



**HAL**  
open science

# Compréhension des mécanismes directs et indirects de résistance à la pourriture racinaire du pois causée par *Aphanomyces euteiches* : influence du choix variétal et de la cohorte microbienne associée.

Pauline Lusley

## ► To cite this version:

Pauline Lusley. Compréhension des mécanismes directs et indirects de résistance à la pourriture racinaire du pois causée par *Aphanomyces euteiches* : influence du choix variétal et de la cohorte microbienne associée.. Sciences agricoles. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR091 . tel-03185239

**HAL Id: tel-03185239**

**<https://theses.hal.science/tel-03185239>**

Submitted on 30 Mar 2021

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

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



Normandie Université

## THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES

Préparé au sein de l'Université de Rouen Normandie

**Compréhension des mécanismes directs et indirects de résistance à la pourriture racinaire du pois causée par *Aphanomyces euteiches* : influence du choix variétal et de la cohorte microbienne associée.**

Présentée et soutenue par  
**Pauline LUSLEY**

Thèse soutenue publiquement le 16/10/2020  
devant le jury composé de

Dr Odile BERGE	Chargée de recherche (HDR), Unité de recherches de Pathologie Végétale, INRAE PACA	Rapporteuse
Pr Sylvain JEANDROZ	Professeur, pôle Interactions Plante Microorganismes (IPM), UMR Agroécologie, AgroSup Dijon	Rapporteur
Pr Azeddine DRIOUICH	Professeur, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV), EA 4358, Université de Rouen Normandie	Examineur
Pr Marc BARDIN	Directeur de recherche et d'unité, Unité de recherches de Pathologie Végétale, INRAE PACA	Examineur
Dr Lucie MICHE	Maître de conférences, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Écologie marine et continentale (IMBE), Université Aix Marseille	Examinatrice
Dr Adrien GAUTHIER	Enseignant-Chercheur, Unité AGHYLE, Institut Polytechnique UniLaSalle, Rouen	Examineur
Dr Karine LAVAL	Directrice de la recherche, Institut Polytechnique UniLaSalle, Rouen	Directrice de thèse
Dr Mélanie Bressan	Chargée de recherche, Unité AGHYLE, Institut Polytechnique UniLaSalle, Rouen	Co-encadrante de thèse

Thèse dirigée par Karine LAVAL et co-encadrée par Mélanie BRESSAN, Unité AGHYLE.





## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier ma directrice de thèse, Karine LAVAL, de m'avoir choisie pour réaliser cette thèse et pour la confiance qu'elle m'a donnée. Je remercie également UniLaSalle, Philippe CHOQUET et Marie LUMMERZHEIM, pour leur accueil et leur bienveillance.

Je remercie Isabelle TRINSOUTROT-GATTIN, directrice du laboratoire AGHYLE, qui m'a accueillie et soutenue, parfois avec des paroles douces et motivantes, parfois avec des chocolats. Tant de douceur dans une seule femme...

Je remercie ensuite une personne très importante dans ma thèse, qui a été riche en suggestions, un soutien scientifique et technique, mon encadrante Mélanie BRESSAN. Dans les moments difficiles où la science se complexifiait, elle a su me montrer différentes solutions pour démêler les nœuds. Mélanie a su également prendre en considération mes contraintes personnelles et a fait preuve d'un grand réconfort dans mes périodes difficiles. Je remercie également Mélanie pour l'aide précieuse dans mon travail de rédaction de thèse, qui m'a fait progresser.

Je remercie également mon deuxième encadrant, Adrien GAUTHIER, malgré son emploi du temps « enseignement » surchargé, il a su se libérer dans les moments cruciaux.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté d'être rapporteurs et examinateurs, Dr Odile BERGE, Pr Sylvain JEANDROZ ainsi que tous les examinateurs, Pr Azeddine DRIOUICH, Pr Marc BARDIN et Dr Lucie MICHE.

Je remercie les membres de mon comité de suivi individuel, qui m'ont suivi durant ces trois années, Pr Pascal FAVREL, Dr Marie-Odile BANCAL, Dr Nicolas FABRE et Dr Thomas CLAMENS. Ils ont eu un regard extérieur sur ma thèse et sur les axes d'étude initialement prévus, ce qui a permis de recadrer lorsque nécessaire.

Je remercie toute l'équipe de salariés UniLaSalle, j'ai pu interagir avec le corps administratif, informatique et enseignant avec facilité et bienveillance. J'ai évidemment des remerciements spécifiques à faire à l'équipe technique du laboratoire AGHYLE, Lisa CASTEL, Magalie MANIEZ, Anne CAUCHOIS, Maëva LEPLET-TALLEUR, et j'en oublie sûrement (certaines sont parties ^^ Hélène par exemple), pour m'avoir aidé à accomplir mes recherches !

