Phytol. 197, 1250–1261. https://doi.org/10.1111/nph.12091

Bourion, V., Rizvi, S.M.H., Fournier, S., de Larambergue, H., Galmiche, F., Marget, P., Duc, G., Burstin, J., 2010. Genetic dissection of nitrogen nutrition in pea through a QTL approach of root, nodule, and shoot variability. Theor Appl Genet 121, 71–86. https://doi.org/10.1007/s00122-010-1292-y

Bouznif, B., Guefrachi, I., Rodríguez de la Vega, R.C., Hungria, M., Mars, M., Alunni, B., Shykoff, J.A., 2019. Phylogeography of the *Bradyrhizobium* spp. Associated With Peanut, *Arachis hypogaea*: Fellow Travelers or New Associations? Frontiers in Microbiology 10.

Brígido, C., Alexandre, A., Oliveira, S., 2012. Transcriptional analysis of major chaperone genes in salt-tolerant and salt-sensitive *mesorhizobia*. Microbiological Research 167, 623–629. https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.01.006

Brooker, R.W., Bennett, A.E., Cong, W.-F., Daniell, T.J., George, T.S., Hallett, P.D., Hawes, C., Iannetta, P.P.M., Jones, H.G., Karley, A.J., Li, L., McKenzie, B.M., Pakeman, R.J., Paterson, E., Schöb, C., Shen, J., Squire, G., Watson, C.A., Zhang, C., Zhang, F., Zhang, J., White, P.J., 2015. Improving intercropping: a synthesis of research in agronomy, plant physiology and ecology. New Phytol. 206, 107–117. https://doi.org/10.1111/nph.13132

Brouwer, D.J., St Clair, D.A., 2004. Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. Theor Appl Genet 108, 628–638. https://doi.org/10.1007/s00122-003-1469-8

Bucher, M., 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. New Phytologist 173, 11–26. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01935.x

Burow, M., Starr, J., Park, C.-H., Simpson, C., Paterson, A., 2014. Introgression of homeologous quantitative trait loci (QTL) for resistance to the root-knot nematode [*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood] in an advanced backcross-QTL population of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Molecular Breeding 34, 393–406. https://doi.org/10.1007/s11032-014-0042-2

Burow, M.D., Simpson, C.E., Paterson, A.H., Starr, J.L., 1996. Identification of peanut (*Arachis hypogaea* L.) RAPD markers diagnostic of root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) resistance. Molecular breeding: new strategies in plant improvement.

Burow, M.D., Simpson, C.E., Starr, J.L., Paterson, A.H., 2001. Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). broadening the gene pool of a monophyletic polyploid species. Genetics 159, 823–837. https://doi.org/10.1093/genetics/159.2.823

Burow, M.D., Starr, J.L., Park, C.-H., Simpson, C.E., Paterson, A.H., 2014. Introgression of homeologous quantitative trait loci (QTL) for resistance to the root-knot nematode [*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood] in an advanced backcross-QTL population of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Mol Breeding 34, 393–406. https://doi.org/10.1007/s11032-014-0042-2

Canady, M.A., Ji, Y., Chetelat, R.T., 2006. Homeologous Recombination in *Solanum lycopersicoides* Introgression Lines of Cultivated Tomato. Genetics 174, 1775–1788. https://doi.org/10.1534/genetics.106.065144

Carter, J.M., Tieman, J.S., Gibson, A.H., 1995. Competitiveness and persistence of strains of *rhizobia* for faba bean in acid and alkaline soils. Soil Biology and Biochemistry 27, 617–623. https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)98640-A

Castro, S., Permigiani, M., Vinocur, M., Fabra, A., 1999. Nodulation in peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots in the presence of native and inoculated *rhizobia* strains. Applied Soil Ecology 13, 39–44. https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00016-5

Chalk, P.M., Alves, B.J.R., Boddey, R.M., Urquiaga, S., 2010. Integrated effects of abiotic stresses on inoculant performance, legume growth and symbiotic dependence estimated by 15N dilution. Plant Soil 328, 1–16. https://doi.org/10.1007/s11104-009-0187-7

Chalk, P.M., Inácio, C.T., Chen, D., 2019. An overview of contemporary advances in the usage of 15N natural abundance (δ15N) as a tracer of agro-ecosystem N cycle processes that impact the environment. Agriculture, Ecosystems & Environment 283, 106570. https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106570

Chandler, M.R., 1978. Some Observations on Infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. J Exp Bot 29, 749–755. https://doi.org/10.1093/jxb/29.3.749

Chang, C., Chen, W., Luo, S., Ma, L., Li, X., Tian, C., 2019. Rhizosphere microbiota assemblage associated with wild and cultivated soybeans grown in three types of soil suspensions. Archives of Agronomy and Soil Science 65, 74–87. https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1485147

Chang, C., Damiani, I., Puppo, A., Frendo, P., 2009. Redox changes during the legume-rhizobium symbiosis. Mol Plant 2, 370–377. https://doi.org/10.1093/mp/ssn090

Checcucci, A., diCenzo, G.C., Perrin, E., Bazzicalupo, M., Mengoni, A., 2019. Chapter 3 - Genomic Diversity and Evolution of *Rhizobia*, in: Das, S., Dash, H.R. (Eds.), Microbial Diversity in the Genomic Era. Academic Press, pp. 37–46. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00003-4

Chetelat, R.T., Meglic, V., Cisneros, P., 2000. A Genetic Map of Tomato Based on BC1 *Lycopersicon esculentum* × *Solanum lycopersicoides* Reveals Overall Synteny but Suppressed Recombination Between These Homeologous Genomes. Genetics 154, 857–867. https://doi.org/10.1093/genetics/154.2.857

Chianu, Jonas. N., Nkonya, E.M., Mairura, F.S., Chianu, Justina. N., Akinnifesi, F.K., 2011. Biological nitrogen fixation and socioeconomic factors for legume production in sub-Saharan Africa: a review. Agronomy Sust. Developm. 31, 139–154. https://doi.org/10.1051/agro/2010004

Chu, Y., Gill, R., Clevenger, J., Timper, P., Holbrook, C.C., Ozias-Akins, P., 2016. Identification of Rare Recombinants Leads to Tightly Linked Markers for Nematode Resistance in Peanut. Peanut Science 43, 88–93. https://doi.org/10.3146/PS16-12.1

Clavel, D., Drame, N.K., Diop, N.D., Zuily-Fodil, Y., 2005. Adaptation à la sécheresse et création variétale : le cas de l'arachide en zone sahélienne - Première partie : revue bibliographique. OCL 12, 248–260. https://doi.org/10.1051/ocl.2005.0248

Clavel, D., Gautreau, J., 1997. L'arachide, in: Charrier, A., Jacquot, M., Hamon, S., Nicolas, D. (Eds.), L'amélioration Des Plantes Tropicales. CIRAD, Montpellier, pp. 61–82.

Clavel, D., N'Doye, O., 1997. La carte variétale de l'arachide au Sénégal.

Clavel, D., P., B., J.L., K., N.K., D., N.D., D., Diouf, O., Y., Z.-F., 2007. Adaptation à la sécheresse et création variétale : le cas de l'arachide en zone sahélienne. Oléagineux, Corps gras, Lipides 14. https://doi.org/10.1051/ocl.2007.0141

Clavel, D., Sylva, A. da, Ndoye, O., Mayeux, A., 2013. Amélioration de la qualité sanitaire de l'arachide au Sénégal : un challenge pour une opération de recherche-développement participative. Cahiers Agricultures 22, 174-181 (1). https://doi.org/10.1684/agr.2013.0630

Cleland, J., Machiyama, K., 2017. The Challenges Posed by Demographic Change in sub-Saharan Africa: A Concise Overview. Population and Development Review 43, 264–286.

Company, M., Stalker, H.T., Wynne, J.C., 1982. Cytology and leafspot resistance in *Arachis hypogaea* x wild species hybrids. Euphytica 31, 885–893. https://doi.org/10.1007/BF00039228

Cox, A., Boots-Haupt, L., Brasier, K., Riar, R., Zakeri, H., 2022. Using δ15N to screen for nitrogen fixation: Reference plant position and species. Agronomy Journal 114, 1842–1850. https://doi.org/10.1002/agj2.21032

Dakora, F.D., 1998. Nodule function in symbiotic Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.) and Kersting's bean (*Macrotyloma geocarpum* L.) is tolerant of nitrate in the root medium. Annals of botany 82, 687–690. https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0720

Damiani, I., Pauly, N., Puppo, A., Brouquisse, R., Boscari, A., 2016. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Control Early Steps of the Legume – Rhizobium Symbiotic Interaction. Frontiers in Plant Science 7.

Dardanelli, M.S., de Córdoba, F.J.F., Estévez, J., Contreras, R., Cubo, M.T., Rodríguez-Carvajal, M.Á., Gil-Serrano, A.M., López-Baena, F.J., Bellogín, R., Manyani, H., Ollero, F.J., Megías, M., 2012. Changes in flavonoids secreted by *Phaseolus vulgaris* roots in the presence of salt and the plant growth-promoting rhizobacterium *Chryseobacterium balustinum*. Applied Soil Ecology 57, 31–38. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.01.005

Dardanelli, M.S., González, P.S., Medeot, D.B., Paulucci, N.S., Bueno, M.Á., Garcia, M.B., 2009. Effects of peanut *rhizobia* on the growth and symbiotic performance of *Arachis hypogaea* under abiotic stress. Symbiosis 47, 175–180. https://doi.org/10.1007/BF03179977

Das, D.R., Horváth, B., Kundu, A., Kaló, P., DasGupta, M., 2019. Functional conservation of CYCLOPS in crack entry legume *Arachis hypogaea*. Plant Sci. 281, 232–241. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.12.003

Dawson, J.O., 2008. Ecology Of Actinorhizal Plants, in: Pawlowski, K., Newton, W.E. (Eds.), Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbioses, Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 199–234. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3547-0_8

Day, D.A., Lambers, H., Bateman, J., Carroll, B.J., Gresshoff, P.M., 1986. Growth comparisons of a supernodulating soybean (*Glycine max*) mutant and its wild-type parent. Physiologia Plantarum 68, 375–382. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb03368.x

de Freitas, A.D.S., Fernandes Silva, A., Valadares de Sá Barretto Sampaio, E., 2012. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. Biomass and Bioenergy 45, 109–114. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.017

De Lajudie, P.M., Andrews, M., Ardley, J., Eardly, B., Jumas-Bilak, E., Kuzmanović, N., Lassalle, F., Lindström, K., Mhamdi, R., Martínez-Romero, E., Moulin, L., Mousavi, S.A., Nesme, X., Peix, A., Puławska, J., Steenkamp, E., Stępkowski, T., Tian, C.-F., Vinuesa, P., Wei, G., Willems, A., Zilli, J., Young, P., 2019. Minimal standards for the description of new genera and species of *rhizobia* and *agrobacteria*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 69, 1852–1863. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003426

Deaker, R., Roughley, R.J., Kennedy, I.R., 2004. Legume seed inoculation technology—a review. Soil Biology and Biochemistry, Nitrogen Fixation in Australian Agricultural Systems: 13th Australian Nitrogen Fixation Conference 36, 1275–1288. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.009
Denison, R.F., 2015. Evolutionary tradeoffs as opportunities to improve yield potential. Field Crops Research, SI:Yield potential 182, 3–8. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.04.004
Dhanushkodi, R., Matthew, C., McManus, M.T., Dijkwel, P.P., 2018. Drought-induced senescence of *Medicago truncatula* nodules involves serpin and ferritin to control proteolytic activity and iron levels. New Phytologist 220, 196–208. https://doi.org/10.1111/nph.15298
Diagana, B.N., Kelly, V., 1996. Will the CFA Franc Devaluation Enhance Sustainable Agricultural Intensification in the Senegalese Peanut Basin? (Food Security International Development Policy Syntheses No. 11423). Michigan State University, Department of Agricultural, Food, and Resource Economics.
Diaz, L.M., Ricaurte, J., Cajiao, C., Galeano, C.H., Rao, I., Beebe, S., Raatz, B., 2017. Phenotypic evaluation and QTL analysis of yield and symbiotic nitrogen fixation in a common bean population grown with two levels of phosphorus supply. Mol Breeding 37, 76. https://doi.org/10.1007/s11032-017-0673-1
Didagbé, O.Y., Houngnandan, P., Sina, H., Zoundji, C.C., Kouelo, F.A., Lakou, J., Toukourou, F., Baba-Moussa, L., 2014. Response of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to exogenous *Bradyrhizobium* sp. strains inoculation and phosphorus supply in two agro-ecological zones of Benin, West Africa. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences 2, 623–633.
Dixon, R., Kahn, D., 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. Nat Rev Microbiol 2, 621–631. https://doi.org/10.1038/nrmicro954
Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 29, 15–21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635
Dorival, J., Philys, S., Giuntini, E., Brailly, R., de Ruyck, J., Czjzek, M., Biondi, E., Bompard, C., 2020. Structural and enzymatic characterisation of the Type III effector NopAA (=GunA) from Sinorhizobium fredii USDA257 reveals a Xyloglucan hydrolase activity. Sci Rep 10, 9932. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67069-4
Doyle, J.J., 1998. Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. Trends in Plant Science 3, 473–478. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01340-5
Doyle, J.J., 2016. Chasing unicorns: Nodulation origins and the paradox of novelty. American Journal of Botany 103, 1865–1868. https://doi.org/10.3732/ajb.1600260
Dunnett, C.W., 1985. Multiple Comparisons between Several Treatments and a Specified Treatment, in: Caliński, T., Klonecki, W. (Eds.), Linear Statistical Inference, Lecture Notes in Statistics. Springer, New York, NY, pp. 39–47. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7353-1_4
Dutta, M., Reddy, L.J., 1988. Further Studies on Genetics of Non nodulation in Peanut. Crop Science 28,cropsci1988.0011183X002800010015x.https://doi.org/10.2135/cropsci1988.0011183X002800010015x
Dutta, S., Kaur, M., Podile, A.R., 2011. Crop Health Improvement with Groundnut Associated Bacteria, in: Maheshwari, D.K. (Ed.), Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 407–430. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_15
Dwivedi, S., Crouch, J., Mackill, D., Xu, Y., Blair, M., Ragot, M., Upadhyaya, H., Ortiz, R., 2007. The Molecularization of Public Sector Crop Breeding: Progress, Problems, and Prospects. Advances in Agronomy 95, 163–318. https://doi.org/10.1016/S0065-2113(07)95003-8
Dwivedi, S.L., Sahrawat, K.L., Upadhyaya, H.D., Mengoni, A., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Biondi, E.G., Hungria, M., Kaschuk, G., Blair, M.W., Ortiz, R., 2015. Advances in Host Plant and Rhizobium Genomics to Enhance Symbiotic Nitrogen Fixation in Grain Legumes, in: Advances in Agronomy. Elsevier, pp. 1–116. https://doi.org/10.1016/bs.agron.2014.09.001
Dwivedi, S.L., Upadhyaya, H.D., Balaji, J., Buhariwalla, H.K., Blair, M.W., Ortiz, R., Crouch, J.H., Serraj, R., 2005. Using Genomics to Exploit Grain Legume Biodiversity in Crop Improvement, in: Plant Breeding Reviews. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 171–357. https://doi.org/10.1002/9780470650325.ch6
Dwivedi, S.L., Upadhyaya, H.D., Balaji, J., Buhariwalla, H.K., Blair, M.W., Ortiz, R., Crouch, J.H., Serraj, R., 2005. Using Genomics to Exploit Grain Legume Biodiversity in Crop Improvement,

in: Plant Breeding Reviews. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 171–357. https://doi.org/10.1002/9780470650325.ch6
Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M., Long, S.R., 1992. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. Science 256, 998–1000. https://doi.org/10.1126/science.10744524
El-Akhal, M.R., Rincón, A., Arenal, F., Lucas, M.M., El Mourabit, N., Barrijal, S., Pueyo, J.J., 2008. Genetic diversity and symbiotic efficiency of rhizobial isolates obtained from nodules of *Arachis hypogaea* in northwestern Morocco. Soil Biology and Biochemistry 40, 2911–2914. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.08.005
Elrys, A.S., Abdel-Fattah, M.K., Raza, S., Chen, Z., Zhou, J., 2019. Spatial trends in the nitrogen budget of the African agro-food system over the past five decades. Environ. Res. Lett. 14, 124091. https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab5d9e
Emms, D.M., Kelly, S., 2015. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. Genome Biology 16, 157. https://doi.org/10.1186/s13059-015-0721-2
Erisman, J.W., Sutton, M.A., Galloway, J., Klimont, Z., Winiwarter, W., 2008. How a century of ammonia synthesis changed the world. Nature Geosci 1, 636–639. https://doi.org/10.1038/ngeo325
Eskew, D.L., Kapuya, J., Danso, S.K.A., 1989. Nitrate Inhibition of Nodulation and Nitrogen Fixation by Supernodulating Nitrate-Tolerant Symbiosis Mutants of Soybean. Crop Science 29, cropsci1989.0011183X002900060035x.https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900060035x
Ewels, P.A., Peltzer, A., Fillinger, S., Patel, H., Alneberg, J., Wilm, A., Garcia, M.U., Di Tommaso, P., Nahnsen, S., 2020. The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. Nat Biotechnol 38, 276–278. https://doi.org/10.1038/s41587-020-0439-x
Fabra, A., Castro, S., Taurian, T., Angelini, J., Ibañez, F., Dardanelli, M., Tonelli, M., Bianucci, E., Valetti, L., 2010. Interaction among *Arachis hypogaea* L. (peanut) and beneficial soil microorganisms: how much is it known? Critical Reviews in Microbiology 36, 179–194. https://doi.org/10.3109/10408410903584863
Fageria, N.K., Baligar, V.C., 2008. Chapter 7 Ameliorating Soil Acidity of Tropical Oxisols by Liming For Sustainable Crop Production, in: Advances in Agronomy. Academic Press, pp. 345–399. https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)00407-0
FAO, I., 2020. The State of Food Security and Nutrition in the World 2020: Transforming food systems for affordable healthy diets, The State of Food Security and Nutrition in the World (SOFI). FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO, Rome, Italy. https://doi.org/10.4060/ca9692en
FAOSTAT, 2023. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database https://www.fao.org/faostat/fr/#data/QCL/visualize
Fasoula, V., Harris, D., Boerma, H., 2004. Validation and Designation of Quantitative Trait Loci for Seed Protein, Seed Oil, and Seed Weight from Two Soybean Populations. Crop Science - CROP SCI 44. https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1218
Fávero, A.P., Simpson, C.E., Valls, J.F.M., Vello, N.A., 2006. Study of the Evolution of Cultivated Peanut through Crossability Studies among *Arachis ipaënsis* , *A. duranensis* , and *A. hypogaea*. Crop Sci. 46, 1546–1552. https://doi.org/10.2135/cropsci2005.09-0331
Ferguson, M.E., Jarvis, A., Stalker, H.T., Williams, D.E., Guarino, L., Valls, J.F.M., Pittman, R.N., Simpson, C.E., Bramel, P.J., 2005. Biogeography of wild *Arachis* (*Leguminosae*): distribution and environmental characterisation. Biodivers Conserv 14, 1777–1798. https://doi.org/10.1007/s10531-004-0699-7
Fonceka, D., 2010. Elargissement de la base génétique de l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea*) : applications pour la construction de populations, l'identification de QTL, et l'amélioration de l'espèce cultivée (Thèse de doctorat). Montpellier, SupAgro.
Fonceka, D., Hodo-Abalo, T., Rivallan, R., Faye, I., Sall, M.N., Ndoye, O., Fávero, A.P., Bertioli, D.J., Glaszmann, J.-C., Courtois, B., Rami, J.-F., 2009. Genetic mapping of wild introgressions into cultivated peanut: a way toward enlarging the genetic basis of a recent allotetraploid. BMC Plant Biology 9, 103. https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-103

Fonceka, D., Tossim, H.-A., Rivallan, R., Vignes, H., Faye, I., Ndoye, O., Moretzsohn, M.C., Bertioli, D.J., Glaszmann, J.-C., Courtois, B., Rami, J.-F., 2012a. Fostered and left behind alleles in peanut: interspecific QTL mapping reveals footprints of domestication and useful natural variation for breeding. BMC Plant Biology 12, 26. https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-26

Fonceka, D., Tossim, H.-A., Rivallan, R., Vignes, H., Lacut, E., Bellis, F. de, Faye, I., Ndoye, O., Leal-Bertioli, S.C.M., Valls, J.F.M., Bertioli, D.J., Glaszmann, J.-C., Courtois, B., Rami, J.-F., 2012b. Construction of Chromosome Segment Substitution Lines in Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Using a Wild Synthetic and QTL Mapping for Plant Morphology. PLOS ONE 7, e48642. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048642

Furlan, A., Llanes, A., Luna, V., Castro, S., 2012. Physiological and Biochemical Responses to Drought Stress and Subsequent Rehydration in the Symbiotic Association Peanut-*Bradyrhizobium* sp. International Scholarly Research Notices 2012, e318083. https://doi.org/10.5402/2012/318083

Furseth, B.J., Conley, S.P., Ané, J.-M., 2012. Soybean Response to Soil *Rhizobia* and Seed-applied *Rhizobia* Inoculants in Wisconsin. Crop Science 52, 339–344. https://doi.org/10.2135/cropsci2011.01.0041

Gallo-Meagher, M., Dashiell, K.E., Gorbet, D.W., 2001. Parental Effects in the Inheritance of Nonnodulation in Peanut. Journal of Heredity 92, 86–89. https://doi.org/10.1093/jhered/92.1.86

García-Alcalde, F., Okonechnikov, K., Carbonell, J., Cruz, L.M., Götz, S., Tarazona, S., Dopazo, J., Meyer, T.F., Conesa, A., 2012. Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. Bioinformatics 28, 2678–2679. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts503

Gavrin, A., Kaiser, B.N., Geiger, D., Tyerman, S.D., Wen, Z., Bisseling, T., Fedorova, E.E., 2014. Adjustment of Host Cells for Accommodation of Symbiotic Bacteria: Vacuole Defunctionalization, HOPS Suppression, and TIP1g Retargeting in *Medicago*. The Plant Cell 26, 3809–3822. https://doi.org/10.1105/tpc.114.128736

Gepts, P., 2004. Crop domestication as a long-term selection experiment. Plant breeding reviews.

Giller, K.E., Delaune, T., Silva, J.V., Descheemaeker, K., van de Ven, G., Schut, A.G.T., van Wijk, M., Hammond, J., Hochman, Z., Taulya, G., Chikowo, R., Narayanan, S., Kishore, A., Bresciani, F., Teixeira, H.M., Andersson, J.A., van Ittersum, M.K., 2021. The future of farming: Who will produce our food? Food Sec. 13, 1073–1099. https://doi.org/10.1007/s12571-021-01184-6

Gimode, D., Chu, Y., Dean, L., Holbrook, C., Fonceka, D., Ozias-Akins, P., 2020. Seed Composition Survey of a Peanut CSSL Population Reveals Introgression Lines with Elevated Oleic/Linoleic Profiles. Peanut Science 47, 139–149. https://doi.org/10.3146/PS20-17.1

Gimode, D., Chu, Y., Holbrook, C.C., Fonceka, D., Porter, W., Dobreva, I., Teare, B., Ruiz-Guzman, H., Hays, D., Ozias-Akins, P., 2023. High-Throughput Canopy and Belowground Phenotyping of a Set of Peanut CSSL Detects Lines with Increased Pod Weight and Foliar Disease Tolerance. Agronomy 13, 1223. https://doi.org/10.3390/agronomy13051223

Gimode, D.M., 2019. Genotypic and Phenotypic Dissection of Key Traits in Peanut with Emphasis on the Chromosome Segment Substitution Line (CSSL) Population (Thèse de doctorat). University of Georgia.

Giordano, D.F., Pastor, N., Palacios, S., Oddino, C.M., Torres, A.M., 2021. Peanut leaf spot caused by *Nothopassalora personata*. Trop. plant pathol. 46, 139–151. https://doi.org/10.1007/s40858-020-00411-3

Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.-C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W.L., Chang, W.-S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Verméglio, A., Médigue, C., Sadowsky, M., 2007. Legumes Symbioses: Absence of Nod Genes in Photosynthetic *Bradyrhizobia*. Science 316, 1307–1312. https://doi.org/10.1126/science.1139548

Gislum, R., Micklander, E., Nielsen, J.P., 2004. Quantification of nitrogen concentration in perennial ryegrass and red fescue using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) and chemometrics. Field Crops Research 88, 269–277. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.01.021

Gomez, M., Silva, N., Hartmann, A., Sagardoy, M., Catroux, G., 1997. Evaluation of commercial soybean inoculants from Argentina. World Journal of Microbiology and Biotechnology 13, 167–173. https://doi.org/10.1023/A:1018533629378

Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., Frugier, F., 2006. The *Medicago truncatula* CRE1 Cytokinin Receptor Regulates Lateral Root Development and Early Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*. The Plant Cell 18, 2680–2693. https://doi.org/10.1105/tpc.106.043778

Good, A.G., Shrawat, A.K., Muench, D.G., 2004. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? Trends in Plant Science 9, 597–605. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.10.008

Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., Stacey, G., 2015. Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. Trends Plant Sci 20, 186–194. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.008

Goyal, R.K., Mattoo, A.K., Schmidt, M.A., 2021. Rhizobial–Host Interactions and Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Crops Toward Agriculture Sustainability. Frontiers in Microbiology 12.

Grandillo, S., Tanksley, S.D., Zamir, D., 2007. Exploitation of Natural Biodiversity Through Genomics, in: Genomics-Assisted Crop Improvement. Springer, Dordrecht, pp. 121–150. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6295-7_6

Greenlon, A., Chang, P.L., Damtew, Z.M., Muleta, A., Carrasquilla-Garcia, N., Kim, D., Nguyen, H.P., Suryawanshi, V., Krieg, C.P., Yadav, S.K., Patel, J.S., Mukherjee, A., Udupa, S., Benjelloun, I., Thami-Alami, I., Yasin, M., Patil, B., Singh, S., Sarma, B.K., von Wettberg, E.J.B., Kahraman, A., Bukun, B., Assefa, F., Tesfaye, K., Fikre, A., Cook, D.R., 2019. Global-level population genomics reveals differential effects of geography and phylogeny on horizontal gene transfer in soil bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences 116, 15200–15209. https://doi.org/10.1073/pnas.1900056116

Gregory, W.C., Gregory, M.P., 1976. Groundnut: *Arachis hypogaea* (*Leguminosae-Papilionatae*). Evolution of Crop Plants. N. W. Simmonds, ed.

Gremaud, M.F., Harper, J.E., 1989. Selection and Initial Characterization of Partially Nitrate Tolerant Nodulation Mutants of Soybean 1. Plant Physiology 89, 169–173. https://doi.org/10.1104/pp.89.1.169

Griesmann, M., Chang, Y., Liu, X., Song, Y., Haberer, G., Crook, M.B., Billault-Penneteau, B., Lauressergues, D., Keller, J., Imanishi, L., Roswanjaya, Y.P., Kohlen, W., Pujic, P., Battenberg, K., Alloisio, N., Liang, Y., Hilhorst, H., Salgado, M.G., Hocher, V., Gherbi, H., Svistoonoff, S., Doyle, J.J., He, S., Xu, Y., Xu, S., Qu, J., Gao, Q., Fang, X., Fu, Y., Normand, P., Berry, A.M., Wall, L.G., Ané, J.-M., Pawlowski, K., Xu, X., Yang, H., Spannagl, M., Mayer, K.F.X., Wong, G.K.-S., Parniske, M., Delaux, P.-M., Cheng, S., 2018. Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. Science 361. https://doi.org/10.1126/science.aat1743

Gross, B.L., Olsen, K.M., 2010. Genetic perspectives on crop domestication. Trends in Plant Science 15, 529–537. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.05.008

Guha, S., Sarkar, M., Ganguly, P., Uddin, M.R., Mandal, S., DasGupta, M., 2016. Segregation of nod-containing and nod-deficient *bradyrhizobia* as endosymbionts of *Arachis hypogaea* and as endophytes of *Oryza sativa* in intercropped fields of Bengal Basin, India. Environmental Microbiology 18, 2575–2590. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13348

Guimarães, A.A., Jaramillo, P.M.D., Nóbrega, R.S.A., Florentino, L.A., Silva, K.B., Moreira, F.M. de S., 2012. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. Applied and Environmental Microbiology 78, 6726–6733.

Guinel, F.C., 2009. Getting around the legume nodule: I. The structure of the peripheral zone in four nodule types. Botany 87, 1117–1138. https://doi.org/10.1139/B09-074

Guinel, F.C., 2015. Ethylene, a Hormone at the Center-Stage of Nodulation. Front. Plant Sci. 6. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01121

Gully, D., Czernic, P., Cruveiller, S., Mahé, F., Longin, C., Vallenet, D., François, P., Nidelet, S., Rialle, S., Giraud, E., Arrighi, J.-F., DasGupta, M., Cartieaux, F., 2018. Transcriptome Profiles of Nod Factor-independent Symbiosis in the Tropical Legume *Aeschynomene evenia*. Sci Rep 8, 10934. https://doi.org/10.1038/s41598-018-29301-0

Gully, D., Gargani, D., Bonaldi, K., Grangeteau, C., Chaintreuil, C., Fardoux, J., Nguyen, P., Marchetti, R., Nouwen, N., Molinaro, A., Mergaert, P., Giraud, E., 2016. A Peptidoglycan-Remodeling Enzyme Is Critical for Bacteroid Differentiation in *Bradyrhizobium* spp. During Legume Symbiosis. MPMI 29, 447–457. https://doi.org/10.1094/MPMI-03-16-0052-R

Gwata, E.T., Wofford, D.S., Boote, K.J., Blount, A.R., Pfahler, P.L., 2005. Inheritance of Promiscuous Nodulation in Soybean. Crop Science 45, 635–638. https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0635
Hakim, S., Imran, A., Hussain, M.S., Mirza, M.S., 2023. RNA-Seq analysis of mung bean (*Vigna radiata* L.) roots shows differential gene expression and predicts regulatory pathways responding to taxonomically different *rhizobia*. Microbiological Research 275, 127451. https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127451
Hakoyama, T., Niimi, K., Watanabe, H., Tabata, R., Matsubara, J., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Jichun, L., Matsumoto, T., Tatsumi, K., Nomura, M., Tajima, S., Ishizaka, M., Yano, K., Imaizumi-Anraku, H., Kawaguchi, M., Kouchi, H., Suganuma, N., 2009. Host plant genome overcomes the lack of a bacterial gene for symbiotic nitrogen fixation. Nature 462, 514–517. https://doi.org/10.1038/nature08594
Hamawaki, R.L., Kantartzi, S.K., 2018. Di-nitrogen fixation at the early and late growth stages of soybean. Acta Scientiarum. Agronomy 40, e36372–e36372. https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.36372
Hammons, R.O., 1994. The origin and history of the groundnut, in: Smartt, J. (Ed.), The Groundnut Crop: A Scientific Basis for Improvement, World Crop Series. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 24–42. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0733-4_2
Hardarson, G., 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. Plant Soil 152, 1–17. https://doi.org/10.1007/BF00016329
Harris, D., 2019. Intensification benefit index: how much can rural households benefit from agricultural intensification? Experimental Agriculture 55, 273–287. https://doi.org/10.1017/S0014479718000042
Harris, D., Orr, A., 2014. Is rainfed agriculture really a pathway from poverty? Agricultural Systems 123, 84–96. https://doi.org/10.1016/j.agsy.2013.09.005
Harrison, T.L., Wood, C.W., Borges, I.L., Stinchcombe, J.R., 2017. No evidence for adaptation to local rhizobial mutualists in the legume *Medicago lupulina*. Ecology and Evolution 7, 4367–4376. https://doi.org/10.1002/ece3.3012
Heath, K.D., 2010. Intergenomic Epistasis and Coevolutionary Constraint in Plants and *Rhizobia*. Evolution 64, 1446–1458. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00913.x
Hellriegel, H., Wilfarth, H., 1888. Untersuchungen über die Stickstoffnährung der Gramineen und Leguminoseen. Beilageheft.
Herridge, D., Rose, I., 2000. Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. Field Crops Research 65, 229–248. https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00089-1
Herridge, D.F., Bergersen, F.J., Peoples, M.B., 1990. Measurement of Nitrogen Fixation by Soybean in the Field Using the Ureide and Natural 15N Abundance Methods 1. Plant Physiology 93, 708–716. https://doi.org/10.1104/pp.93.2.708
Herridge, D.F., Betts, J.H., 1988. Field evaluation of soybean genotypes selected for enhanced capacity to nodulate and fix nitrogen in the presence of nitrate. Plant Soil 110, 129–135. https://doi.org/10.1007/BF02143548
Herridge, D.F., Giller, K.E., Jensen, E.S., Peoples, M.B., 2022. Quantifying country-to-global scale nitrogen fixation for grain legumes II. Coefficients, templates and estimates for soybean, groundnut and pulses. Plant Soil 474, 1–15. https://doi.org/10.1007/s11104-021-05166-7
Herridge, D.F., Peoples, M.B., Boddey, R.M., 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant and Soil 311, 1–18. https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3
Herridge, D.F., Robertson, M.J., Cocks, B., Peoples, M.B., Holland, J.F., Heuke, L., Herridge, D.F., Robertson, M.J., Cocks, B., Peoples, M.B., Holland, J.F., Heuke, L., 2005. Low nodulation and nitrogen fixation of mungbean reduce biomass and grain yields. Aust. J. Exp. Agric. 45, 269–277. https://doi.org/10.1071/EA03130
Hollander, M., Wolfe, D.A., Chicken, E., 2013. Nonparametric Statistical Methods. John Wiley & Sons.
Horváth, B., Domonkos, Á., Kereszt, A., Szűcs, A., Ábrahám, E., Ayaydin, F., Bóka, K., Chen, Y., Chen, R., Murray, J.D., Udvardi, M.K., Kondorosi, É., Kaló, P., 2015. Loss of the nodule-specific cysteine rich peptide, NCR169, abolishes symbiotic nitrogen fixation in the *Medicago truncatula* dnf7 mutant. Proceedings of the National Academy of Sciences 112, 15232–15237. https://doi.org/10.1073/pnas.1500777112

Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. Biometrical Journal 50, 346–363. https://doi.org/10.1002/bimj.200810425
Huang, L., He, H., Chen, W., Ren, X., Chen, Y., Zhou, X., Xia, Y., Wang, X., Jiang, X., Liao, B., Jiang, H., 2015. Quantitative trait locus analysis of agronomic and quality-related traits in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). Theor Appl Genet 128, 1103–1115. https://doi.org/10.1007/s00122-015-2493-1
Hueck, C.J., 1998. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 379–433.
Hufford, M.B., Berny Mier y Teran, J.C., Gepts, P., 2019. Crop Biodiversity: An Unfinished Magnum Opus of Nature. Annu. Rev. Plant Biol. 70, 727–751. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040240
Hufford, M.B., Lubinksy, P., Pyhäjärvi, T., Devengenzo, M.T., Ellstrand, N.C., Ross-Ibarra, J., 2013. The Genomic Signature of Crop-Wild Introgression in Maize. PLOS Genetics 9, e1003477. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003477
Hungria, M., Vargas, M.A.T., 2000. Environmental factors affecting N2 fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. Field Crops Research 65, 151–164. https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00084-2
Huo, X., Li, X., Du, H., Kong, Y., Tian, R., Li, W., Zhang, C., 2019. Genetic loci and candidate genes of symbiotic nitrogen fixation–related characteristics revealed by a genome-wide association study in soybean. Mol Breeding 39, 127. https://doi.org/10.1007/s11032-019-1022-3
Hwang, S., Ray, J.D., Cregan, P.B., King, C.A., Davies, M.K., Purcell, L.C., 2014. Genetics and mapping of quantitative traits for nodule number, weight, and size in soybean (*Glycine max* L.[Merr.]). Euphytica 195, 419–434. https://doi.org/10.1007/s10681-013-1005-0
Ibáñez, F., Angelini, J., Figueredo, M.S., Muñoz, V., Tonelli, M.L., Fabra, A., 2015. Sequence and expression analysis of putative *Arachis hypogaea* (peanut) Nod factor perception proteins. J Plant Res 128, 709–718. https://doi.org/10.1007/s10265-015-0719-6
Ibáñez, F., Fabra, A., 2011. Rhizobial Nod factors are required for cortical cell division in the nodule morphogenetic programme of the *Aeschynomeneae* legume *Arachis*. Plant Biology 13, 794–800. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00439.x
Ibáñez, F., Wall, L., Fabra, A., 2017. Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots. J. Exp. Bot. 68, 1905–1918. https://doi.org/10.1093/jxb/erw387
Isidra-Arellano, M.C., Reyero-Saavedra, M.D.R., Sánchez-Correa, M.D.S., Pingault, L., Sen, S., Joshi, T., Girard, L., Castro-Guerrero, N.A., Mendoza-Cozatl, D.G., Libault, M., Valdés-López, O., 2018. Phosphate Deficiency Negatively Affects Early Steps of the Symbiosis between Common Bean and *Rhizobia*. Genes 9, 498. https://doi.org/10.3390/genes9100498
Isleib, T.G., Wynne, J.C., Elkan, G.H., Schneeweis, T.J., 1980. Quantitative Genetic Aspects of Nitrogen Fixation in Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) 1, 2. Peanut Science 7, 101–105. https://doi.org/10.3146/i0095-3679-7-2-11
Ivanov, S., Fedorova, E.E., Limpens, E., De Mita, S., Genre, A., Bonfante, P., Bisseling, T., 2012. Rhizobium–legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 8316–8321. https://doi.org/10.1073/pnas.1200407109
Jaganathan, D., Bohra, A., Thudi, M., Varshney, R.K., 2020. Fine mapping and gene cloning in the post-NGS era: advances and prospects. Theor Appl Genet 133, 1791–1810. https://doi.org/10.1007/s00122-020-03560-w
Jaiswal, S.K., Msimbira, L.A., Dakora, F.D., 2017. Phylogenetically diverse group of native bacterial symbionts isolated from root nodules of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in South Africa. Systematic and Applied Microbiology 40, 215–226. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.02.002
Janila, P., Nigam, S.N., Pandey, M.K., Nagesh, P., Varshney, R.K., 2013. Groundnut improvement: use of genetic and genomic tools. Frontiers in Plant Genetics and Genomic 4, 1–16.
Janila, P., Variath, M.T., Pandey, M.K., Desmae, H., Motagi, B.N., Okori, P., Manohar, S.S., Rathnakumar, A.L., Radhakrishnan, T., Liao, B., Varshney, R.K., 2016. Genomic Tools in Groundnut Breeding Program: Status and Perspectives. Frontiers in Plant Science 07, 01–15.
Jarvis, B.D.W., Van Berkum, P., Chen, W.X., Nour, S.M., Fernandez, M.P., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M., 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium*

mediterraneum, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 47, 895–898. https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-895

Jensen, E.S., 1987. Variation in Nitrate Tolerance of Nitrogen Fixation in the Pea/Rhizobium Symbiosis. Plant Breeding 98, 130–135. https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1987.tb01105.x

Jiménez-Guerrero, I., Pérez-Montaño, F., Zdyb, A., Beutler, M., Werner, G., Göttfert, M., Ollero, F.J., Vinardell, J.M., López-Baena, F.J., 2019. GunA of *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* HH103 is a T3SS-secreted cellulase that differentially affects symbiosis with cowpea and soybean. Plant Soil 435, 15–26. https://doi.org/10.1007/s11104-018-3875-3

Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., Walker, G.C., 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. Nat Rev Microbiol 5, 619–633. https://doi.org/10.1038/nrmicro1705

Kalia, C., V., & Drevon, J. J. 1985. Variation de l'activite nitrogenase (reduction de l'acetylene) pendant l'incubation in situ des nodosites de *Glycine max* (L.) Merr. Comptes Rendus De l'Academie Des Sciences. Serie III. Sciences de La Vie, 301(12). https://agris.fao.org/search/en/providers/122535/records/64737b66e17b74d22259dde9

Kamfwa, K., Cichy, K.A., Kelly, J.D., 2015. Genome-wide association analysis of symbiotic nitrogen fixation in common bean. Theor Appl Genet 128, 1999–2017. https://doi.org/10.1007/s00122-015-2562-5

Kamfwa, K., Cichy, K.A., Kelly, J.D., 2019. Identification of quantitative trait loci for symbiotic nitrogen fixation in common bean. Theor Appl Genet. https://doi.org/10.1007/s00122-019-03284-6

Karmakar, K., Kundu, A., Rizvi, A.Z., Dubois, E., Severac, D., Czernic, P., Cartieaux, F., DasGupta, M., 2018. Transcriptomic Analysis With the Progress of Symbiosis in 'Crack-Entry' Legume *Arachis hypogaea* Highlights Its Contrast With 'Infection Thread' Adapted Legumes. MPMI 32, 271–285. https://doi.org/10.1094/MPMI-06-18-0174-R

Karmakar, K., Kundu, A., Rizvi, A.Z., Dubois, E., Severac, D., Czernic, P., Cartieaux, F., DasGupta, M., 2018. Transcriptomic Analysis With the Progress of Symbiosis in 'Crack-Entry' Legume *Arachis hypogaea* Highlights Its Contrast With 'Infection Thread' Adapted Legumes. MPMI 32, 271–285. https://doi.org/10.1094/MPMI-06-18-0174-R

Khera, P., Pandey, M.K., Mallikarjuna, N., Sriswathi, M., Roorkiwal, M., Janila, P., Sharma, S., Shilpa, K., Sudini, H., Guo, B., Varshney, R.K., 2019. Genetic imprints of domestication for disease resistance, oil quality, and yield component traits in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Mol Genet Genomics 294, 365–378. https://doi.org/10.1007/s00438-018-1511-9

Kiers, E.T., Hutton, M.G., Denison, R.F., 2007. Human selection and the relaxation of legume defences against ineffective *rhizobia*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 274, 3119–3126. https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1187

Kiers, E.T., Rousseau, R.A., West, S.A., Denison, R.F., 2003. Host sanctions and the legume–rhizobium mutualism. Nature 425, 78–81. https://doi.org/10.1038/nature01931

Kim, D.H., Kaashyap, M., Rathore, A., Das, R.R., Parupalli, S., Upadhyaya, H.D., Gopalakrishnan, S., Gaur, P.M., Singh, S., Kaur, J., Yasin, M., Varshney, R.K., 2014. Phylogenetic diversity of *Mesorhizobium* in chickpea. J Biosci 39, 513–517. https://doi.org/10.1007/s12038-014-9429-9

Kishinevsky, B.D., Sen, D., Weaver, R.W., 1992. Effect of high root temperature on *Bradyrhizobium*-peanut symbiosis. Plant Soil 143, 275–282. https://doi.org/10.1007/BF00007883

Kochert, G., Stalker, H.T., Gimenes, M., Galgaro, L., Lopes, C.R., Moore, K., 1996. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (*Leguminosae*). American Journal of Botany 83, 1282–1291. https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb13912.x

Kole, C., Williams, P.H., Rimmer, S.R., Osborn, T.C., 2002. Linkage mapping of genes controlling resistance to white rust (*Albugo candida*) in *Brassica rapa* (syn. campestris) and comparative mapping to *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. Genome 45, 22–27. https://doi.org/10.1139/g01-123

Kondorosi, E., Mergaert, P., Kereszt, A., 2013. A Paradigm for Endosymbiotic Life: Cell Differentiation of Rhizobium Bacteria Provoked by Host Plant Factors. Annual Review of Microbiology 67, 611–628. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155630

Krapovickas, A., Gregory, W.C., 1994. Taxonomia Del Genero "*Arachis* (*Leguminosae*)." Bonplandia 8, 1–186.
Krapovickas, A., Gregory, W.C., 2007. Taxonomy of the genus Arachis (*Leguminosae*). Instituto de Botánica del Nordeste.
Krasova-Wade, T., Ndoye, I., Braconnier, S., Sarr, B., Lajudie, P. de, Neyra, M., 2003. Diversity of indigeneous *bradyrhizobia* associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) grown under limited and favorable water conditions in Senegal (West Africa). African Journal of Biotechnology 2, 13–22. https://doi.org/10.4314/ajb.v2i1.14810
Krasova-Wade, T., Ndoye, I., Braconnier, S., Sarr, B., Lajudie, P. de, Neyra, M., 2003. Diversity of indigeneous *bradyrhizobia* associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) grown under limited and favorable water conditions in Senegal (West Africa). African Journal of Biotechnology 2, 13–22. https://doi.org/10.4314/ajb.v2i1.14810
Kueneman, E.A., Root, W.R., Dashiell, K.E., Hohenberg, J., 1984. Breeding soybeans for the tropics capable of nodulating effectively with indigenous Rhizobium spp. Plant Soil 82, 387–396. https://doi.org/10.1007/BF02184276
Kulkarni, S., Surange, S., Shekhar Nautiyal, C., 2000. Crossing the Limits of Rhizobium Existence in Extreme Conditions. Curr Microbiol 41, 402–409. https://doi.org/10.1007/s002840010158
Kundu, A., DasGupta, M., 2018. Silencing of Putative Cytokinin Receptor Histidine Kinase1 Inhibits Both Inception and Differentiation of Root Nodules in *Arachis hypogaea*. Mol. Plant Microbe Interact. 31, 187–199. https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0144-R
Kunert, K.J., Vorster, B.J., Fenta, B.A., Kibido, T., Dionisio, G., Foyer, C.H., 2016. Drought Stress Responses in Soybean Roots and Nodules. Frontiers in Plant Science 7.
Kung, F.H., Bey, C.F., 1977. Heritability construction for provenance and family selection.
Kvien, C.S., Ham, G.E., Lambert, J.W., 1981. Recovery of Introduced *Rhizobium japonicum* Strains by Soybean Genotypes.
Kyei-Boahen, S., Slinkard, A.E., Walley, F.L., 2002. Evaluation of Rhizobial Inoculation Methods for Chickpea. Agronomy Journal 94, 851–859. https://doi.org/10.2134/agronj2002.8510
Laranjo, M., Oliveira, S., 2011. Tolerance of *Mesorhizobium* type strains to different environmental stresses. Antonie van Leeuwenhoek 99, 651–662. https://doi.org/10.1007/s10482-010-9539-9
Layzell, D.B., 2000. Oxygen Regulation and Adenylates in Legume Nodules, in: Pedrosa, F.O., Hungria, M., Yates, G., Newton, W.E. (Eds.), Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity, Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 367–368. https://doi.org/10.1007/0-306-47615-0_196
Lea, P.J., 1997. 7 - Primary Nitrogen Metabolism, in: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), Plant Biochemistry. Academic Press, London, pp. 273–313. https://doi.org/10.1016/B978-012214674-9/50008-4
Leal-Bertioli, S., Shirasawa, K., Abernathy, B., Moretzsohn, M., Chavarro, C., Clevenger, J., Ozias-Akins, P., Jackson, S., Bertioli, D., 2015. Tetrasomic Recombination Is Surprisingly Frequent in Allotetraploid *Arachis*. Genetics 199, 1093–1105. https://doi.org/10.1534/genetics.115.174607
Leal-Bertioli, S.C.M., Moretzsohn, M.C., Santos, S.P., Brasileiro, A.C.M., Guimarães, P.M., Bertioli, D.J., Araujo, A.C.G., 2017. Phenotypic effects of allotetraploidization of wild *Arachis* and their implications for peanut domestication. American Journal of Botany 104, 379–388. https://doi.org/10.3732/ajb.1600402
Li, X., Zheng, J., Yang, Y., Liao, H., 2018. INCREASING NODULE SIZE1 Expression Is Required for Normal Rhizobial Symbiosis and Nodule Development. Plant Physiology 178, 1233–1248. https://doi.org/10.1104/pp.18.01018
Liu, J., Yang, S., Zheng, Q., Zhu, H., 2014. Identification of a dominant gene in *Medicago truncatula* that restricts nodulation by Sinorhizobium meliloti strain Rm41. BMC Plant Biol 14, 167. https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-167
Liu, J., Yu, X., Qin, Q., Dinkins, R.D., Zhu, H., 2020. The Impacts of Domestication and Breeding on Nitrogen Fixation Symbiosis in Legumes. Frontiers in Genetics 11, 973. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00973
Liu, W., Li, Y., Tomasetto, F., Yan, W., Tan, Z., Liu, J., Jiang, J., 2022. Non-destructive Measurements of Toona sinensis Chlorophyll and Nitrogen Content Under Drought Stress Using Near Infrared Spectroscopy. Frontiers in Plant Science 12.

Liu, Y., Wu, L., Baddeley, J.A., Watson, C.A., 2011. Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. Agronomy Sust. Developm. 31, 155–172. https://doi.org/10.1051/agro/2010008
Liyanage, D.K., Torkamaneh, D., Belzile, F., Balasubramanian, P., Hill, B., Thilakarathna, M.S., 2023. The Genotypic Variability among Short-Season Soybean Cultivars for Nitrogen Fixation under Drought Stress. Plants (Basel) 12, 1004. https://doi.org/10.3390/plants12051004
Lu, Q., Li, H., Hong, Y., Zhang, G., Wen, S., Li, X., Zhou, G., Li, S., Liu, Hao, Liu, Haiyan, Liu, Z., Varshney, R.K., Chen, X., Liang, X., 2018. Genome Sequencing and Analysis of the Peanut B-Genome Progenitor (*Arachis ipaensis*). Front. Plant Sci. 9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00604
Lu, X., Xiong, Q., Cheng, T., Li, Q.-T., Liu, X.-L., Bi, Y.-D., Li, W., Zhang, W.-K., Ma, B., Lai, Y.-C., Du, W.-G., Man, W.-Q., Chen, S.-Y., Zhang, J.-S., 2017. A PP2C-1 Allele Underlying a Quantitative Trait Locus Enhances Soybean 100-Seed Weight. Mol Plant 10, 670–684. https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.03.006
Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S., Ronson, C.W., James, E.K., Stougaard, J., 2010. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. Nat Commun 1, 10. https://doi.org/10.1038/ncomms1009
Magori, S., Kawaguchi, M., 2009. Long-distance control of nodulation: Molecules and models. Mol Cells 27, 129–134. https://doi.org/10.1007/s10059-009-0016-0
Mallikarjuna, N., Senthilvel, S., Hoisington, D., 2011. Development of new sources of tetraploid *Arachis* to broaden the genetic base of cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Genet Resour Crop Evol 58, 889–907. https://doi.org/10.1007/s10722-010-9627-8
Marsh, J.F., Rakocevic, A., Mitra, R.M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S.R., Schultze, M., Ratet, P., Oldroyd, G.E.D., 2007. *Medicago truncatula* NIN Is Essential for Rhizobial-Independent Nodule Organogenesis Induced by Autoactive Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase. Plant Physiology 144, 324–335. https://doi.org/10.1104/pp.106.093021
Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet.journal 17, 10–12. https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200
Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J., 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends in Microbiology 17, 458–466. https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004
McClintock, N.C., Diop, A.M., 2005. Soil Fertility Management and Compost Use in Senegal's Peanut Basin. International Journal of Agricultural Sustainability 3, 79–91. https://doi.org/10.1080/14735903.2005.9684746
McDermott, T.R., Graham, P.H., 1989. *Bradyrhizobium japonicum* Inoculant Mobility, Nodule Occupancy, and Acetylene Reduction in the Soybean Root System. Applied and Environmental Microbiology 55, 2493–2498. https://doi.org/10.1128/aem.55.10.2493-2498.1989
McKay, I.A., Djordjevic, M.A., 1993. Production and Excretion of Nod Metabolites by Rhizobium leguminosarum bv. trifolii Are Disrupted by the Same Environmental Factors That Reduce Nodulation in the Field. Applied and Environmental Microbiology 59, 3385–3392. https://doi.org/10.1128/aem.59.10.3385-3392.1993
Medeot, D.B., Bueno, M.A., Dardanelli, M.S., de Lema, M.G., 2007. Adaptational Changes in Lipids of *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 Nodulating Peanut as a Response to Growth Temperature and Salinity. Curr Microbiol 54, 31–35. https://doi.org/10.1007/s00284-006-0233-0
Mendiburu, F. de, 2023. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research.
Mercante, F.M., Otsubo, A.A., Brito, O.R., 2017. New Native *Rhizobia* Strains for Inoculation of Common Bean in the Brazilian Savanna. Rev. Bras. Ciênc. Solo 41, e0150120. https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20150120
Michiels, J., Verreth, C., Vanderleyden, J., 1994. Effects of Temperature Stress on Bean-Nodulating Rhizobium Strains. Applied and Environmental Microbiology 60, 1206–1212. https://doi.org/10.1128/aem.60.4.1206-1212.1994
Min, M., Lee, W.S., 2005. Determination of significant wavelengths and prediction of nitrogen content for citrus. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers 48, 455–461.
Minton, N.A., Baujard, P., 1990. Nematode parasites of peanut. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 285–320.

Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E.D., Long, S.R., 2004. From The Cover: A Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. Proceedings of the National Academy of Sciences 101, 4701–4705. https://doi.org/10.1073/pnas.0400595101

Mokgehle, S.N., Dakora, F.D., Mathews, C., 2014. Variation in N2 fixation and N contribution by 25 groundnut (*Arachis hypogaea* L.) varieties grown in different agro-ecologies, measured using 15N natural abundance. Agriculture, Ecosystems & Environment 195, 161–172. https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.05.014

Monforte, A.J., Tanksley, S.D., 2000. Fine mapping of a quantitative trait locus (QTL) from *Lycopersicon hirsutum* chromosome 1 affecting fruit characteristics and agronomic traits: breaking linkage among QTL affecting different traits and dissection of heterosis for yield. Theor Appl Genet 100, 471–479. https://doi.org/10.1007/s001220050061

Moretzsohn, M.C., Gouvea, E.G., Inglis, P.W., Leal-Bertioli, S.C.M., Valls, J.F.M., Bertioli, D.J., 2013. A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers. Ann Bot 111, 113–126. https://doi.org/10.1093/aob/mcs237

Morgan, E.R., Manwell, J.F., McGowan, J.G., 2017. Sustainable Ammonia Production from U.S. Offshore Wind Farms: A Techno-Economic Review. ACS Sustainable Chem. Eng. 5, 9554–9567. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02070

Morgante, C., Angelini, J., Castro, S., Fabra, A., 2005. Role of rhizobial exopolysaccharides in crack entry/intercellular infection of peanut. Soil Biology and Biochemistry 37, 1436–1444. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.12.014

Morgante, C., Castro, S., Fabra, A., 2007. Role of rhizobial EPS in the evasion of peanut defense response during the crack-entry infection process. Soil Biology and Biochemistry 39, 1222–1225. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.11.022

Mostasso, L., Mostasso, F.L., Dias, B.G., Vargas, M.A.T., Hungria, M., 2002. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. Field Crops Research 73, 121–132. https://doi.org/10.1016/S0378-4290(01)00186-1

Mousavi, S.A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P., Lindström, K., 2014. Phylogeny of the Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov. Systematic and Applied Microbiology 37, 208–215. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007

Mpepereki, S., Javaheri, F., Davis, P., Giller, K.E., 2000. Soyabeans and sustainable agriculture: Promiscuous soyabeans in southern Africa. Field Crops Research 65, 137–149. https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00083-0

Muñoz, N., Liu, A., Kan, L., Li, M.-W., Lam, H.-M., 2017. Potential Uses of Wild Germplasms of Grain Legumes for Crop Improvement. International Journal of Molecular Sciences 18, 328. https://doi.org/10.3390/ijms18020328

Muñoz, N., Qi, X., Li, M.-W., Xie, M., Gao, Y., Cheung, M.-Y., Wong, F.-L., Lam, H.-M., 2016. Improvement in nitrogen fixation capacity could be part of the domestication process in soybean. Heredity 117, 84–93. https://doi.org/10.1038/hdy.2016.27

Muñoz, V., Ibáñez, F., Tordable, M., Megías, M., Fabra, A., 2015. Role of reactive oxygen species generation and Nod factors during the early symbiotic interaction between *bradyrhizobia* and peanut, a legume infected by crack entry. Journal of Applied Microbiology 118, 182–192. https://doi.org/10.1111/jam.12669

Murray, J.D., Karas, B.J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., Szczyglowski, K., 2007. A cytokinin perception mutant colonized by Rhizobium in the absence of nodule organogenesis. Science 315, 101–104. https://doi.org/10.1126/science.1132514

Murray, J.D., Liu, C.-W., Chen, Y., Miller, A.J., 2017. Nitrogen sensing in legumes. Journal of Experimental Botany 68, 1919–1926. https://doi.org/10.1093/jxb/erw405

Mus, F., Crook, M.B., Garcia, K., Costas, A.G., Geddes, B.A., Kouri, E.D., Paramasivan, P., Ryu, M.-H., Oldroyd, G.E.D., Poole, P.S., Udvardi, M.K., Voigt, C.A., Ané, J.-M., Peters, J.W., 2016. Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. Appl. Environ. Microbiol. 82, 3698–3710. https://doi.org/10.1128/AEM.01055-16

Mutch, L.A., Young, J.P.W., 2004. Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on wild and cultivated legumes. Molecular Ecology 13, 2435–2444. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02259.x

Nagata, T., Takebe, I., 1970. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. Planta 92, 301–308. https://doi.org/10.1007/BF00385097

Nagy, E.D., Chu, Y., Guo, Y., Khanal, S., Tang, S., Li, Y., Dong, W.B., Timper, P., Taylor, C., Ozias-Akins, P., Corley Holbrook, C., Beilinson, V., Nielsen, N.C., Thomas Stalker, H., Knapp, S.J., 2010. Recombination is suppressed in an alien introgression in peanut harboring Rma, a dominant root-knot nematode resistance gene. Mol Breeding 26, 357–370. https://doi.org/10.1007/s11032-010-9430-4

Nguepjop, J.R., 2016. Contribution des espèces sauvages à l'analyse génétique et à l'amélioration variétale de l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.). Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar.

Nguepjop, J.R., Tossim, H.-A., Bell, J.M., Rami, J.-F., Sharma, S., Courtois, B., Mallikarjuna, N., Sane, D., Fonceka, D., 2016. Evidence of Genomic Exchanges between Homeologous Chromosomes in a Cross of Peanut with Newly Synthetized Allotetraploid Hybrids. Front. Plant Sci. 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01635

Nguepjop, J.R., Tossim, H.-A., Bell, J.M., Rami, J.-F., Sharma, S., Courtois, B., Mallikarjuna, N., Sane, D., Fonceka, D., 2016. Evidence of Genomic Exchanges between Homeologous Chromosomes in a Cross of Peanut with Newly Synthetized Allotetraploid Hybrids. Front. Plant Sci. 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01635

Nguyen, N.T., Nakabayashi, K., Mohapatra, P.K., Thompson, J., Fujita, K., 2003. Effect of nitrogen deficiency on biomass production, photosynthesis, carbon partitioning, and nitrogen nutrition status of Melaleuca and Eucalyptus species. Soil Science and Plant Nutrition 49, 99–109. https://doi.org/10.1080/00380768.2003.10409985

Ni, H., Peng, Y., Wang, Jinhui, Wang, Jing, Yuan, Y., Fu, T., Zhu, Z., Zhang, J., Pan, X., Cui, Z., Liu, C., Chen, Q., Xin, D., 2022. Mapping of Quantitative Trait Loci Underlying Nodule Traits in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and Identification of Genes Whose Expression Is Affected by the *Sinorhizobium fredii* HH103 Effector Proteins NopL and NopT. Agronomy 12, 946. https://doi.org/10.3390/agronomy12040946

Nicolás, M.F., Hungria, M., Arias, C.A.A., 2006. Identification of quantitative trait loci controlling nodulation and shoot mass in progenies from two Brazilian soybean cultivars. Field Crops Research 95, 355–366. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.04.012

Nigam, S.N., 2014. Groundnut at a glance.

Nigam, S.N., Dwivedi, S.L., Nambiar, P.T.C., Gibbons, R.W., Dart, P.J., 1985. Combining Ability Analysis of N2-Fixation and Related Traits in Peanut. Peanut Science 12, 55–57. https://doi.org/10.3146/pnut.12.2.0001

Nigam, S.N., Prasada Rao, R.D.V.J., Bhatnagar-Mathur, P., Sharma, K.K., 2012. Genetic Management of Virus Diseases in Peanut, in: Janick, J. (Ed.), Plant Breeding Reviews. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 293–356. https://doi.org/10.1002/9781118358566.ch4

Nigam, S.N., Rao, V.R., Gibbons, R.W., 1983. Utilization of Natural Hybrids in the Improvement of Groundnuts. Experimental Agriculture 19, 355–359. https://doi.org/10.1017/S0014479700012825

Noba, K., Ngom, A., Guèye, M., Bassène, C., Kane, M., Diop, I., Ndoye, F., Mbaye, M.S., Kane, A., Ba, A.T., 2014. L'arachide au Sénégal : état des lieux, contraintes et perspectives pour la relance de la filière. OCL 21, D205. https://doi.org/10.1051/ocl/2013039

Nodari, R.O., Tsai, S.M., Guzmán, P., Gilbertson, R.L., Gepts, P., 1993. Toward an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. Genetics 134, 341–350. https://doi.org/10.1093/genetics/134.1.341

Noisangiam, R., Teamtisong, K., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Toshiki, U., Minamisawa, K., Teaumroong, N., 2012. Genetic Diversity, Symbiotic Evolution, and Proposed Infection Process of *Bradyrhizobium* Strains Isolated from Root Nodules of *Aeschynomene americana* L. in Thailand. Appl. Environ. Microbiol. 78, 6236–6250. https://doi.org/10.1128/AEM.00897-12

Nouwen, N., Arrighi, J.-F., Cartieaux, F., Chaintreuil, C., Gully, D., Klopp, C., Giraud, E., 2017. The role of rhizobial (NifV) and plant (FEN1) homocitrate synthases in *Aeschynomene*/photosynthetic *Bradyrhizobium* symbiosis. Sci Rep 7, 448. https://doi.org/10.1038/s41598-017-00559-0

O'Hara, G.W., 2001. Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review. Aust. J. Exp. Agric. 41, 417–433. https://doi.org/10.1071/ea00087

O'Hara, G.W., Hartzook, A., Bell, R.W., Loneragan, J.F., 1993. Differences between *Bradyrhizobium* strains NC92 and TAL1000 in their nodulation and nitrogen fixation with peanut in iron deficient soil. Plant Soil 155, 333–336. https://doi.org/10.1007/BF00025050

Ohlson, E.W., Seido, S.L., Mohammed, S., Santos, C.A.F., Timko, M.P., 2018. QTL Mapping of Ineffective Nodulation and Nitrogen Utilization-Related Traits in the IC-1 Mutant of Cowpea. Crop Science 58, 264–272. https://doi.org/10.2135/cropsci2017.07.0439

Oka-Kira, E., Kawaguchi, M., 2006. Long-distance signaling to control root nodule number. Current Opinion in Plant Biology, Cell signalling and gene regulation / edited by Joseph Kieber and Takashi Araki 9, 496–502. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.07.012

Okazaki, S., Kaneko, T., Sato, S., Saeki, K., 2013. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. Proc Natl Acad Sci USA 110, 17131–17136. https://doi.org/10.1073/pnas.1302360110

Okazaki, S., Tittabutr, P., Teulet, A., Thouin, J., Fardoux, J., Chaintreuil, C., Gully, D., Arrighi, J.-F., Furuta, N., Miwa, H., Yasuda, M., Nouwen, N., Teaumroong, N., Giraud, E., 2016. Rhizobium–legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. The ISME Journal 10, 64–74. https://doi.org/10.1038/ismej.2015.103

Okito, A., Alves, B.R.J., Urquiaga, S., Boddey, R.M., 2004. Isotopic fractionation during N2 fixation by four tropical legumes. Soil Biology and Biochemistry 7, 1179–1190. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.03.004

Oldroyd, G.E.D., 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. Nat. Rev. Microbiol. 11, 252–263. https://doi.org/10.1038/nrmicro2990

Oldroyd, G.E.D., Downie, J.A., 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. Annu Rev Plant Biol 59, 519–546. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839

Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S., Downie, J.A., 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. Annu. Rev. Genet. 45, 119–144. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549

Olivera, M., Tejera, N., Iribarne, C., Ocaña, A., Lluch, C., 2004. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. Physiologia Plantarum 121, 498–505. https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.00355.x

Oono, R., Anderson, C.G., Denison, R.F., 2011. Failure to fix nitrogen by non-reproductive symbiotic *rhizobia* triggers host sanctions that reduce fitness of their reproductive clonemates. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 278, 2698–2703. https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2193

Oono, R., Denison, R.F., Kiers, E.T., 2009. Controlling the reproductive fate of *rhizobia*: how universal are legume sanctions? New Phytologist 183, 967–979. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02941.x

Ormeño-Orrillo, E., Gomes, D.F., del Cerro, P., Vasconcelos, A.T.R., Canchaya, C., Almeida, L.G.P., Mercante, F.M., Ollero, F.J., Megías, M., Hungria, M., 2016. Genome of *Rhizobium leucaenae* strains CFN 299T and CPAO 29.8: searching for genes related to a successful symbiotic performance under stressful conditions. BMC Genomics 17, 534. https://doi.org/10.1186/s12864-016-2859-z

Ortiz-Barbosa, G.S., Torres-Martínez, L., Manci, A., Neal, S., Soubra, T., Khairi, F., Trinh, J., Cardenas, P., Sachs, J.L., 2022. No disruption of rhizobial symbiosis during early stages of cowpea domestication. Evolution 76, 496–511. https://doi.org/10.1111/evo.14424

Ortiz, A.M., Robledo, G., Seijo, G., Valls, J.F.M., Lavia, G.I., 2017. Cytogenetic evidences on the evolutionary relationships between the tetraploids of the section Rhizomatosae and related diploid species (*Arachis*, *Leguminosae*). J Plant Res 130, 791–807. https://doi.org/10.1007/s10265-017-0949-x

Ott, T., van Dongen, J.T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., Udvardi, M.K., 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. Curr. Biol. 15, 531–535. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.042

Padhi, S.R., John, R., Bartwal, A., Tripathi, K., Gupta, K., Wankhede, D.P., Mishra, G.P., Kumar, S., Rana, J.C., Riar, A., Bhardwaj, R., 2022. Development and optimization of NIRS prediction models for simultaneous multi-trait assessment in diverse cowpea germplasm. Frontiers in Nutrition 9.

Pampana, S., Masoni, A., Arduini, I., 2016. Grain legumes differ in nitrogen accumulation and remobilisation during seed filling. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science 66, 127–132. https://doi.org/10.1080/09064710.2015.1080854

Pandey, M.K., Agarwal, G., Kale, S.M., Clevenger, J., Nayak, S.N., Sriswathi, M., Chitikineni, A., Chavarro, C., Chen, X., Upadhyaya, H.D., Vishwakarma, M.K., Leal-Bertioli, S., Liang, X., Bertioli, D.J., Guo, B., Jackson, S.A., Ozias-Akins, P., Varshney, R.K., 2017. Development and Evaluation of a High Density Genotyping 'Axiom_*Arachis*' Array with 58 K SNPs for Accelerating Genetics and Breeding in Groundnut. Sci Rep 7, 40577. https://doi.org/10.1038/srep40577

Pandey, M.K., Monyo, E., Ozias-Akins, P., Liang, X., Guimarães, P., Nigam, S.N., Upadhyaya, H.D., Janila, P., Zhang, X., Guo, B., Cook, D.R., Bertioli, D.J., Michelmore, R., Varshney, R.K., 2012. Advances in *Arachis* genomics for peanut improvement. Biotechnology Advances 30, 639–651. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.001

Patel, H., Ewels, P., Peltzer, A., Hammarén, R., Botvinnik, O., Sturm, G., Moreno, D., Vemuri, P., silviamorins, Pantano, L., FriederikeHanssen, Garcia, M., rfenouil, marchoeppner, Zhou, P., Gabernet, G., Straub, D., F, S., bot, nf-core, Panneerselvam, S., OMeally, D., jun-wan, Mayer, A., Lennard, K., Tommaso, P.D., Haglund, S., mashehu, Anil, A., Alneberg, J., Davenport, C., 2020. nf-core/rnaseq: nf-core/rnaseq v3.0 - Silver Shark. https://doi.org/10.5281/zenodo.4323183

Patra, D., Mandal, S., 2022. Nod–factors are dispensable for nodulation: A twist in *bradyrhizobia*-legume symbiosis. Symbiosis 86, 1–15. https://doi.org/10.1007/s13199-021-00826-9

Patro, R., Duggal, G., Love, M.I., Irizarry, R.A., Kingsford, C., 2017. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. Nat Methods 14, 417–419. https://doi.org/10.1038/nmeth.4197

Peng, Z., Chen, H., Tan, L., Shu, H., Varshney, R.K., Zhou, Z., Zhao, Z., Luo, Z., Chitikineni, A., Wang, L., Maku, J., López, Y., Gallo, M., Zhou, H., Wang, J., 2021. Natural polymorphisms in a pair of NSP2 homoeologs can cause loss of nodulation in peanut. Journal of Experimental Botany 72, 1104–1118. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa505

Peng, Z., Liu, F., Wang, L., Zhou, H., Paudel, D., Tan, L., Maku, J., Gallo, M., Wang, J., 2017. Transcriptome profiles reveal gene regulation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) nodulation. Sci Rep 7, 1–12. https://doi.org/10.1038/srep40066

Peng, Z., Liu, F., Wang, L., Zhou, H., Paudel, D., Tan, L., Maku, J., Gallo, M., Wang, J., 2017. Transcriptome profiles reveal gene regulation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) nodulation. Scientific Reports 7, 40066. https://doi.org/10.1038/srep40066

Peng, Z., Tan, L., Lopez, Y., Maku, J., Liu, F., Zhou, H., Tseng, Y.-C., Yang, X., Hsieh, Y., Song, J., Wang, L., Tillman, B., Gallo, M., Wang, J., 2018. Morphological and Genetic Characterization of Non-Nodulating Peanut Recombinant Inbred Lines. Crop Science 58. https://doi.org/10.2135/cropsci2017.06.0235

Peoples, M.B., Brockwell, J., Herridge, D.F., Rochester, I.J., Alves, B.J.R., Urquiaga, S., Boddey, R.M., Dakora, F.D., Bhattarai, S., Maskey, S.L., Sampet, C., Rerkasem, B., Khan, D.F., Hauggaard-Nielsen, H., Jensen, E.S., 2009a. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. Symbiosis 48, 1–17. https://doi.org/10.1007/BF03179980

Peoples, M.B., Pate, J.S., Atkins, C.A., 1983. Mobilization of Nitrogen in Fruiting Plants of a Cultivar of Cowpea. Journal of Experimental Botany 34, 563–578.

Peoples, M.B., Unkovich, M.J., Herridge, D.F., 2009b. Measuring Symbiotic Nitrogen Fixation by Legumes, in: Nitrogen Fixation in Crop Production. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 125–170. https://doi.org/10.2134/agronmonogr52.c6

Pérez-Jaramillo, J.E., Mendes, R., Raaijmakers, J.M., 2016. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. Plant Mol. Biol. 90, 635–644. https://doi.org/10.1007/s11103-015-0337-7

Perkins, S.K., Peters, G.A., 1993. The Azolla-Anabaena Symbiosis: Endophyte Continuity in the Azolla Life- Cycle is Facilitated by Epidermal Trichomes. I. Partitioning of the Endophytic Anabaena into Developing Sporocarps. The New Phytologist 123, 53–64.

Peters, G.A., Meeks, J.C., 1989. The Azolla-Anabaena Symbiosis: Basic Biology 40, 193–210.

Phillips, T.D., Wynne, J.C., Elkan, G.H., Schneeweis, T.J., 1989. Inheritance of Symbiotic Nitrogen Fixation in Two Peanut Crosses1. Peanut Science 16, 66–70. https://doi.org/10.3146/i0095-3679-16-2-2

Phudenpa, A., Jogloy, S., Toomsan, B., Wongkaew, S., Kesmala, T., Patanothai, A., 2006. Combining ability analysis for traits related to N2-fixation and agronomic traits in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Songklanakarin Journal of Science and Technology 28.

Pierre, O., Engler, G., Hopkins, J., Brau, F., Boncompagni, E., Hérouart, D., 2013. Peribacteroid space acidification: a marker of mature bacteroid functioning in *Medicago truncatula* nodules. Plant, Cell & Environment 36, 2059–2070. https://doi.org/10.1111/pce.12116

Pimratch, S., Jogloy, S., Toomsan, B., Jaisil, P., Kesmala, T., Patanothai, A., 2004a. Heritability and correlation for nitrogen fixation and agronomic traits of peanut (*Arachis hypogaea* L.) 26, 11.

Pimratch, S., Jogloy, S., Toomsan, B., Jaisil, P., Sikhinarum, J., Kesmala, T., Aran Patanothai (Khon Kaen Univ., K.K. (Thailand) F. of A.D. of A., 2004b. Evaluation of seven peanut genotypes for nitrogen fixation and agronomic traits. Warasan Songkhlanakharin.

Pimratch, S., Jogloy, S., Vorasoot, N., Toomsan, B., Kesmala, T., Patanothai, A., Holbrook, C.C., 2008. Effect of drought stress on traits related to N2 fixation in eleven peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes differing in degrees of resistance to drought. Asian journal of plant sciences 7, 334–342.

Plet, J., Wasson, A., Ariel, F., Le Signor, C., Baker, D., Mathesius, U., Crespi, M., Frugier, F., 2011. MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. The Plant Journal 65, 622–633. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04447.x

Polania, J., Poschenrieder, C., Rao, I., Beebe, S., 2016. Estimation of phenotypic variability in symbiotic nitrogen fixation ability of common bean under drought stress using 15N natural abundance in grain. European Journal of Agronomy 79, 66–73. https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.05.014

Porter, S.S., Sachs, J.L., 2020. Agriculture and the Disruption of Plant–Microbial Symbiosis. Trends in Ecology & Evolution 35, 426–439. https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.01.006

Pracht, J.E., Nickell, C.D., Harper, J.E., Bullock, D.G., 1994. Agronomic Evaluation of Non-Nodulating and Hypernodulating Mutants of Soybean. Crop Science 34, 738–740. https://doi.org/10.2135/cropsci1994.0011183X003400030025x

Prananto, J.A., Minasny, B., Weaver, T., 2021. Rapid and cost-effective nutrient content analysis of cotton leaves using near-infrared spectroscopy (NIRS). PeerJ 9, e11042. https://doi.org/10.7717/peerj.11042

Provorov, N.A., Tikhonovich, I.A., 2003. Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-*rhizobia* symbiosis. Genetic Resources and Crop Evolution 50, 89–99. https://doi.org/10.1023/A:1022957429160

Pueppke, S.G., Broughton, W.J., 1999. *Rhizobium* sp. Strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 Share Exceptionally Broad, Nested Host Ranges. MPMI 12, 293–318. https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.4.293

Pulver, E.L., Brockman, F., Wien, H.C., 1982. Nodulation of Soybean Cultivars with *Rhizobium* spp. and their Response to Inoculation with R. japonicum1. Crop Science 22, cropsci1982.0011183X002200050042x.https://doi.org/10.2135/cropsci1982.0011183X002200050042x

Purcell, L.C., King, C.A., 1996. Drought and nitrogen source effects on nitrogen nutrition, seed growth, and yield in soybean. Journal of Plant Nutrition 19, 969–993. https://doi.org/10.1080/01904169609365173

Qiao, Y., Tang, C., Han, X., Miao, S., 2007. Phosphorus Deficiency Delays the Onset of Nodule Function in Soybean. Journal of Plant Nutrition 30, 1341–1353. https://doi.org/10.1080/01904160701555325

Qin, L., Zhao, J., Tian, J., Chen, L., Sun, Z., Guo, Y., Lu, X., Gu, M., Xu, G., Liao, H., 2012. The High-Affinity Phosphate Transporter GmPT5 Regulates Phosphate Transport to Nodules and Nodulation in Soybean. Plant Physiology 159, 1634–1643. https://doi.org/10.1104/pp.112.199786

Quilbé, J., Lamy, L., Brottier, L., Leleux, P., Fardoux, J., Rivallan, R., Benichou, T., Guyonnet, R., Becana, M., Villar, I., Garsmeur, O., Hufnagel, B., Delteil, A., Gully, D., Chaintreuil, C., Pervent, M., Cartieaux, F., Bourge, M., Valentin, N., Martin, G., Fontaine, L., Droc, G., Dereeper, A., Farmer, A., Libourel, C., Nouwen, N., Gressent, F., Mournet, P., D'Hont, A., Giraud, E., Klopp, C., Arrighi, J.-F., 2021. Genetics of nodulation in *Aeschynomene evenia* uncovers mechanisms of the rhizobium–legume symbiosis. Nat Commun 12, 829. https://doi.org/10.1038/s41467-021-21094-7

Quilbé, J., Montiel, J., Arrighi, J.-F., Stougaard, J., 2022. Molecular Mechanisms of Intercellular Rhizobial Infection: Novel Findings of an Ancient Process. Frontiers in Plant Science 13.

Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E.M., Albrektsen, A.S., James, E.K., Thirup, S., Stougaard, J., 2007. LysM domains mediate lipochitin–oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. The EMBO Journal 26, 3923–3935. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601826

Ramaekers, L., Galeano, C.H., Garzón, N., Vanderleyden, J., Blair, M.W., 2013. Identifying quantitative trait loci for symbiotic nitrogen fixation capacity and related traits in common bean. Mol Breeding 31, 163–180. https://doi.org/10.1007/s11032-012-9780-1

Ratu, S.T.N., Amelia, L., Okazaki, S., 2023. Type III effector provides a novel symbiotic pathway in legume–*rhizobia* symbiosis. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 87, 28–37. https://doi.org/10.1093/bbb/zbac178

Raul, B., Bhattacharjee, O., Ghosh, A., Upadhyay, P., Tembhare, K., Singh, A., Shaheen, T., Ghosh, A.K., Torres-Jerez, I., Krom, N., Clevenger, J., Udvardi, M., Scheffler, B.E., Ozias-Akins, P., Sharma, R.D., Bandyopadhyay, K., Gaur, V., Kumar, S., Sinharoy, S., 2022. Microscopic and Transcriptomic Analyses of Dalbergoid Legume Peanut Reveal a Divergent Evolution Leading to Nod-Factor-Dependent Epidermal Crack-Entry and Terminal Bacteroid Differentiation. MPMI 35, 131–145. https://doi.org/10.1094/MPMI-05-21-0122-R

Reddy, D.V.R., 1991. Groundnut viruses and virus diseases: distribution, identification and control. Review of Plant Pathology 70, 665–678.

Redmond, J.W., Batley, M., Djordjevic, M.A., Innes, R.W., Kuempel, P.L., Rolfe, B.G., 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in Rhizobium. Nature 323, 632–635. https://doi.org/10.1038/323632a0

Regus, J.U., Quides, K.W., O'Neill, M.R., Suzuki, R., Savory, E.A., Chang, J.H., Sachs, J.L., 2017. Cell autonomous sanctions in legumes target ineffective *rhizobia* in nodules with mixed infections. American Journal of Botany 104, 1299–1312. https://doi.org/10.3732/ajb.1700165

Regus, J.U., Wendlandt, C.E., Bantay, R.M., Gano-Cohen, K.A., Gleason, N.J., Hollowell, A.C., O'Neill, M.R., Shahin, K.K., Sachs, J.L., 2017. Nitrogen deposition decreases the benefits of symbiosis in a native legume. Plant Soil 414, 159–170. https://doi.org/10.1007/s11104-016-3114-8

Ritchie, H., Roser, M., Rosado, P., 2022. Fertilizers. Our World in Data.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26, 139–140. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616

Robledo, G., Lavia, G.I., Seijo, G., 2009. Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. Theor Appl Genet 118, 1295–1307. https://doi.org/10.1007/s00122-009-0981-x

Robledo, G., Seijo, G., 2010. Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section Arachis) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: a new proposal for genome arrangement. Theor Appl Genet 121, 1033–1046. https://doi.org/10.1007/s00122-010-1369-7

Rogel, M.A., Ormeño-Orrillo, E., Martinez Romero, E., 2011. Symbiovars in *rhizobia* reflect bacterial adaptation to legumes. Systematic and Applied Microbiology 34, 96–104. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.015

Roy, S., Liu, W., Nandety, R.S., Crook, A., Mysore, K.S., Pislariu, C.I., Frugoli, J., Dickstein, R., Udvardi, M.K., 2020. Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. The Plant Cell 32, 15–41. https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279

Roy, S., Liu, W., Nandety, R.S., Crook, A., Mysore, K.S., Pislariu, C.I., Frugoli, J., Dickstein, R., Udvardi, M.K., 2020. Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. The Plant Cell 32, 15–41. https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279

Sachs, J.L., Ehinger, M.O., Simms, E.L., 2010. Origins of cheating and loss of symbiosis in wild *Bradyrhizobium*. Journal of Evolutionary Biology 23, 1075–1089. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.01980.x

Sadowsky, M., Keyser, H.H., BOHLOOL, B.B., 1983. Biochemical Characterization of Fast- and Slow-Growing *Rhizobia* That Nodulate Soybeans. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 33, 716–722. https://doi.org/10.1099/00207713-33-4-716

Sahrawat, K.L., Srinivasa Rao, B., Nambiar, P.T.C., 1988. Macro- and micronutrient uptake by nodulating and non-nodulating peanut lines. Plant Soil 109, 291–293. https://doi.org/10.1007/BF02202099

Sanchez, P.A., 2002. Soil Fertility and Hunger in Africa. Science 295, 2019–2020. https://doi.org/10.1126/science.1065256

Sandal, N., Jin, H., Rodriguez-Navarro, D.N., Temprano, F., Cvitanich, C., Brachmann, A., Sato, S., Kawaguchi, M., Tabata, S., Parniske, M., Ruiz-Sainz, J.E., Andersen, S.U., Stougaard, J., 2012. A Set of *Lotus japonicus* Gifu × *Lotus burttii* Recombinant Inbred Lines Facilitates Map-based Cloning and QTL Mapping. DNA Research 19, 317–323. https://doi.org/10.1093/dnares/dss014

Santos, M.A. dos, Nicolás, M.F., Hungria, M., 2006. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* soja. Pesquisa Agropecuária Brasileira 41, 67–75. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006000100010

Santos, M.A., Geraldi, I.O., Garcia, A.A.F., Bortolatto, N., Schiavon, A., Hungria, M., 2013. Mapping of QTL associated with biological nitrogen fixation traits in soybean. Hereditas 150, 17–25. https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2013.02275.x

Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., Stougaard, J., 1999. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. Nature 402, 191–195. https://doi.org/10.1038/46058

Seefeldt, L.C., Hoffman, B.M., Dean, D.R., 2009. Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. Annu. Rev. Biochem. 78, 701–722. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.070907.103812

Seijo, G., Lavia, G.I., Fernández, A., Krapovickas, A., Ducasse, D.A., Bertioli, D.J., Moscone, E.A., 2007. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, *Leguminosae*) and its close relatives revealed by double GISH. Am J Bot 94, 1963–1971. https://doi.org/10.3732/ajb.94.12.1963

Seijo, G.J., Atahuachi, M., Simpson, C.E., Krapovickas, A., Seijo, G.J., Atahuachi, M., Simpson, C.E., Krapovickas, A., 2021. *Arachis inflata*: una nueva especie de Arachis (*Fabaceae*) del Genoma B. Bonplandia 30, 169–174. https://doi.org/10.30972/bon.3024942

Seneviratne, G., Van Holm, L.H.J., Ekanayake, E.M.H.G.S., 2000. Agronomic benefits of rhizobial inoculant use over nitrogen fertilizer application in tropical soybean. Field Crops Research 68, 199–203. https://doi.org/10.1016/S0378-4290(00)00123-4

Serraj, R., Sinclair, T.R., Purcell, L.C., 1999. Symbiotic N2 fixation response to drought. Journal of Experimental Botany 50, 143–155. https://doi.org/10.1093/jxb/50.331.143

Sharma, V., Bhattacharyya, S., Kumar, R., Kumar, A., Ibañez, F., Wang, J., Guo, B., Sudini, H.K., Gopalakrishnan, S., DasGupta, M., Varshney, R.K., Pandey, M.K., 2020. Molecular Basis of Root Nodule Symbiosis between *Bradyrhizobium* and 'Crack-Entry' Legume Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Plants 9, 276. https://doi.org/10.3390/plants9020276

Shen, L., Courtois, B., McNally, K.L., Robin, S., Li, Z., 2001. Evaluation of near-isogenic lines of rice introgressed with QTL for root depth through marker-aided selection. Theoretical and Applied Genetics 103, 75.

Shu, H., Luo, Z., Peng, Z., Wang, J., 2020. The application of CRISPR/Cas9 in hairy roots to explore the functions of AhNFR1 and AhNFR5 genes during peanut nodulation. BMC Plant Biol 20, 417. https://doi.org/10.1186/s12870-020-02614-x

Sidorova, K.K., Shumny, V.K., Glianenko, M.N., Mischenko, T.M., Vlasova, E.Y., Gaeva, T.A., 2005. Expression of the Symbiotic nod4 Pea Gene against Various Genotypic Backgrounds. Russian Journal of Genetics 5, 533–538. https://doi.org/10.1007/s11177-005-0122-9

Sikinarum, J., Jaisil, P., Jogloy, S., Toomsan, B., Kesmala, T., Science, A., 2007. Heritability and correlation for nitrogen (N2) fixation and related traits in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Pak. J. Biol. Sci. 10, 1956–1962. https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.1956.1962

Silvestri, M.C., Ortiz, A.M., Lavia, G.I., 2015. rDNA loci and heterochromatin positions support a distinct genome type for 'x = 9 species' of section Arachis (*Arachis*, *Leguminosae*). Plant Syst Evol 301, 555–562. https://doi.org/10.1007/s00606-014-1092-y

Simsek, S., Ojanen-Reuhs, T., Stephens, S.B., Reuhs, B.L., 2007. Strain-Ecotype Specificity in *Sinorhizobium meliloti-Medicago truncatula* Symbiosis Is Correlated to Succinoglycan Oligosaccharide Structure. Journal of Bacteriology 189, 7733–7740. https://doi.org/10.1128/jb.00739-07

Singh, B., Usha, K., 2003. Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation of Cowpea Genotypes as Affected by Fertilizer Nitrogen. Journal of Plant Nutrition 26, 463–473. https://doi.org/10.1081/PLN-120017147

Singh, Z., Singh, G., 2018. Role of Rhizobium in chickpea (*Cicer arietinum*) production - a review. Agricultural Reviews 39, 31–39.

Singsit, C., Ozias-Akins, P., 1992. Rapid estimation of ploidy levels in in vitro-regenerated interspecific Arachis hybrids and fertile triploids. Euphytica 64, 183–188. https://doi.org/10.1007/BF00046047

Sinharoy, S., DasGupta, M., 2009. RNA Interference Highlights the Role of CCaMK in Dissemination of Endosymbionts in the *Aeschynomeneae* Legume *Arachis*. MPMI 22, 1466–1475. https://doi.org/10.1094/MPMI-22-11-1466

Smartt, J., Gregory, W.C., Gregory, M.P., 1978. The genomes of *Arachis hypogaea*. 1. Cytogenetic studies of putative genome donors. Euphytica 27, 665–675. https://doi.org/10.1007/BF00023701

Soloveichik, G., 2019. Electrochemical synthesis of ammonia as a potential alternative to the Haber–Bosch process. Nat Catal 2, 377–380. https://doi.org/10.1038/s41929-019-0280-0

Somasegaran, P., Hoben, H.J., 1994. Handbook for *Rhizobia*: Methods in Legume-Rhizobium Technology. Springer-Verlag, New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8

Sonah, H., O'Donoughue, L., Cober, E., Rajcan, I., Belzile, F., 2015. Identification of loci governing eight agronomic traits using a GBS-GWAS approach and validation by QTL mapping in soya bean. Plant Biotechnology Journal 13, 211–221. https://doi.org/10.1111/pbi.12249

Songwattana, P., Chaintreuil, C., Wongdee, J., Teulet, A., Mbaye, M., Piromyou, P., Gully, D., Fardoux, J., Zoumman, A.M.A., Camuel, A., Tittabutr, P., Teaumroong, N., Giraud, E., 2021. Identification of type III effectors modulating the symbiotic properties of *Bradyrhizobium vignae* strain ORS3257 with various *Vigna* species. Sci Rep 11, 4874. https://doi.org/10.1038/s41598-021-84205-w

Souza, A.A., Boscariol, R.L., Moon, D.H., Camargo, L.E.A., Tsai, S.M., 2000. Effects of *Phaseolus vulgaris* QTL in controlling host-bacteria interactions under two levels of nitrogen fertilization. Genetics and Molecular Biology 23, 155–161. https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000100029

Sprent, J.I., 2008. 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? J Exp Bot 59, 1081–1084. https://doi.org/10.1093/jxb/erm286

Sprent, J.I., James, E.K., 2007. Legume Evolution: Where Do Nodules and Mycorrhizas Fit In? Plant Physiology 144, 575–581. https://doi.org/10.1104/pp.107.096156

Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A., Pisante, M., 2017. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. Chemical and Biological Technologies in Agriculture 4, 2. https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1

Stalker, H.T., 2017. Utilizing Wild Species for Peanut Improvement. Crop Science 57, 1102–1120. https://doi.org/10.2135/cropsci2016.09.0824

Stalker, H.T., Dhesi, J.S., Parry, D.C., Hahn, J.H., 1991. Cytological and Interfertility Relationships of *Arachis* Section Arachis. American Journal of Botany 78, 238–246. https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1991.tb15751.x

Stalker, H.T., Nickum, M.L., Wynne, J.C., Elkan, G.H., Schneeweis, T.J., 1994. Evaluation of Biological Nitrogen Fixation Capacity in *Arachis* Species and the Possible Role of Polyploidy. Peanut Science 21, 55–60. https://doi.org/10.3146/i0095-3679-21-1-13

Stanton-Geddes, J., Paape, T., Epstein, B., Briskine, R., Yoder, J., Mudge, J., Bharti, A.K., Farmer, A.D., Zhou, P., Denny, R., May, G.D., Erlandson, S., Yakub, M., Sugawara, M., Sadowsky, M.J., Young, N.D., Tiffin, P., 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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065688

Streeter, J., Wong, P.P., 2008. Inhibition of legume nodule formation and N2 fixation by nitrate. Critical Reviews in Plant Sciences. https://doi.org/10.1080/07352688809382257

Streeter, J.G., 2003. Effects of drought on nitrogen fixation in soybean root nodules. Plant, Cell & Environment 26, 1199–1204. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01041.x

Subrahmanyam, P., Reddy, L.J., Gibbons, R.W., McDonald, D., 1985. Peanut rust: a major threat to peanut production in the semiarid tropics. Plant Disease 69, 813–819.

Sugawara, M., Umehara, Y., Kaga, A., Hayashi, M., Ishimoto, M., Sato, S., Mitsui, H., Minamisawa, K., 2019. Symbiotic incompatibility between soybean and *Bradyrhizobium arises* from one amino acid determinant in soybean Rj2 protein. PLOS ONE 14, e0222469. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222469

Sun, W., Zhou, Q., Yao, Y., Qiu, X., Xie, K., Yu, S., 2015. Identification of Genomic Regions and the Isoamylase Gene for Reduced Grain Chalkiness in Rice. PLOS ONE 10, e0122013. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122013

Sun, Y.-N., Pan, J.-B., Shi, X.-L., Du, X.-Y., Wu, Q., Qi, Z.-M., Jiang, H.-W., Xin, D.-W., Liu, C.-Y., Hu, G.-H., Chen, Q.-S., 2012. Multi-environment mapping and meta-analysis of 100-seed weight in soybean. Mol Biol Rep 39, 9435–9443. https://doi.org/10.1007/s11033-012-1808-4

Tam, S.M., Hays, J.B., Chetelat, R.T., 2011. Effects of suppressing the DNA mismatch repair system on homeologous recombination in tomato. Theor Appl Genet 123, 1445–1458. https://doi.org/10.1007/s00122-011-1679-4

Tang, F., Yang, S., Liu, J., Gao, M., Zhu, H., 2014. Fine mapping of the Rj4 locus, a gene controlling nodulation specificity in soybean. Mol Breeding 33, 691–700. https://doi.org/10.1007/s11032-013-9985-y

Tanksley, S.D., Nelson, J.C., 1996. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTL from unadapted germplasm into elite breeding lines. Theoret. Appl. Genetics 92, 191–203. https://doi.org/10.1007/BF00223376

Tanya, P., Srinives, P., Toojinda, T., Vanavichit, A., Lee, S.-H., 2005. Identification of SSR Markers Associated with N2-Fixation Components in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] 27, 351–359.

Taurian, T., Ibañez, F., Fabra, A., Aguilar, O.M., 2006. Genetic Diversity of *Rhizobia* Nodulating *Arachis hypogaea* L. in Central Argentinean Soils. Plant Soil 282, 41–52. https://doi.org/10.1007/s11104-005-5314-5

Taurian, T., Morón, B., Soria-Diaz, M.E., Angelini, J., Tejero-Mateo, P., Gil-Serramp, A., Megías, M., Fabra, A., 2008. Signal molecules in the peanut-*bradyrhizobia* interaction. Archives of microbiology 189, 345–56. https://doi.org/10.1007/s00203-007-0325-7

Tefera, H., Kamara, A.Y., Asafo-Adjei, B., Dashiell, K.E., 2009. Improvement in Grain and Fodder Yields of Early-Maturing Promiscuous Soybean Varieties in the Guinea Savanna of Nigeria. Crop Sci. 49, 2037–2042. https://doi.org/10.2135/cropsci2009.02.0081

Teulet, A., Busset, N., Fardoux, J., Gully, D., Chaintreuil, C., Cartieaux, F., Jauneau, A., Comorge, V., Okazaki, S., Kaneko, T., Gressent, F., Nouwen, N., Arrighi, J.-F., Koebnik, R., Mergaert, P., Deslandes, L., Giraud, E., 2019. The rhizobial type III effector ErnA confers the ability to form nodules in legumes. PNAS 116, 21758–21768. https://doi.org/10.1073/pnas.1904456116

Thilakarathna, M.S., Moroz, N., Raizada, M.N., 2017. A Biosensor-Based Leaf Punch Assay for Glutamine Correlates to Symbiotic Nitrogen Fixation Measurements in Legumes to Permit Rapid Screening of *Rhizobia* Inoculants under Controlled Conditions. Front. Plant Sci. 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01714

Thilakarathna, M.S., Raizada, M.N., 2017. A meta-analysis of the effectiveness of diverse *rhizobia* inoculants on soybean traits under field conditions. Soil Biology and Biochemistry 105, 177–196. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.022

Tirichine, L., de Billy, F., Huguet, T., 2000. Mtsym6, a Gene Conditioning Sinorhizobium Strain-Specific Nitrogen Fixation in *Medicago truncatula* 1. Plant Physiology 123, 845–852. https://doi.org/10.1104/pp.123.3.845

Tominaga, A., Gondo, T., Akashi, R., Zheng, S., Arima, S., Suzuki, A., 2012. Quantitative trait locus analysis of symbiotic nitrogen fixation activity in the model legume *Lotus japonicus*. J Plant Res 125, 395–406. https://doi.org/10.1007/s10265-011-0459-1

Tossim, H.-A., 2014. Evaluation multi-locale de 83 lignées de substitution de segments chromosomiques (CSSL) de l'arachide (*Arachis hypogaea*) issues d'un croisement interspécifique (Mémoire). Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

Tossim, H.-A., Nguepjop, J.R., Diatta, C., Sambou, A., Seye, M., Sane, D., Rami, J.-F., Fonceka, D., 2020. Assessment of 16 Peanut (*Arachis hypogaea* L.) CSSL Derived from an Interspecific Cross for Yield and Yield Component Traits: QTL Validation. Agronomy 10, 583. https://doi.org/10.3390/agronomy10040583

Tossim, H.-A., Nguepjop, J.R., Diatta, C., Sambou, A., Seye, M., Sane, D., Rami, J.-F., Fonceka, D., 2020. Assessment of 16 Peanut (*Arachis hypogaea* L.) CSSL Derived from an Interspecific Cross for Yield and Yield Component Traits: QTL Validation. Agronomy 10, 583. https://doi.org/10.3390/agronomy10040583

Tsai, S.M., Nodari, R.O., Moon, D.H., Camargo, L.E.A., Vencovsky, R., Gepts, P., 1998. QTL mapping for nodule number and common bacterial blight in *Phaseolus vulgaris* L. Plant and Soil 204, 135–145. https://doi.org/10.1023/A:1004347515127

Udvardi, M., Poole, P.S., 2013. Transport and Metabolism in Legume-*Rhizobia* Symbioses. Annual Review of Plant Biology 64, 781–805. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120235

United Nations, 2015. Resolution adopted by the General Assembly on 25 September 2015. 70/1 Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. Washington DC: United Nations General Assemby.

Unkovich, M., 2013. Isotope discrimination provides new insight into biological nitrogen fixation. New Phytologist 198, 643–646. https://doi.org/10.1111/nph.12227

Valls, J.F.M., Simpson, C.E., 2005. New Species of *Arachis* (*Leguminosae*) from Brazil, Paraguay and Bolivia. Bonplandia 14, 35–63.

Valls, J.F.M., Simpson, C.E., 2017. A new species of *Arachis* (*Fabaceae*) from Mato Grosso, Brazil, related to A. matiensis. Bonplandia 26, 143–149.

van Ittersum, M.K., van Bussel, L.G.J., Wolf, J., Grassini, P., van Wart, J., Guilpart, N., Claessens, L., de Groot, H., Wiebe, K., Mason-D'Croz, D., Yang, H., Boogaard, H., van Oort, P.A.J., van Loon, M.P., Saito, K., Adimo, O., Adjei-Nsiah, S., Agali, A., Bala, A., Chikowo, R., Kaizzi, K., Kouressy, M., Makoi, J.H.J.R., Ouattara, K., Tesfaye, K., Cassman, K.G., 2016. Can sub-Saharan Africa feed itself? Proceedings of the National Academy of Sciences 113, 14964–14969. https://doi.org/10.1073/pnas.1610359113

Vance, C.P., 1998. Legume Symbiotic Nitrogen Fixation: Agronomic Aspects, in: Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J. (Eds.), The *Rhizobiaceae*: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 509–530. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5060-6_26

Vance, C.P., Gantt, J.S., 1992. Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. Physiologia Plantarum 85, 266–274. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04731.x

Vandamme, P., Coenye, T., 2004. Taxonomy of the genus Cupriavidus: a tale of lost and found. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 2285–2289. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63247-0

Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.-M., de Vos, P., Willems, A., 2002. Burkholderia tuberum sp. nov. and Burkholderia phymatum sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes. Systematic and Applied Microbiology 25, 507–512. https://doi.org/10.1078/07232020260517634

Variath, M.T., Janila, P., 2017. Economic and Academic Importance of Peanut, in: Varshney, R.K., Pandey, M.K., Puppala, N. (Eds.), The Peanut Genome, Compendium of Plant Genomes. Springer International Publishing, Cham, pp. 7–26. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63935-2_2

Varshney, R.K., 2016. Exciting journey of 10 years from genomes to fields and markets: Some success stories of genomics-assisted breeding in chickpea, pigeonpea and groundnut. Plant Sci 242, 98–107. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.09.009

Velzen, R. van, Holmer, R., FengJiao, B., Rutten, L., Zeijl, A. van, Wei, L., Santuari, L., QingQin, C., Sharma, T., DeFeng, S., Roswanjaya, Y., Wardhani, T. a. K., Kalhor, M.S., Jansen, J., Hoogen, J. van den, Güngör, B., Hartog, M., Hontelez, J., Verver, J., WeiCai, Y., Schijlen, E., Repin, R., Schilthuizen, M., Schranz, M.E., Heidstra, R., Miyata, K. (et al), 2018. Comparative genomics of the nonlegume *Parasponia* reveals insights into evolution of nitrogen-fixing rhizobium symbioses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 115.

Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., Tarayre, S., Roudier, F., Mergaert, P., Kondorosi, A., Kondorosi, E., 2003. Endoreduplication Mediated by the Anaphase-Promoting Complex Activator CCS52A Is Required for Symbiotic Cell Differentiation in *Medicago truncatula* Nodules. The Plant Cell 15, 2093–2105. https://doi.org/10.1105/tpc.014373

Vincent, J.M., 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.

Viscarra Rossel, R.A., McGlynn, R.N., McBratney, A.B., 2006. Determining the composition of mineral-organic mixes using UV–vis–NIR diffuse reflectance spectroscopy. Geoderma 137, 70–82. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.07.004

Vlk, D., Trněný, O., Řepková, J., 2022. Genes Associated with Biological Nitrogen Fixation Efficiency Identified Using RNA Sequencing in Red Clover (*Trifolium pratense* L.). Life 12, 1975. https://doi.org/10.3390/life12121975

Voisin, A.-S., Cazenave, A.-B., Duc, G., Salon, C., 2013. Pea nodule gradients explain C nutrition and depressed growth phenotype of hypernodulating mutants. Agron. Sustain. Dev. 33, 829–838. https://doi.org/10.1007/s13593-013-0146-9

Voisin, A.-S., Prudent, M., Duc, G., Salon, C., 2015. Pea nodule gradients explain N nutrition and limited symbiotic fixation in hypernodulating mutants. Agron. Sustain. Dev. 35, 1529–1540. https://doi.org/10.1007/s13593-015-0328-8

Vollmann, J., Walter, H., Sato, T., Schweiger, P., 2011. Digital image analysis and chlorophyll metering for phenotyping the effects of nodulation in soybean. Computers and Electronics in Agriculture - COMPUT ELECTRON AGRIC 75, 190–195. https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.11.003

Waliyar, F., Kumar, P.L., Ntare, B.R., Monyo, E., Nigam, S.N., Reddy, A.S., Osiru, M., Diallo, A.T., 2007. A Century of Research on Groundnut Rosette Disease and its Management. Information Bulletin no. 75 [WWW Document]. URL http://oar.icrisat.org/3178/ (accessed 5.10.23).

Walker, L., Lagunas, B., Gifford, M.L., 2020. Determinants of Host Range Specificity in Legume-*Rhizobia* Symbiosis. Frontiers in Microbiology 11.

Wan, X.Y., Wan, J.M., Su, C.C., Wang, C.M., Shen, W.B., Li, J.M., Wang, H.L., Jiang, L., Liu, S.J., Chen, L.M., Yasui, H., Yoshimura, A., 2004. QTL detection for eating quality of cooked rice in a population of chromosome segment substitution lines. Theor Appl Genet 110, 71–79. https://doi.org/10.1007/s00122-004-1744-3

Wanek, W., Arndt, S.K., 2002. Difference in δ15N signatures between nodulated roots and shoots of soybean is indicative of the contribution of symbiotic N2 fixation to plant N. Journal of Experimental Botany 53, 1109–1118. https://doi.org/10.1093/jexbot/53.371.1109

Wang, D., Yang, S., Tang, F., Zhu, H., 2012. Symbiosis specificity in the legume – rhizobial mutualism. Cellular Microbiology 14, 334–342. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x

Wang, E.T., Tian, C.F., Chen, W.F., Young, J.P.W., Chen, W.X., 2019. Ecology and Evolution of *Rhizobia*: Principles and Applications. Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9555-1

Wang, Jinhui, Ma, C., Ma, S., Zheng, H., Tian, H., Wang, X., Wang, Y., Jiang, H., Wang, Jiangxu, Zhang, Z., Liu, C., Yang, M., Chen, Q., Xin, D., 2022. Genetic variation in GmCRP contributes to nodulation in soybean (*Glycine max* Merr.). The Crop Journal. https://doi.org/10.1016/j.cj.2022.07.023

Wang, Jinhui, Wang, Jieqi, Ma, C., Zhou, Z., Yang, D., Zheng, J., Wang, Q., Li, H., Zhou, H., Sun, Z., Liu, H., Li, J., Chen, L., Kang, Q., Qi, Z., Jiang, H., Zhu, R., Wu, X., Liu, C., Chen, Q., Xin, D.,

2020. QTL Mapping and Data Mining to Identify Genes Associated With the *Sinorhizobium fredii* HH103 T3SS Effector NopD in Soybean. Frontiers in Plant Science 11.

Wang, L., Rubio, M.C., Xin, X., Zhang, B., Fan, Q., Wang, Q., Ning, G., Becana, M., Duanmu, D., 2019. CRISPR/Cas9 knockout of leghemoglobin genes in *Lotus japonicus* uncovers their synergistic roles in symbiotic nitrogen fixation. New Phytologist 224, 818–832. https://doi.org/10.1111/nph.16077

Wang, Q., Yang, S., Liu, J., Terecskei, K., Ábrahám, E., Gombár, A., Domonkos, Á., Szűcs, A., Körmöczi, P., Wang, T., Fodor, L., Mao, L., Fei, Z., Kondorosi, É., Kaló, P., Kereszt, A., Zhu, H., 2017. Host-secreted antimicrobial peptide enforces symbiotic selectivity in *Medicago truncatula*. Proceedings of the National Academy of Sciences 114, 6854–6859. https://doi.org/10.1073/pnas.1700715114

Wang, R., Chang, Y.L., Zheng, W.T., Zhang, D., Zhang, X.X., Sui, X.H., Wang, E.T., Hu, J.Q., Zhang, L.Y., Chen, W.X., 2013. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. Systematic and Applied Microbiology 36, 101–105. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.10.009

Wang, X., Chen, C.Y., Dang, P., Carter, J., Zhao, S., Lamb, M.C., Chu, Y., Holbrook, C., Ozias-Akins, P., Isleib, T.G., Feng, Y., 2023. Variabilities in symbiotic nitrogen fixation and carbon isotope discrimination among peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes under drought stress. Journal of Agronomy and Crop Science 209, 228–241. https://doi.org/10.1111/jac.12619

Wang, X.L., Cui, W.J., Feng, X.Y., Zhong, Z.M., Li, Y., Chen, W.X., Chen, W.F., Shao, X.M., Tian, C.F., 2018. *Rhizobia* inhabiting nodules and rhizosphere soils of alfalfa: A strong selection of facultative microsymbionts. Soil Biology and Biochemistry 116, 340–350. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.033

Wasson, A.P., Pellerone, F.I., Mathesius, U., 2006. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by *rhizobia*. Plant Cell 18, 1617–1629. https://doi.org/10.1105/tpc.105.038232

Weese, D.J., Heath, K.D., Dentinger, B.T.M., Lau, J.A., 2015. Long-term nitrogen addition causes the evolution of less-cooperative mutualists. Evolution 69, 631–642. https://doi.org/10.1111/evo.12594

Wivstad, M., Mårtensson, A.M., Ljunggren, H.D., 1987. Field measurement of symbiotic nitrogen fixation in an established lucerne ley using 15N and an acetylene reduction method. Plant and Soil 97, 93–104.

Wojciechowski, M.F., Lavin, M., Sanderson, M.J., 2004. A phylogeny of legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. Am J Bot 91, 1846–1862. https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1846

Wu, S., Harper, J.E., 1991. Dinitrogen Fixation Potential and Yield of Hypernodulating Soybean Mutants: A Field Evaluation. Crop Science 31, 1233–1240. https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100050031x

Wynne, J.C., Elkan, G.H., Schneeweis, T.J., 1980. Increasing nitrogen fixation of the groundnut by strain and host selection. Proceedings of the international workshop on groundnuts. ICRISAT Center, Patancheru, India, 13-17 October 1980. 95–109.

Xu, J., Zhao, Q., Du, P., Xu, C., Wang, B., Feng, Q., Liu, Q., Tang, S., Gu, M., Han, B., Liang, G., 2010. Developing high throughput genotyped chromosome segment substitution lines based on population whole-genome re-sequencing in rice (*Oryza sativa* L.). BMC Genomics 11, 656. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-656

Xu, Y., Li, P., Yang, Z., Xu, C., 2017. Genetic mapping of quantitative trait loci in crops. The Crop Journal, Advances in Crop Science: Innovation and Sustainability 5, 175–184. https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.06.003

Yakubu, H., Kwari, J.D., Sandabe, M.K., 2010. Effect of Phosphorus Fertilizer on Nitrogen Fixation by Some Grain Legume Varieties in Sudano – Sahelian Zone of North Eastern Nigeria. Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences 18, 44–49. https://doi.org/10.4314/njbas.v18i1.56837

Yang, Q., Yang, Y., Xu, R., Lv, H., Liao, H., 2019. Genetic Analysis and Mapping of QTL for Soybean Biological Nitrogen Fixation Traits Under Varied Field Conditions. Front. Plant Sci. 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00075

Yang, S., Tang, F., Gao, M., Krishnan, H.B., Zhu, H., 2010. R gene-controlled host specificity in the legume–*rhizobia* symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 18735–18740. https://doi.org/10.1073/pnas.1011957107

Yang, S., Wang, Q., Fedorova, E., Liu, J., Qin, Q., Zheng, Q., Price, P.A., Pan, H., Wang, D., Griffitts, J.S., Bisseling, T., Zhu, H., 2017. Microsymbiont discrimination mediated by a host-secreted peptide in *Medicago truncatula*. Proceedings of the National Academy of Sciences 114, 6848–6853. https://doi.org/10.1073/pnas.1700460114

Yang, Y., Zhao, Q., Li, X., Ai, W., Liu, D., Qi, W., Zhang, M., Yang, C., Liao, H., 2017. Characterization of Genetic Basis on Synergistic Interactions between Root Architecture and Biological Nitrogen Fixation in Soybean. Frontiers in Plant Science 8.

Yates, R.J., Howieson, J.G., Reeve, W.G., Brau, L., Speijers, J., Nandasena, K., Real, D., Sezmis, E., O'Hara, G.W., 2008. Host–strain mediated selection for an effective nitrogen-fixing symbiosis between *Trifolium* spp. and *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Soil Biology and Biochemistry 40, 822–833. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.11.001

Young, M.D., Wakefield, M.J., Smyth, G.K., Oshlack, A., 2010. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. Genome Biology 11, R14. https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-2-r14

Zaiya, Z.A., 2018. Etude de la composante symbiotique bactérienne impliquée dans l'adaptation de l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.) au Sénégal (Ph.D. Thesis). Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar.

Zaiya, Z.A., Fonceka, D., Fall, S., Fabra, A., Ibañez, F., Pignoly, S., Diouf, A., Touré, O., Faye, M.N., Hocher, V., Diouf, D., Svistoonoff, S., 2018. Genetic diversity and symbiotic efficiency of rhizobial strains isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) in Senegal. Agriculture, Ecosystems & Environment 265, 384–391. https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.06.001

Zeiher, C., Egli, D.B., Leggett, J.E., Reicosky, D.A., 1982. Cultivar Differences in N Redistribution in Soybeans1. Agronomy Journal 74, 375–379. https://doi.org/10.2134/agronj1982.00021962007400020027x

Zhang, B., Wang, M., Sun, Y., Zhao, P., Liu, C., Qing, K., Hu, X., Zhong, Z., Cheng, J., Wang, Haijiao, Peng, Y., Shi, J., Zhuang, L., Du, S., He, M., Wu, H., Liu, M., Chen, S., Wang, Hong, Chen, X., Fan, W., Tian, K., Wang, Y., Chen, Q., Wang, S., Dong, F., Yang, C., Zhang, M., Song, Q., Li, Y., Wang, X., 2021. *Glycine max* NNL1 restricts symbiotic compatibility with widely distributed *bradyrhizobia* via root hair infection. Nat. Plants 7, 73–86. https://doi.org/10.1038/s41477-020-00832-7

Zhang, H., Mascher, M., Abbo, S., Jayakodi, M., 2022. Advancing Grain Legumes Domestication and Evolution Studies with Genomics. Plant and Cell Physiology 63, 1540–1553. https://doi.org/10.1093/pcp/pcac062

Zhang, J., Subramanian, S., Stacey, G., Yu, O., 2009. Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. The Plant Journal 57, 171–183. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03676.x

Zhang, J.J., Liu, T.Y., Chen, W.F., Wang, E.T., Sui, X.H., Zhang, X.X., Li, Yán, Li, Yàn, Chen, W.X., 2012. *Mesorhizobium muleiense* sp. nov., nodulating with *Cicer arietinum* L. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62, 2737–2742. https://doi.org/10.1099/ijs.0.038265-0

Zhang, S., Hu, X., Miao, H., Chu, Y., Cui, F., Yang, W., Wang, C., Shen, Y., Xu, T., Zhao, L., Zhang, J., Chen, J., 2019. QTL identification for seed weight and size based on a high-density SLAF-seq genetic map in peanut (*Arachis hypogaea* L.). BMC Plant Biol 19, 537. https://doi.org/10.1186/s12870-019-2164-5

Zhang, Y., Luo, L., Xu, C., Zhang, Q., Xing, Y., 2006. Quantitative trait loci for panicle size, heading date and plant height co-segregating in trait-performance derived near-isogenic lines of rice (*Oryza sativa*). Theor Appl Genet 113, 361–368. https://doi.org/10.1007/s00122-006-0305-3

Zhao, N., Yuan, R., Usman, B., Qin, J., Yang, J., Peng, L., Mackon, E., Liu, F., Qin, B., Li, R., 2022. Detection of QTL Regulating Six Agronomic Traits of Rice Based on Chromosome Segment Substitution Lines of Common Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and Mapping of qPH1.1 and qLMC6.1. Biomolecules 12, 1850. https://doi.org/10.3390/biom12121850

Zhuang, W., Chen, H., Yang, M., Wang, Jianping, Pandey, M.K., Zhang, C., Chang, W.-C., Zhang, L., Zhang, Xingtan, Tang, R., Garg, V., Wang, Xingjun, Tang, H., Chow, C.-N., Wang, Jinpeng,

Deng, Y., Wang, D., Khan, A.W., Yang, Q., Cai, T., Bajaj, P., Wu, K., Guo, B., Zhang, Xinyou, Li, J., Liang, F., Hu, J., Liao, B., Liu, S., Chitikineni, A., Yan, H., Zheng, Y., Shan, S., Liu, Q., Xie, D., Wang, Z., Khan, S.A., Ali, N., Zhao, C., Li, X., Luo, Z., Zhang, S., Zhuang, R., Peng, Z., Wang, S., Mamadou, G., Zhuang, Y., Zhao, Z., Yu, W., Xiong, F., Quan, W., Yuan, M., Li, Y., Zou, H., Xia, H., Zha, L., Fan, J., Yu, J., Xie, W., Yuan, J., Chen, K., Zhao, S., Chu, W., Chen, Y., Sun, P., Meng, F., Zhuo, T., Zhao, Yuhao, Li, C., He, G., Zhao, Yongli, Wang, C., Kavikishor, P.B., Pan, R.-L., Paterson, A.H., Wang, Xiyin, Ming, R., Varshney, R.K., 2019. The genome of cultivated peanut provides insight into legume karyotypes, polyploid evolution and crop domestication. Nature Genetics 51, 865–876. https://doi.org/10.1038/s41588-019-0402-2

ANNEXES

Annexe 1 : Évaluation de la précision de mesure de l'abondance en azote isotopique ^{15}N et de la teneur en azote total des fanes d'arachide

Échantillons	Laboratoire 1			Laboratoire 2		
	n	$\delta^{15}N$	TN	n	$\delta^{15}N \pm SD$	TN ± SD
Fane1	1	-0.75	23	1	-0.72	22.22
Fane2	1	-0.06	22.68	2	-1.49 ± 1.15	23.39 ± 1.32
Fane3	1	0.14	24.02	2	0.48 ± 2.83	26.50 ± 2.33
Fane4	1	-0.15	22.34	2	-2.18 ± 2.25	22.71 ± 0.34
Fane5	1	-0.17	20.68	2	-2.51± 2.79	22.03 ± 0.27

$\delta^{15}N$ abondance en azote isotopique ^{15}N (‰) ; TN : teneur en azote total (g/kg), n : nombre de mesure ; SD : écart-type ou standard deviation. Laboratoire 1 : Laboratoire des moyens analytiques de Nouméa, Nouvelle-Calédonie ; Laboratoire 2 : Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier, France.

Annexe 2 : Analyse de variance de l'effet souche sur des caractères associés à la symbiose fixatrice d'azote chez chaque génotype.

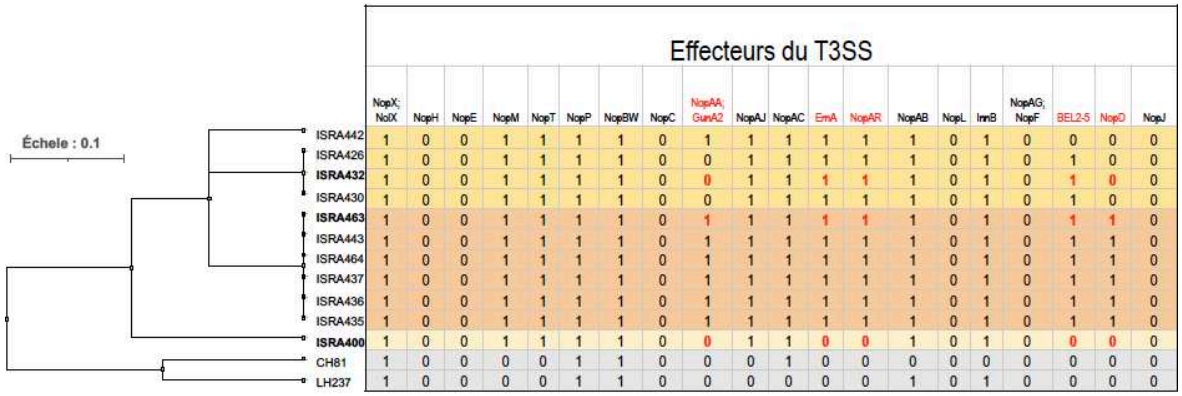
Caractères	Génotypes	Souches	Moyenne ± SD		*p*- value	
			Essai1	Essai2	Essai1	Essai2
SPAD	Fleur11	Control	14 ± 1.85**b**	11.32 ± 1.66**c**	<0.001***	<0.001***
		ISRA400	32.82 ± 2.35**a**	41.25 ± 5.09**a**		
		ISRA432	13.95 ± 2.11**b**	19.57 ± 2.86**b**		
		ISRA463	15.5 ± 4.78**b**	13.7 ± 1.98**c**		
	12CS_004	Control	13.6 ± 1**a**	10.52 ± 1.48**a**	0.512	0.903
		ISRA400	12.87 ± 2.83**a**	10.32 ± 2.14**a**		
		ISRA432	11.77 ± 1.23**a**	10.65 ± 1.1**a**		
		ISRA463	11.57 ± 2.28**a**	9.87 ± 0.33**a**		
	12CS_044	Control	15.6 ± 0.95**a**	12.02 ± 1.66**a**	0.192	0.382
		ISRA400	11.83 ± 3.25**a**	9.92 ± 1.68**a**		
		ISRA432	14.75 ± 4.79**a**	10.32 ± 1.88**a**		
		ISRA463	12.33 ± 2.44**a**	9.87 ± 1.88**a**		
	12CS_051	Control	12.83 ± 1.76**a**	9.4 ± 0.86**a**	0.595	0.243
		ISRA400	14.96 ± 3.61**a**	11.3 ± 3.65**a**		
		ISRA432	17.45 ± 5.54**a**	10.9 ± 1.01**a**		
		ISRA463	13.53 ± 2.9**a**	8.97 ± 0.89**a**		
	12CS_084	Control	14.07 ± 1.02**a**	11.35 ± 1.74**a**	0.831	0.282
		ISRA400	15.2 ± 5.47**a**	18.25 ± 9.86**a**		
		ISRA432	13.62 ± 2.68**a**	13.85 ± 2.91**a**		
		ISRA463	13.20 ± 1.89**a**	10.7 ± 0.14**a**		
	12CS_114	Control	14.55 ± 0.96**c**	12.57 ± 1.89**c**	<0.001***	<0.001***
		ISRA400	35.96 ± 2.68**a**	43.32 ± 3.43**a**		
		ISRA432	20.32 ± 0.58**b**	16.7 ± 2.69**b**		
		ISRA463	21.22 ± 1.86**b**	16.52 ± 1.83**b**		
TB	Fleur11	Control	2.07 ± 0.12**a**	2.59 ± 0.24**a**	0.293	0.073

		ISRA400	2.67 ± 0.28**a**	3.43 ± 0.71**a**		
		ISRA432	2.15 ± 0.6**a**	2.85 ± 0.78**a**		
		ISRA463	2.41 ± 0.4**a**	2.37 ± 0.24**a**		
	12CS_004	Control	1.62 ± 0.29**a**	2.13 ± 0.18**a**	0.822	0.254
		ISRA400	1.80 ± 0.45**a**	2.53 ± 0.16**a**		
		ISRA432	1.55 ± 0.24**a**	2.46 ± 0.58**a**		
		ISRA463	1.7 ± 0.52**a**	2.94 ± 0.82**a**		
	12CS_044	Control	1.53 ± 0.2**a**	2.8 ± 0.59**a**	0.979	0.824
		ISRA400	1.51 ± 0.11**a**	2.6 ± 0.2**a**		
		ISRA432	1.43 ± 0.24**a**	2.56 ± 0.49**a**		
		ISRA463	1.54 ± 0.48**a**	2.52 ± 0.35**a**		
	12CS_051	Control	1.88 ± 0.06**a**	2.39 ± 0.31**a**	0.342	0.618
		ISRA400	1.62 ± 0.11**a**	2.14 ± 0.23**a**		
		ISRA432	1.65 ± 0.39**a**	2.25 ± 0.24**a**		
		ISRA463	1.73 ± 0.25**a**	2.34 ± 0.18**a**		
	12CS_084	Control	1.99 ± 0.29**a**	2.32 ± 0.4**b**	0.381	0.048*
		ISRA400	2.04 ± 0.26**a**	3.19 ± 0.15**a**		
		ISRA432	1.69 ± 0.32**a**	2.58 ± 0.45**ab**		
		ISRA463	2.05 ± 0.45**a**	2.49 ± 0.41**b**		
	12CS_114	Control	1.8 ± 0.24**b**	2.81 ± 0.52**b**	0.029*	0.008**
		ISRA400	2.98 ± 0.36**a**	4.4 ± 0.64**a**		
		ISRA432	1.90 ± 0.28**b**	3.23 ± 0.32**b**		
		ISRA463	2.27 ± 0.55**ab**	2.8 ± 0.4**b**		
PSN	Fleur11	Control	0**b**	0**b**	<0.001***	0.001**
		ISRA400	49.52 ± 9.51**a**	97.25 ± 28.3**a**		
		ISRA432	8.12 ± 7.24**b**	93.5 ± 58.13**a**		
		ISRA463	3.4 ± 3.33**b**	12 ± 4.89**b**		
	12CS_004	Control	0**a**	0**a**	0.474	0.442
		ISRA400	1.92 ± 3.52**a**	1.5 ± 2.38**a**		
		ISRA432	7.07 ± 13.17**a**	6 ± 12**a**		
		ISRA463	0**a**	0**a**		
	12CS_044	Control	0**a**	0**a**	0.11	0.386
		ISRA400	14.35 ± 13.06**a**	19.50 ± 26.88**a**		
		ISRA432	3.21 ± 3.90**a**	14.5 ± 24.33**a**		
		ISRA463	0**a**	0.75 ± 1.5**a**		
	12CS_051	Control	0**b**	0**c**	0.004**	0.005**
		ISRA400	37.97 ± 12.18**a**	43.25 ± 36.16**a**		
		ISRA432	8.72 ± 9.70**b**	12 ± 7.21**a**		
		ISRA463	4.48 ± 3.85**b**	4 ± 1.41**b**		
	12CS_084	Control	0**b**	0**c**	0.033*	<0.001***
		ISRA400	19.47 ± 13.16**a**	57.75 ± 11.32**a**		
		ISRA432	10.97 ± 5.88**ab**	53 ± 28.14**ab**		
		ISRA463	4.47 ± 2.85**b**	22 ± 6.48**bc**		
	12CS_114	Control	0**c**	0**c**	<0.001***	<0.001***
		ISRA400	61.63 ± 14.01**a**	108.75 ± 15.9**a**		
		ISRA432	1.92 ± 0.64**bc**	77 ± 17.79**b**		
		ISRA463	12.81 ± 8.88**b**	10.75 ± 5.85**c**		
NN	Fleur11	Control	0**c**	0**b**	<0.001***	0.006**
		ISRA400	49.75 ± 9.74**a**	73.75 ± 20.99**a**		

		ISRA432	9.50 ± 5.32**bc**	82.25 ± 46.94**a**		
		ISRA463	21 ± 18.35**b**	67 ± 20.70**a**		
	12CS_004	Control	0**a**	0**a**	0.477	0.449
		ISRA400	5 ± 8.71**a**	2.75 ± 3.20**a**		
		ISRA432	8.25 ± 13.22**a**	5.25 ± 10.5**a**		
		ISRA463	0.5 ± 1**a**	0**a**		
	12CS_044	Control	0**a**	0**a**	0.082	0.15
		ISRA400	29 ± 25.23**a**	38.50 ± 43.97**a**		
		ISRA432	3.50 ± 3.87**a**	15.75 ± 14.22**a**		
		ISRA463	1.33 ± 1.15**a**	3.25 ± 6.5**a**		
	12CS_051	Control	0**b**	0**b**	0.002**	0.02*
		ISRA400	41 ± 6.92**a**	45.25 ± 35.38**ab**		
		ISRA432	6.50 ± 5.91**b**	15.66 ± 6.42**ab**		
		ISRA463	13.33 ± 10.26**b**	18 ± 6.27**b**		
	12CS_084	Control	0**b**	0**b**	0.012*	0.018*
		ISRA400	27.5 ± 11.67**a**	54 ± 10.13**ab**		
		ISRA432	12.50 ± 5**ab**	50 ± 28.87**a**		
		ISRA463	24.25 ± 15.5**a**	70.75 ± 12.09**a**		
	12CS_114	Control	0**c**	0**d**	<0.001***	0.002**
		ISRA400	70 ± 14**a**	95.25 ± 20.27**a**		
		ISRA432	12.25 ± 5.56**bc**	69. 25 ± 9.97**b**		
		ISRA463	19.75 ± 11.52**b**	9.25 ± 4.92**c**		
PSN/NN	Fleur11	Control	0**b**	0**c**	0.003**	<0.001***
		ISRA400	0.99 ± 0.07**a**	1.33 ± 0.26**a**		
		ISRA432	0.85 ± 0.56**a**	1.11 ± 0.19**b**		
		ISRA463	0.11 ± 0.11**b**	0.17 ± 0.02**c**		
	12CS_004	Control	0**a**	0**a**	0.138	0.371
		ISRA400	0.16 ± 0.19**a**	0.25 ± 0.39**a**		
		ISRA432	0.38 ± 0.40**a**	0.28 ± 0.57**a**		
		ISRA463	0**a**	0**a**		
	12CS_044	Control	0**b**	0**a**	0.011*	0.054
		ISRA400	0.32 ± 0.29**ab**	0.38 ± 0.14**a**		
		ISRA432	0.66 ± 0.46**b**	0.54 ± 0.55**a**		
		ISRA463	0**b**	0.05 ± 0.11**a**		
	12CS_051	Control	0	0**b**	0.093	0.007**
		ISRA400	0.95 ± 0.09	1 ± 0.32**a**		
		ISRA432	0.96 ± 0.76	0.72 ± 0.16**a**		
		ISRA463	0.29 ± 0.07	0.23 ± 0.06**b**		
	12CS_084	Control	0**b**	0**c**	0.005**	<0.001***
		ISRA400	0.66 ± 0.18**a**	1.09 ± 0.28**a**		
		ISRA432	0.91 ± 0.52**a**	1.08 ± 0.07**a**		
		ISRA463	0.18 ± 0.03**b**	0.3 ±0.04**b**		
	12CS_114	Control	0**b**	0**b**	<0.001***	<0.001***
		ISRA400	0.87 ± 0.04**a**	1.16 ± 0.16**a**		
		ISRA432	0.16± 0.05**b**	1.10 ± 0.15**a**		
		ISRA463	0.66 ± 0.25**a**	1.17 ± 0.12**a**		

SPAD : teneur en chlorophylle des feuilles ; TB : Biomasse totale ; ARA : activité de la nitrogénase ; PSN : Poids sec de nodules ; NN : nombre de nodules. Les moyennes avec des lettres différentes sont statistiquement différentes au seuil de 5%.

Annexe 3 : Analyse de similarité des effecteurs du système de sécrétion de type III chez les *Bradyrhizobium* associés à l'arachide cultivée au Sénégal.

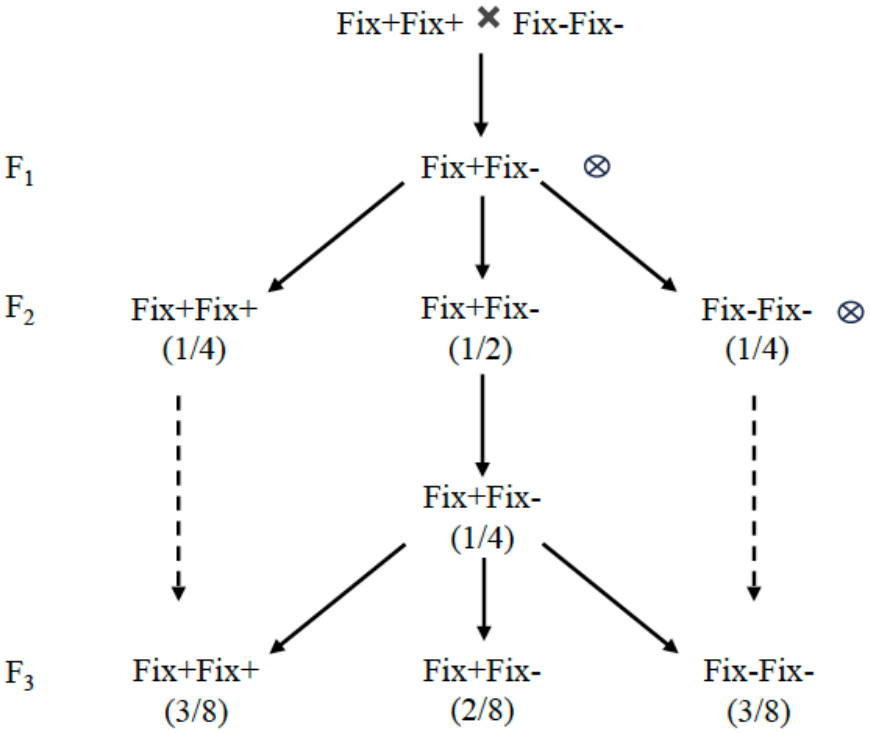


	Effecteurs du T3SS																			
	NopX; NolX	NopH	NopE	NopM	NopT	NopP	NopBW	NopC	NopAA; GunA2	NopAJ	NopAC	EmA	NopAR	NopAB	NopL	ImnB	NopAG; NopF	BEL2-5	NopD	NopJ
ISRA442	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
ISRA426	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
ISRA432	1	0	0	1	1	1	1	0	**0**	1	1	**1**	**1**	1	0	1	0	**1**	**0**	0
ISRA430	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
ISRA463	1	0	0	1	1	1	1	0	**1**	1	1	**1**	**1**	1	0	1	0	**1**	**1**	0
ISRA443	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
ISRA464	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
ISRA437	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
ISRA436	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
ISRA435	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
ISRA400	1	0	0	1	1	1	1	0	**0**	1	1	**0**	**0**	1	0	1	0	**0**	**0**	0
CH81	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LH237	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0

Les souches ISRA400, ISRA432 et ISRA463 qui ont été utilisées dans cette étude sont indiquées en gras sur le dendrogramme. Les effecteurs en couleur rouge correspondent à ceux qui présentent des différences entre les trois souches testées.CH81 et LH237 sont des souches de référence isolées en Argentine (région d'origine de l'arachide cultivée). 0 = absence et 1 = présence. (Ibanez *et al.*, communication personnelle).

Annexe 4 : Récapitulatif de l'analyse d'enrichissement des termes GO des DEGs identifiés chez chaque génotype durant le processus symbiotique https://1drv.ms/x/s!AuJSUIPGqM7IiXttWsFiSZj5J7ow?e=eQVqZS

Annexe 5 : Ségrégation mendélienne du gène Fix indiquant les proportions génotypiques



Les proportions génotypiques sont indiquées par les chiffres en parenthèses.

Annexe 6 : Résultats du test de khi deux sur les proportions phénotypiques

	Degré de liberté	X^2_{lu}	$X^2_{calculé}$
Expérimentation 1	1	3.84	0.225
Expérimentation 2	1	3.84	0.108

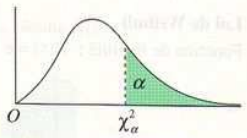
$$\text{X2calculé} = \sum_{i=1}^{n} \frac{(phénotype\ obtenu - phénotype\ attendu)^2}{phénotype\ attendu}$$

Avec n = nombre de phénotype. X^2_{lu} a été déterminé au sein de 5% et du degré de liberté (v) de 1, en utilisant la table du khi deux.

Table de distribution de χ^2 (loi de K. Pearson)

La table donne la probabilité α, en fonction du nombre de degrés de liberté ν, pour que χ^2 égale ou dépasse une valeur donnée χ^2_α.

$$\alpha = P(\chi^2 \geq \chi^2_\alpha)$$

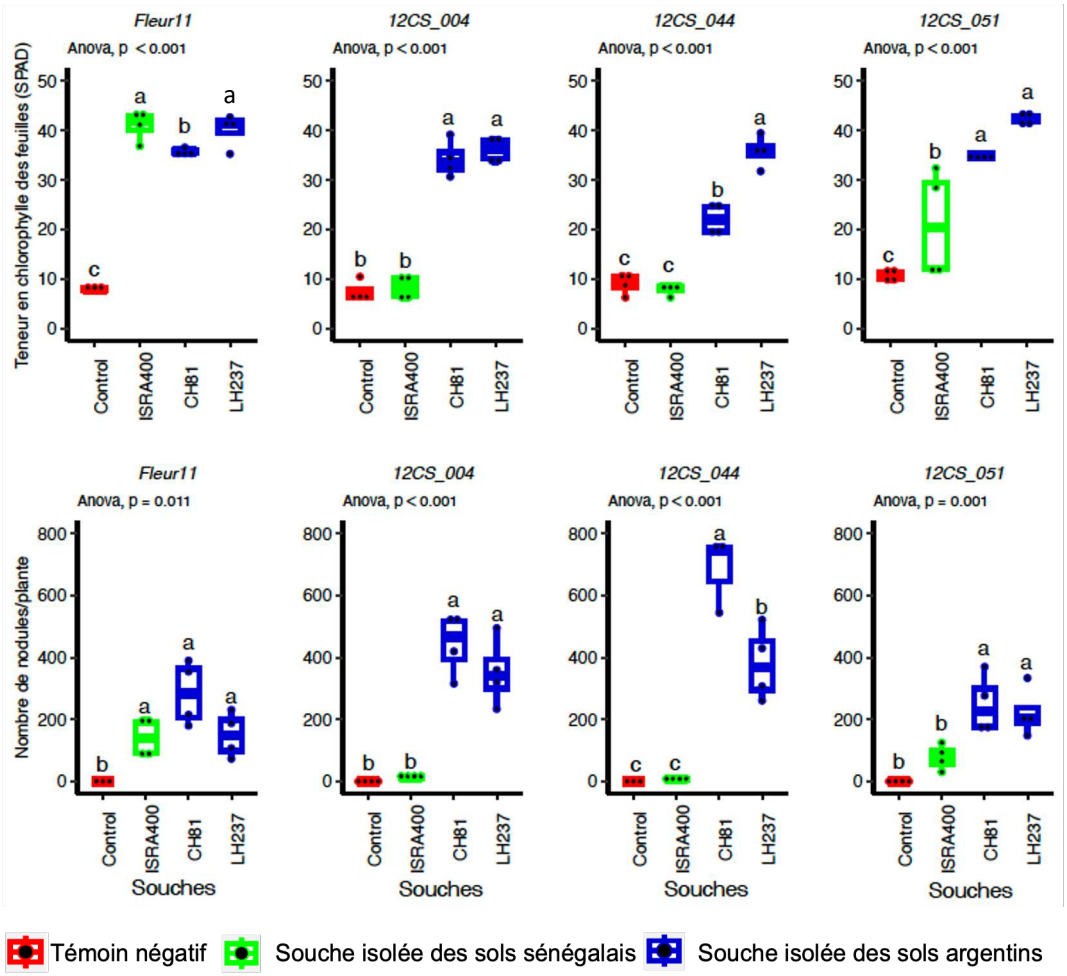


ν	$\alpha = 0{,}990$	$\alpha = 0{,}975$	$\alpha = 0{,}950$	$\alpha = 0{,}900$	$\alpha = 0{,}100$	$\alpha = 0{,}050$	$\alpha = 0{,}025$	$\alpha = 0{,}010$	$\alpha = 0{,}001$
1	0,0002	0,0010	0,0039	0,0158	2,71	3,84	5,02	6,63	10,83
2	0,02	0,05	0,10	0,21	4,61	5,99	7,38	9,21	13,82
3	0,12	0,22	0,35	0,58	6,25	7,81	9,35	11,34	16,27
4	0,30	0,48	0,71	1,06	7,78	9,49	11,14	13,28	18,47
5	0,55	0,83	1,15	1,61	9,24	11,07	12,83	15,09	20,52
6	0,87	1,24	1,64	2,20	10,64	12,59	14,45	16,81	22,46
7	1,24	1,69	2,17	2,83	12,02	14,07	16,01	18,47	24,32
8	1,65	2,18	2,73	3,49	13,36	15,51	17,53	20,09	26,13
9	2,09	2,70	3,33	4,17	14,68	16,92	19,02	21,67	27,88
10	2,56	3,25	3,94	4,87	15,99	18,31	20,48	23,21	29,59
11	3,05	3,82	4,57	5,58	17,27	19,67	21,92	24,72	31,26
12	3,57	4,40	5,23	6,30	18,55	21,03	23,34	26,22	32,91
13	4,11	5,01	5,89	7,04	19,81	22,36	24,74	27,69	34,53
14	4,66	5,63	6,57	7,79	21,06	23,68	26,12	29,14	36,12
15	5,23	6,26	7,26	8,55	22,31	25,00	27,49	30,58	37,70
16	5,81	6,91	7,96	9,31	23,54	26,30	28,84	32,00	39,25
17	6,41	7,56	8,67	10,08	24,77	27,59	30,19	33,41	40,79
18	7,01	8,23	9,39	10,86	25,99	28,87	31,53	34,80	42,31
19	7,63	8,91	10,12	11,65	27,20	30,14	32,85	36,19	43,82
20	8,26	9,59	10,85	12,44	28,41	31,41	34,17	37,57	45,32
21	8,90	10,28	11,59	13,24	29,61	32,67	35,48	38,93	46,80
22	9,54	10,98	12,34	14,04	30,81	33,92	36,78	40,29	48,27
23	10,20	11,69	13,09	14,85	32,01	35,17	38,08	41,64	49,73
24	10,86	12,40	13,85	15,66	33,20	36,41	39,37	42,98	51,18
25	11,52	13,12	14,61	16,47	34,38	37,65	40,65	44,31	52,62
26	12,20	13,84	15,38	17,29	35,56	38,88	41,92	45,64	54,05
27	12,88	14,57	16,15	18,11	36,74	40,11	43,19	46,96	55,48
28	13,57	15,31	16,93	18,94	37,92	41,34	44,46	48,28	56,89
29	14,26	16,05	17,71	19,77	39,09	42,56	45,72	49,59	58,30
30	14,95	16,79	18,49	20,60	40,26	43,77	46,98	50,89	59,70

Quand ν est supérieur à 30, on utilise la table de la loi normale (table de l'écart réduit) avec :

$$t = \sqrt{2\chi^2} - \sqrt{2\nu - 1}$$

Annexe 7 : Variation de la teneur en chlorophylle et du nombre de nodules en fonction de la souche de *Bradyrhizobium* sp.



Control ou témoin négatif indique les plantes non inoculées ; ISRA400 est une souche de *Bradyrhizobium vignae* native des sols du Sénégal ; CH81 et LH237 sont des souches *Bradyrhizobium* sp. natives des sols d'Argentine. Les boxplots avec des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0.05$) avec le test de Duncan (Nzepang *et al.* communication personnelle). Les plantes ont été évaluées en chambre de culture pendant 35 jours après inoculation. Luminosité ~277 µmol/m^2/s, humidité 70%, photopériode 16h lumière/ 8h obscurité.

Annexe 8 : Diffusions scientifiques

Article publié

genes

MDPI

Article

Mapping of QTLs Associated with Biological Nitrogen Fixation Traits in Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) Using an Interspecific Population Derived from the Cross between the Cultivated Species and Its Wild Ancestors

Darius T. Nzepang [1,2,3,4,5], Djamel Gully [2,4], Joël R. Nguepjop [1,5,6,7], Arlette Zaiya Zazou [8], Hodo-Abalo Tossim [1,5], Aissatou Sambou [1,5], Jean-François Rami [5,6,7], Valerie Hocher [2,3,4], Saliou Fall [3,4], Sergio Svistoonoff [2,4] and Daniel Fonceka [1,5,6,7,*]

1 Centre d'Etudes Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse, CERAAS-Route de Khombole, Thiès BP3320, Senegal
2 PHIM Plant Health Institute, Univ Montpellier, IRD, CIRAD, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France
3 Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM) (IRD/ISRA/UCAD), Centre de Recherche de Bel Air, Dakar BP1386, Senegal
4 Laboratoire Mixte International Adaptation des Plantes et Microorganismes Associés aux Stress Environnementaux (LAPSE), Centre de Recherche de Bel Air, Dakar CP18524, Senegal
5 Dispositif de Recherche et de Formation en Partenariat, Innovation et Amélioration Variétale en Afrique de l'Ouest (IAVAO), CERAAS Route de Khombole, Thiès BP3320, Senegal
6 CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France
7 AGAP, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France
8 Institute of Agricultural Research for Development (IRAD) (IRAD), Maroua, Cameroon
* Correspondence: daniel.fonceka@cirad.fr

check for updates

Citation: Nzepang, D.T.; Gully, D.; Nguepjop, J.R.; Zaiya Zazou, A.; Tossim, H.-A.; Sambou, A.; Rami, J.-F.; Hocher, V.; Fall, S.; Svistoonoff, S.; et al. Mapping of QTLs Associated with Biological Nitrogen Fixation Traits in Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) Using an Interspecific Population Derived from the Cross between the Cultivated Species and Its Wild Ancestors. *Genes* **2023**, *14*, 797. https://doi.org/10.3390/genes14040797

Academic Editors: Liying Yan and Huaiyong Luo

Received: 20 February 2023
Revised: 16 March 2023
Accepted: 22 March 2023
Published: 26 March 2023

Abstract: Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) are an allotetraploid grain legume mainly cultivated by poor farmers in Africa, in degraded soil and with low input systems. Further understanding nodulation genetic mechanisms could be a relevant option to facilitate the improvement of yield and lift up soil without synthetic fertilizers. We used a subset of 83 chromosome segment substitution lines (CSSLs) derived from the cross between a wild synthetic tetraploid AiAd (*Arachis ipaensis* × *Arachis duranensis*)$^{4\times}$ and the cultivated variety Fleur11, and evaluated them for traits related to BNF under shade-house conditions. Three treatments were tested: without nitrogen; with nitrogen; and without nitrogen, but with added0 *Bradyrhizobium vignae* strain ISRA400. The leaf chlorophyll content and total biomass were used as surrogate traits for BNF. We found significant variations for both traits specially linked to BNF, and four QTLs (quantitative trait loci) were consistently mapped. At all QTLs, the wild alleles decreased the value of the trait, indicating a negative effect on BNF. A detailed characterization of the lines carrying those QTLs in controlled conditions showed that the QTLs affected the nitrogen fixation efficiency, nodule colonization, and development. Our results provide new insights into peanut nodulation mechanisms and could be used to target BNF traits in peanut breeding programs.

Keywords: peanut; symbiosis; wild species; sustainable agriculture; plant nutrition

Communications orales

1. Mapping of QTL associated with biological nitrogen fixation traits in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using an interspecific population.
   - *15ème Rencontre plantes-Bactéries-24 au 28 janvier 2022.*

Darius Nzepang T., Arlette Zaïya Z., Maïmouna Cissoko, Djamel Gully, Valérie Hocher, Saliou Fall, Daniel Fonceka, Sergio Svistoonoff.

Abstract: Biological nitrogen fixation (BNF) is an important economic and environmental process, which has been poorly integrated in legume breeding programs. Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is an allotetraploid grain legume cultivated for oil and food uses. Peanut is mainly cultivated by poor farmers in Africa without fertilizers and in soil with low fertility (particularly N & P). Improving BNF in peanut could be of great interest to increase yield and lift-up soil fertility. We used an interspecific population to map quantitative trait loci (QTLs) involved in BNF traits in peanut. A subset of 83 chromosome segment substitution lines (CSSLs) developed by crossings between a wild synthetic tetraploid AiAd (*A. ipaensis* × *A. duranensis*)$^{4\times}$ and cultivated variety Fleur11 was evaluated for BNF under glasshouse. Three conditions were tested: - N, + N and - N + inoculation with an efficient *Bradyrhizobium* strain, ISRA 400. Traits related to BNF such as chlorophyll content, and biomass were recorded. Significant variations of the response to inoculation were observed for all traits. We used genotype/phenotype associations to map 12 QTLs linked to these traits and found positive or negative effects with inoculated plants. A detailed characterization of the corresponding lines in controlled conditions showed that wild introgressions affected nitrogen fixation efficiency, nodule colonization and development and have also an impact on strain compatibility. Our results provide new approaches to understand peanut BNF in Senegal and to target the BNF trait in peanut breeding programs.

2. QTL mapping associated of biological nitrogen fixation and agronomic traits in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using an interspecific population.
   - *Atelier du peanut innovation Lab, PIL*- 06 au 08 septembre 2022, Saly, Sénégal
   - *19ème Congrès de l'Association Africaine pour la Fixation Biologique de l'azote, AABNF- 28 novembre au 02 décembre 2022, Dakar, Sénégal.*

Darius Nzepang T., Arlette Zaïya Z., Maïmouna Cissoko, Djamel Gully, Valérie Hocher, Saliou Fall, Daniel Fonceka, Sergio Svistoonoff.

Abstract: Biological nitrogen fixation (BNF) is an important economic and environmental process, which can better be valorised in legume breeding programs. Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is an allotetraploid grain legume cultivated for oil and food uses. Peanut is mainly cultivated by poor farmers in Africa, in soil with low fertility (particularly N & P) and in low input systems. Improving BNF in peanut is one relevant option for increasing yield and lift-up soil fertility. In this study, a subset of eighty-three chromosome segment substitution lines (CSSLs) derived from the cross between a wild synthetic tetraploid AiAd (*A. ipaensis* × *A. duranensis*)$^{4\times}$ and the cultivated variety Fleur11 was evaluated for BNF traits under shade-house conditions. Three treatments were tested: - N, + N, and - N + inoculated with an efficient *Bradyrhizobium* sp. ISRA400. Chlorophyll content, and biomass were as surrogate traits for BNF. Significant variations of the response to inoculation were observed for all traits. We mapped 06 QTLs linked to these traits in the inoculated treatment. At all these QTLs, the wild alleles decreased the value of the trait indicating a negative effect on BNF. A detailed characterization of the lines carrying those QTLs in controlled conditions showed that the QTLs action affected nitrogen fixation efficiency, nodule colonization, and development. Fine mapping is underway

to identify the molecular basis of two QTLs showing a strong effect. CCSLs population was also analyzed in Senegalese fields by repeating the QTL mapping experiments. Two experiments allowed the identification of 28 QTLs linked to yield components, that included most QTLs previously found in controlled conditions. Our results provide interesting new information on the genetic aspects of peanut BNF and contribute to understanding the impact of breeding on the nitrogen fixation efficiency of cultivated peanut in Senegal.

3. Study of QTL effects on peanut-*Bradyrhizobium* specificity
   - *Séminaire scientifique à l'Université de Rio Cuarto, à l'institut de biotechnologie et biologie moléculaire de l'Université nationale de La Plata, et à l'institut de physiologie végétale et des ressources génétiques de Cordoba, mars-2023 en Argentine.*

Darius Nzepang T., Djamel Gully, Valérie Hocher, Saliou Fall, Daniel Fonceka, Sergio Svistoonoff.

Abstract: The choice of partner (specificity) is a key factor in the establishment of an effective legume-*rhizobia* symbiosis. However, the genetic mechanisms underlying this specificity remain little known in legumes such as peanut. In our previous work, we identified 04 QTLs (wild introgressions) associated to the reduction of nitrogen fixation efficiency with Bradyrhizobium vignae strain ISRA400 in controlled conditions, and yield components in nitrogen-depleted farmers' fields. In this study we studied the effects of these QTLs on peanut specificity, by using a diversity of *rhizobia* associated with peanut cultivated in Senegal. Our results showed that QTLs located on chromosomes A02, A03, and B02 lead to late incompatibility or nitrogen fixation incompatibility with native *rhizobia* from Senegal soils. Cytological analyzes showed that this incompatibility could be compared to a mechanism of "sanction" of nodules that is little or ineffective, which manifests itself by an alteration of the infection of plant cells and/or by a significant proportion of dead bacteroids inside the plant cells. The analysis of the genes contained in these QTLs allowed us to identify 15 orthologs of symbiotic genes, among which *MtCRE1* and *GMSN1* on chromosome A03, and *MtVAMP72* and *LjFEN1* on chromosomes A02 and B02 would be potential candidate genes. Our work provides preliminary information to understand the genetic mechanisms involved in late incompatibility in peanut.

Posters

1. Mapping of QTL associated with biological nitrogen fixation traits in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using an interspecific population
   - *Conférence Intensification durable, CID- 23 au 28 novembre 2021, Dakar Sénégal*
   - *PhDays/Agapiales*-23 au 25 mai 2022, Montpellier, France.

2. Transcriptomic analyses of two homeologous wild genomic regions involved in root nodule symbiosis on chromosomes A02 and B02 in peanut (*Arachis hypogaea* L.)
   - *19ème Congrès de l'Association Africaine pour la Fixation Biologique de l'azote, AABNF- 28 novembre au 02 décembre 2022, Dakar, Sénégal.*

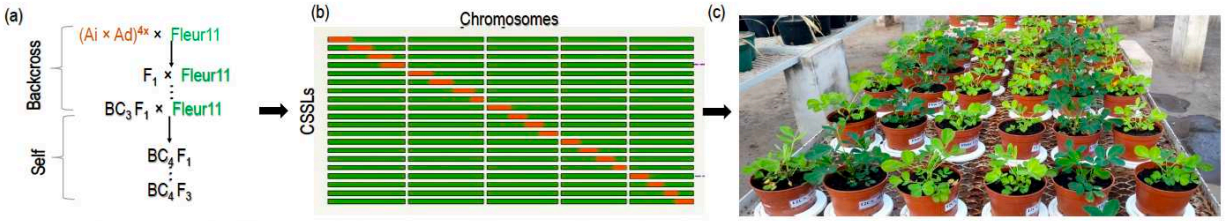
Mapping of QTLs associated with biological nitrogen fixation traits in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using an interspecific population.

Nzepang D[1,2,4], Zaïya Zazou A[1,3], Cissoko M[2,5], Gully D[2,5], Hocher V[2,5] , Fall S[1,2], Fonceka D[4,6], & Svistoonoff S[2,5]

[1] LCM (IRD/ISRA/UCAD), Dakar, Senegal [2] LMI LAPSE, Dakar, Senegal; [3] IRAD, Yaounde, Cameroon; [4] CERAAS, Thiès Senegal; [5]UMR LSTM (IRD/CIRAD/INRA/Université Montpellier/Supagro), Montpellier, France; [6]CIRAD, UMR AGAP, Montpellier, France.

INTRODUCTION Groundnut is an important grain legume, mainly cultivated in Africa by poor farmers in poor soil and with suboptimal fertilization. Improving biological nitrogen fixation (BNF) in groundnut could be of great interest to increase yield and lift-up soil fertility. The aim of this study was to use chromosome segment substitution lines (CSSLs) population for the identification of quantitative trait loci (QTLs) involved in BNF.

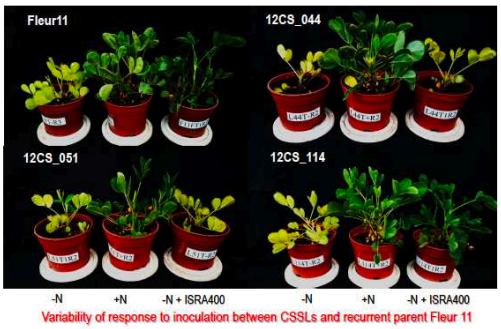
MATERIAL AND METHODS 83 CSSLs (BC4F3) developed by crossing a wild synthetic tetraploid AiAd (*A. ipaensis* × *A. duranensis*)^{4x} and the cultivated variety Fleur 11 (Fonceka et *al.*, 2012), were grown in a shadehouse. For each line, 03 conditons were tested: - N, + N and - N inoculated with an efficient Senegalese *Bradyrhizobium* sp. strain (ISRA 400). Traits related to BNF efficiency such as chlorophyll content, shoot and root dry weight were recorded after 9 weeks



(a) Breeding scheme for the development of the CSSLs population. **(b)** Graphical illustration of CSSLs genotypes. The maps of linkage groups are represented vertically. CSSLs are depicted horizontally. The brown areas represent the wild chromosome segments, while the green areas represent Fleur11 genetic background. **(c)** Shadehouse experiment.

RESULTS

1. Evaluation of biological nitrogen fixation in CSSLs



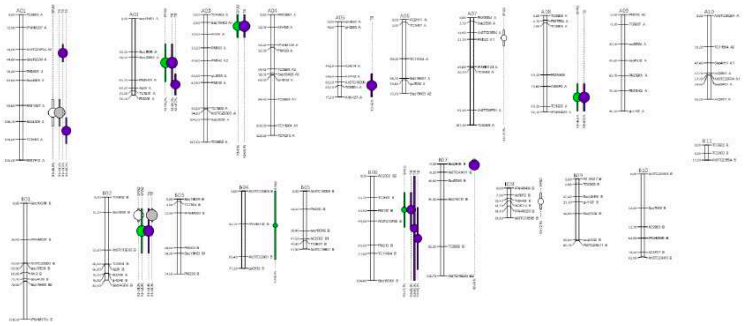
Variability of response to inoculation between CSSLs and recurrent parent Fleur 11



Morphological variation in root nodules between Fleur 11 and contrasted lines
A: Fleur 11; B: 12CS_044; C: 12CS_114.

2. QTL mapping

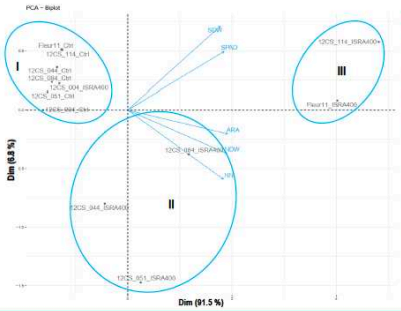
QTLs were detected by performing Dunnet's test comparison between CSSLs and Fleur 11 for each trait related to BNF.



12 genomic regions containing QTLs potentially involved in biological nitrogen fixation.

The maps of linkage groups are named from A01 to A10 (A-genome) and B01 to B11 (B-genome) and are represented vertically. Each color represents one trait: Green= chlorophyll content (SPAD), Purple = Total biomass (TB). White and Gray represent putative QTL in wild supplementary chromosome segments respectively to SPAD and TB. QTL The size of each circle is proportional to its relative effect. All identified QTLs have a negative effects on traits studied.

3. Characterization of 05 contrasting CSSLs to Fleur11



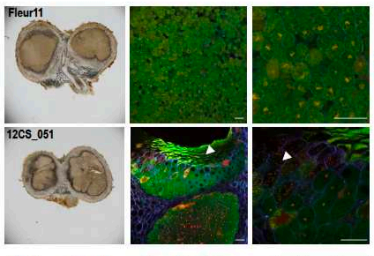
A detailed characterization of this 05 CSSLs with a Principal Component Analysis (98.6% of variance) showed that the corresponding QTLs / wild introgressions affected nitrogen efficiency and nodule organogenesis.

I: No nitrogen fixation;

II: Low nitrogen fixation;

III: High nitrogen fixation

SDW: shoot Dry weight; ARA: Nitrogenase activity; NDW: Nodule dry weight; NN: nodule number; SPAD: Chlorophyll content



Plant cells infected by differentiated bacteria

Plant cells infected by differentiated bacteria. Presence of necrotic tissue (white arrow) can explain low nitrogen fixation

Nodule sections observed to confocal microscope (scale bar: 50 µm) showing bacterial colonization with live and dead bacteria respectively in green and red, and plant cell wall in purple

Conclusion These results could be exploited to understand genetic basis of BNF in peanut and offer interesting possibilities to target BNF traits in peanut breeding programms. Mapping field experiments and transcriptomic studies are in progress to explore this possibilities.

3ème édition de la Conférence Intensification Durable 2021, Dakar
ADAPTATION ET RESILIENCE DES AGRICULTURES EN AFRIQUE DE L'OUEST : INNOVATIONS AGROECOLOGIQUES ET INTEGRATION DES TERRITOIRES
23 au 26 novembre 2021

Acknowledgements

DAAD FONDATION AVRIL

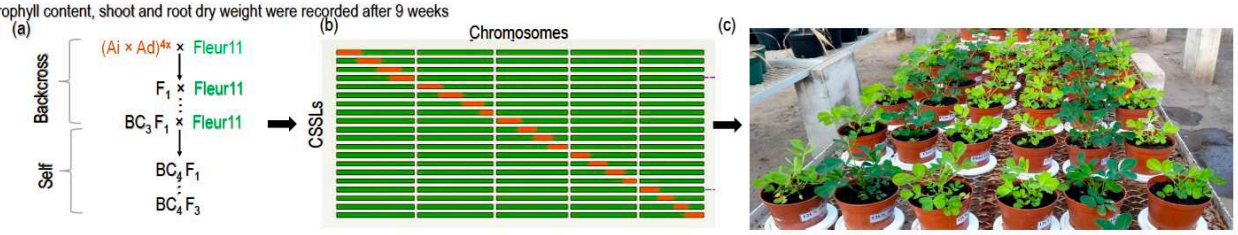
Mapping of QTLs associated with biological nitrogen fixation traits in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using an interspecific population.

Nzepang D[1,2,4], Zaïya Zazou A[1,3], Cissoko M[2,5], Gully D[2,5], Hocher V[2,5] , Fall S[1,2], Fonceka D[4,6], & Svistoonoff S[2,5]

[1] LCM (IRD/ISRA/UCAD), Dakar, Senegal [2] LMI LAPSE, Dakar, Senegal; [3] IRAD, Yaounde, Cameroon; [4] CERAAS, Thiès Senegal; [5]UMR LSTM (IRD/CIRAD/INRA/Université Montpellier/Supagro), Montpellier, France; [6]CIRAD, UMR AGAP, Montpellier, France.

INTRODUCTION Groundnut is an important grain legume, mainly cultivated in Africa by poor farmers in poor soil and with suboptimal fertilization. Improving biological nitrogen fixation (BNF) in groundnut could be of great interest to increase yield and lift-up soil fertility. The aim of this study was to use chromosome segment substitution lines (CSSLs) population for the identification of quantitative trait loci (QTLs) involved in BNF.

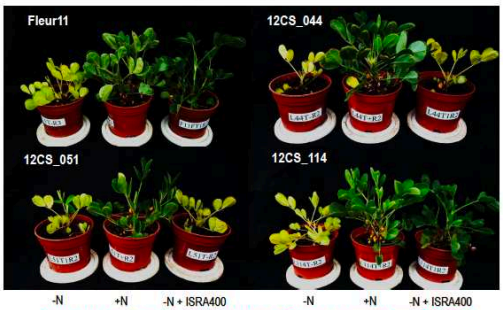
MATERIAL AND METHODS 83 CSSLs (BC4F3) developed by crossing a wild synthetic tetraploid AiAd (*A. ipaensis* × *A. duranensis*)^{4x} and the cultivated variety Fleur 11 (Fonceka et *al.*, 2012), were grown in a shadehouse. For each line, 03 conditons were tested: - N, + N and - N inoculated with an efficient Senegalese *Bradyrhizobium* sp. strain (ISRA 400). Traits related to BNF efficiency such as chlorophyll content, shoot and root dry weight were recorded after 9 weeks



(a) Breeding scheme for the development of the CSSLs population. **(b)** Graphical illustration of CSSLs genotypes. The maps of linkage groups are represented vertically. CSSLs are depicted horizontally. The brown areas represent the wild chromosome segments, while the green areas represent Fleur11 genetic background. **(c)** Shadehouse experiment.

RESULTS

1. Evaluation of biological nitrogen fixation in CSSLs



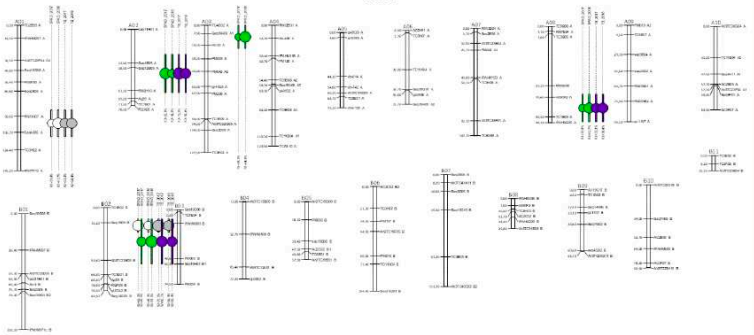
Variability of response to inoculation between CSSLs and recurrent parent Fleur 11



Morphological variation in root nodules between Fleur 11 and contrasted lines
A: Fleur 11; B: 12CS_044; C: 12CS_114.

2. QTL mapping

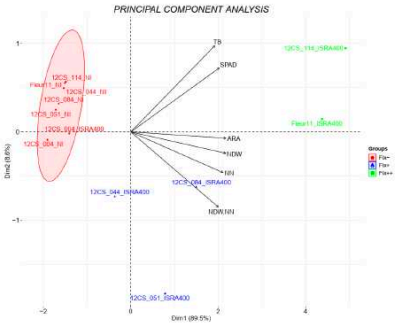
QTLs were detected by performing Dunnet's test comparison between CSSLs and Fleur 11 for each trait related to BNF.



06 QTLs with high repeatability are potentially involved in biological nitrogen fixation.

The maps of linkage groups are named from A01 to A10 (A-genome) and B01 to B11 (B-genome) and are represented vertically. Each color represents one trait: Green= chlorophyll content (SPAD), Purple = Total biomass (TB). White and Gray represent putative QTL in wild supplementary chromosome segments respectively to SPAD and TB. QTL The size of each circle is proportional to its relative effect. All identified QTLs have a negative effects on traits studied.

3. Characterization of 05 contrasting CSSLs to Fleur11



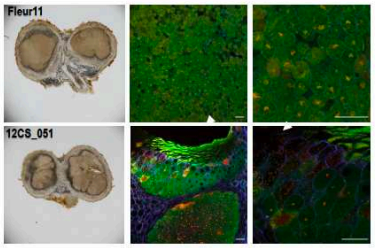
A detailed characterization of this 05 CSSLs with a Principal Component Analysis (98.6% of variance) showed that the corresponding QTLs / wild introgressions affected nitrogen efficiency and nodule organogenesis.

Fix-: No nitrogen fixation;

Fix+: Low nitrogen fixation;

Fix++: High nitrogen fixation

SDW: shoot Dry weight; ARA: Nitrogenase activity; NDW: Nodule dry weight; NN: nodule number; SPAD: Chlorophyll content



Plant cells infected by differentiated bacteria

Plant cells infected by differentiated bacteria. Presence of necrotic tissue (white arrow) can explain low nitrogen fixation

Nodule sections observed to confocal microscope (scale bar: 50 µm) showing bacterial colonization with live and dead bacteria respectively in green and red, and plant cell wall in purple

Conclusion These results could be exploited to understand genetic basis of BNF in peanut and offer interesting possibilities to target BNF traits in peanut breeding programms. Mapping field experiments and transcriptomic studies are in progress to explore this possibilities.

PHDays & Agapiales 2022

May 23rd, 24th and 25th, 2022 in Montpellier

Acknowledgements

DAAD

FONDATION AVRIL

TRANSCRIPTOMIC ANALYSES OF TWO HOMEOLOGOUS WILD GENOMIC REGIONS INVOLVED IN ROOT NODULE SYMBIOSIS ON CHROMOSOMES A02 AND B02 IN PEANUT (*Arachis hypogaea L.*)

Nzepang D[1,2,3,4]; **Cissoko M**[1,2,3]; Gully D[3]; Hocher V[1,2,3]; Fall S[1,2]; Fonceka D[4,5]; Nguepjop JR[4,5]; Sambou A.[4]; Sergio Svistoonoff[3]

[1]Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD, BP1386, Dakar, Sénégal. Email: maimouna.cissoko@ird.fr
[2]Laboratoire mixte international Adaptation des Plantes et microorganismes associés aux Stress Environnementaux (LAPSE), Centre de Recherche de Bel Air; Dakar; Sénégal
[3]Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Uniyé Mixte de recherche Plante Health institute of Mediterane (UMR PHIM), Montpellier, France
[4]Centre d'Etude Regional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Secheresse (CERAAS) ISRA/ Thiés
[5] IRAD, UMR AGAP, Montpellier, France

INTRODUCTION

The legume-rhizobia symbiosis injects approximately 40 million tonnes of nitrogen into cropping systems every year (1). Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) is the second most common grain legume produced in the world. Very cultivated in sub-Saharan Africa, particularly in Senegal, peanuts are of food, environmental and economic importance. Peanut is an allotetraploid, with closely related subgenomes respectively A and B (2). To improve Biological Nitrogen Fixation (BNF), variability in BNF efficiency has been used to map QTLs (quantitative trait loci) linked to BNF using a Chromosome Segment Substitution Lines (CSSL) population developed by (3).

We identified two CSSLs (corresponding to CSS Line 44 and 51) that showed N-deficiency symptoms such as reduced growth and strong chlorosis despite the presence of numerous nodules that were shown to lack rhizobia infection. In this study, we further characterized these 2 CSS Lines. We inoculated Line 44 and 51 and the recurrent parent Fleur11 (as control) with an efficient *Bradyrhizobium vignae* sp. ISRA400. We used a RNA-Seq approach to analyse gene expression profiles during the development of the nodules.

OBJECTIVES

The objective of this study is to understand the effect of the 2 putative QTLs at the molecular level by characterizing gene expression during the nodulation process.



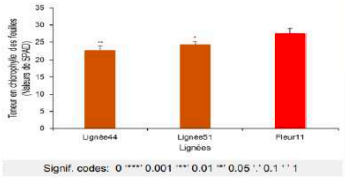
MATERIAL AND METHODS

- Cultivated peanut Fleur 11, CSSL lines 44 and 51 were grown under controlled conditions (3)
- Plants were inoculated with efficient–*Bradyrhizobium vignae* ISRA 400 (4)
- Root systems were collected at 0 and 21 dpi and total RNA extracted
- Library construction and sequencing was realised using Illumina Hiseq technology by MGX (Montpellier France)
- Data were analysed using edgeR package (5)

CSS lines 44 and 51 characteristics

Lines	Chromosome	Length (Mpb)	QTL effect
L44	B02	72	Decrease in • total biomass • leaf chlorophyll content • nitrogenase activity.
L51	A02	63	

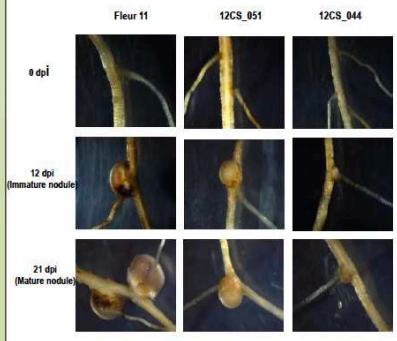
Two homeologous QTLs carried by chromosomes A02 (line 51) and B02 (line 44) showed considerable deleterious effects on nodulation and nitrogen fixation.



Dunnett's test showed that leaf chlorophyll content of CSSLs was significantly decreased compared to Fleur11.

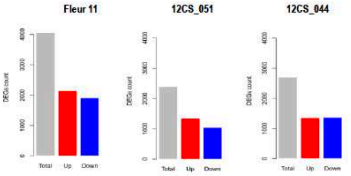
RESULTS

Kinetic of nodule development



Compared to the recurrent parent Fleur 11, the lines 44 and 51 develop numerous nodules, small in size and white in color and low symbiotic efficiency

Identification of differentially expressed genes

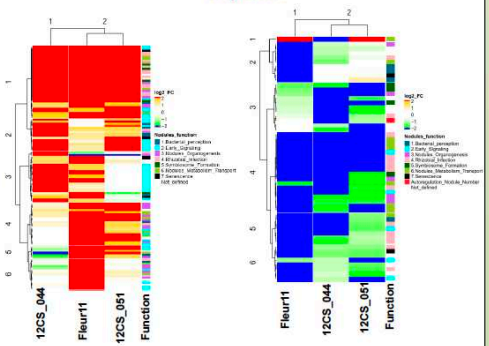


Differentially expressed genes between inoculated and non-inoculated conditions for each genotype



Common and specific DEGs up- and down-regulated in Fleur 11 and the 2 CSS Lines

Symbiotic genes among DEGs up and down - regulated



Heat map of differentially expressed symbiotic genes in the 3 genotypes (Fleur 11, L44 and L 51) revealed different pattern between the two CSS Lines..

CONCLUSION

These results show that wild introgression carried by two CSSLs affect nodulation process and thus Biological Nitrogen Fixation at different steps including rhizobia infection, nodule organogenesis and functioning. Interestingly, homeologous QTLs exhibited different effects on symbiotic genes expression suggesting differential control on gene expression in subgenomes in *A. hypogeae*.
These data are still under analyses to precise gene candidates, that could be further functionally studied.

REFERENCES

1 Herridge *et al.*, 2008 Plant and Soil 311:1–18
2 Bertioli *et al.*, 2016 Nat Genet 48:438-446
3 Fonceka *et al* 2012 *PLoS One*, 7(11), e48642
4 Zayia Zazou *et al* 2018 *Agriculture, Ecosystems, Environment*
5 Robinson *et al.*, 2010 *Bioinformatics*. 2010 139–140.

ACKOWLEDGEMENTS

LAPSE · IRD · ISRA · LABORATOIRE COMMUN DE MICROBIOLOGIE LCM · CERAAS · agAp Institut

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER / THÈSE DE DOCTORAT UNIQUE
En partenariat international avec l'UNIVERSITÉ CHEKH ANTA DIOP DE DAKAR
Spécialité : Biologie, Intégrative, Diversité et Amélioration des Plantes

Nom et prénom : NZEPANG TCHOUTANG Darius

Titre : Utilisation des espèces sauvages pour comprendre et améliorer la symbiose fixatrice d'azote chez l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.**) au Sénégal.**

Résumé : L'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.) est la légumineuse à graines oléo-protéagineuses la plus cultivée au Sénégal. À travers l'établissement d'une symbiose fixatrice d'azote (SFA) avec les bactéries du sol appelées « *rhizobia* », elle est capable d'assurer ses besoins en azote, mais également de fournir de l'azote aux cultures céréalières associées ou subséquentes dans les agrosystèmes ruraux. L'optimisation de la SFA de l'arachide cultivée est d'un intérêt capital pour garantir la résilience de ces agrosystèmes. Cependant, la SFA n'est pas spécifiquement intégrée dans les programmes de sélection variétale de l'arachide cultivée au Sénégal, et les mécanismes génétiques impliqués dans ce processus symbiotique demeurent peu connus. L'objectif général de cette thèse est d'optimiser et de comprendre la SFA chez l'arachide cultivée au Sénégal, en utilisant une population de 83 lignées substitutions de segments chromosomiques (CSSL), issue d'un croisement interspécifique entre la variété cultivée Fleur11 et un tétraploïde synthétique AiAd (*Arachis ipaensis* × *Arachis duranensis*)$^{4\times}$. Dans cette étude, l'évaluation en conditions semi-contrôlées de l'efficacité symbiotique au sein de la population CSSL, inoculée avec la bactérie efficace *Bradyrhizobium vignae* ISRA400 native des sols du Sénégal, a permis de cartographier 04 QTL stables associés à la SFA sur les groupes de liaison (GL) A02, A03, A08, et B02. Les allèles sauvages à tous les QTL identifiés, ont entraîné une diminution considérable de l'efficacité symbiotique. En outre, les allèles sauvages aux QTL identifiés sur les GLs A02, A03 et B02, ont également été associés à une forte diminution des composantes du rendement sur des parcelles paysannes pauvres en azote. Ce qui suggère que les espèces sauvages utilisées pour cette population CSSL ne fournissent pas des allèles favorables à l'amélioration de SFA de l'arachide cultivée. Une analyse de l'effet des QTL identifiés en relation avec la diversité des souches de *Bradyrhizobium* nodulant l'arachide cultivée dans les sol sénégalais a mis en évidence des faibles efficacité symbiotiques pour l'ensemble des souches testées. Une analyse RNA-Seq nous a permis de comparer l'expression de gènes dans les nodules de Fleur11 et des CSSL 12CS_051 et 12CS_044. Pour la CSSL 12CS_051, cette analyse nous a permis d'identifier l'orthologue du gène *LjFEN1*/*Arahy.R43499*, qui pourrait être responsable des variations phénotypiques causées par le QTL sur le GL A02. Une cartographie fine du QTL a été effectuée avec la CSSL 12CS_044, mais les résultats obtenus indiquent que le QTL ne se trouve pas dans la région ciblée sur le GL B02. Nos travaux ont permis de générer de nouvelles connaissances utiles à l'intégration de la SFA dans l'amélioration variétale de l'arachide cultivée au Sénégal, et fournissent des outils pour mieux comprendre le processus symbiotique de l'arachide.

Mots clés : arachide, symbiose fixatrice d'azote, QTL, espèces sauvages, sélection variétale.

UNIVERSITY OF MONTPELLIER / PhD THESIS
In international partnership with the UNIVERSITY CHEIKH ANTA DIOP OF DAKAR
Speciality: Biology, Integrative, Diversity and Plant Breeding

Name and first name: NZEPANG TCHOUTANG Darius

Title: Use wild species to understand and improve nitrogen-fixing symbiosis in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* **L.) in Senegal.**

Summary: Cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) is the most cultivated oil-protein seed legume in Senegal. Through the establishment of a nitrogen-fixing symbiosis (SFA) with soil bacteria called "*rhizobia*", it can meet its nitrogen needs, but also to provide nitrogen for associated or subsequent crops such as cereals in rural farming systems. Optimization of SFA in cultivated peanut is of key interest to ensure the resilience of these rural farming systems. However, SFA is not specifically integrated into breeding programs of peanut in Senegal, and the genetic mechanisms involved in this symbiotic process are still little known. The main objective of this thesis is to optimize and understand SFA of cultivated peanut in Senegal, using a population of 83 chromosome segment substitution lines (CSSL), derived from an interspecific cross between the cultivated Fleur11 variety and a tetraploid synthetic AiAd (*Arachis ipaensis* × *Arachis duranensis*)$^{4\times}$. In this study, the evaluation in semi-controlled conditions of the symbiotic efficiency within the CSSL population, inoculated with an effective *Bradyrhizobium vignae* strain ISRA400 native to Senegalese soils, allowed us to map consistently 04 QTL associated to SFA on the linkage groups (GL) A02, A03, A08, and B02. At all QTL, the wild alleles strongly decrease symbiotic efficiency. In addition, the wild alleles at the QTL on GLs A02, A03 and B02 were also associated with a strong reduction of agronomic traits on farmer's fields with low inputs systems. These results suggests that the wild species used for the development of this CSSL population do not provide new alleles favorable for the improvement of SFA in cultivated peanut. An analysis of the QTL effects in relation to the diversity of *Bradyrhizobium* strains able to form nodules with peanut cultivated in Senegalese soil revealed low symbiotic efficiency for all the strains tested. RNA-Seq analysis allowed us to compare gene expression during nodulation process between Fleur11 and CSSL 12CS_051 and 12CS_044. For CSSL12CS_051, this analysis allowed us to identify the ortholog of nodulation gene *LjFEN1*/*Arahy.R43499* gene, which could be responsible for the phenotypic variations caused by the QTL on GL A02. Fine mapping of the QTL was carried out with CSSL 12CS_044, but the results obtained indicate that the QTL is not found in the region targeted on GL B02. Our work has generated new knowledge useful for the integration of SFA in peanut breeding programs and provides tools to better understand peanut nodulation process.

Keys words: cultivated peanut, nitrogen-fixing symbiosis, QTL, wild species, plant breeding.