Je remercie infiniment, David HASTINGS et Wilfried DUFOUR, mes deux professeurs d'anglais, qui m'ont fait significativement progresser dans mon anglais informel et mon anglais scientifique.

Je remercie ensuite mes camarades doctorants, extrêmement importants dans les moments de « craquage cérébral » et dans les rushs. Je me souviendrai toujours de Cyrine REZGUI, déposant les graines de pois sur mes boîtes gélosées stériles à 18h45 pour me filer un coup de pouce, histoire que je n'arrive pas après 20H chez la nounou ! Mehdi... Céline Dion est à jamais liée à toi (Charlotte AMY ;-)) Je n'en dis guère plus.

J'ai maintenant des remerciements profonds à faire à ma famille et mes amis. Oh Dieu sait combien vous avez été importants pendant cette thèse. Je ne détaillerai pas ma vie personnelle dans ce joli manuscrit de thèse mais je vais tout de même dire un énorme merci à Jacqueline Thélot et son mari Jean-Pierre THELOT, mes grands-parents, pour m'avoir donné de la force (petite anecdote, nourrie à la cuillère par J. THELOT ^^). Un énorme merci à Baloune et Mamie Doudou (parents) qui ont aussi été là dans cette période dure due à un problème personnel et qui ont aussi été là pour garder mon rayon de soleil, petit Pierre. J'ai une famille formidable, un frère, une sœur, deux sœurs par alliance et leurs conjoints et conjointe respectifs qui sont extraordinaires, plein de joie et surtout qui me font vivre des moments inoubliables (bon j'avoue la p'tite virée en bateau avec le phoque restera gravée dans ma mémoire pendant la rédaction de thèse). Je remercie aussi mes 3 neveux et mes 4 nièces pour me faire passer des moments inoubliables, par vidéos pour les oreilles ^^ (Calédoniens) et en live pour d'autres. Je remercie également Tiphaine VIDAL, Sébastien BAROT, Sébastien SAINT-JEAN, Claude POPE et toute l'équipe de l'INRA de Grignon avec qui je bavarde toujours soit scientifiquement, soit amicalement.

Enfin, les personnes les plus importantes de ma vie... merci à mes deux rayons de soleil, Romain Bolis, mon conjoint et Pierre mon fils.

1	Introduction générale .....	1
1.1	Les légumineuses à graines, ressources agronomiques d'intérêt .....	1
1.2	Le pois protéagineux en France.....	3
1.3	Quels sont les enjeux de la culture du pois protéagineux ?.....	5
1.3.1	Enjeux agronomiques.....	5
1.3.2	Enjeux économiques .....	7
1.3.3	Enjeux environnementaux.....	7
1.3.4	Enjeux alimentaires .....	9
2	Synthèse bibliographique.....	15
2.1	Le pois, <i>Pisum sativum</i> L. ....	15
2.1.1	Histoire et classification .....	15
2.1.2	Génétique du pois et variétés de pois protéagineux .....	15
2.1.3	Morphologie et croissance du pois.....	17
2.1.4	La culture du pois : principaux ravageurs et maladies.....	21
2.2	La pourriture racinaire du pois .....	23
2.2.1	Symptômes et conséquences .....	23
2.2.2	Classification d' <i>Aphanomyces euteiches</i> .....	25
2.2.3	Spectre d'hôtes et virulence .....	25
2.2.4	Cycle de vie.....	27
2.2.5	Facteurs impactant la pourriture racinaire causée par <i>A. euteiches</i> .....	29
2.2.6	Distribution spatiale d' <i>Aphanomyces euteiches</i> .....	31
2.3	Moyens de lutte contre la pourriture racinaire du pois provoquée par <i>A. euteiches</i> .	31
2.3.1	Utilisation de produits phytosanitaires.....	31
2.3.2	Diagnostic préventif et prédictif de la maladie .....	33
2.3.3	Sélection variétale .....	33
2.3.4	Leviers agronomiques .....	35
2.3.5	Exploiter les mécanismes de défense racinaire du pois .....	37
2.3.6	Lutte biologique .....	39
2.3.6.1	Utilisation de microorganismes comme agent de lutte contre les pathogènes	39
2.3.6.2	Mécanismes d'action .....	41

2.3.6.2.1	Résistance systémique induite et phénomène de priming.....	41
2.3.6.2.2	Compétitions pour les nutriments et l'espace .....	43
2.3.6.2.3	Antagonisme direct par hyperparasitisme.....	45
2.3.6.2.4	Antibiose par production de métabolites à propriété antimicrobienne .....	45
2.3.6.2.5	Stimulation de la croissance des plantes .....	47
2.3.6.3	Innovations et tendances actuelles .....	47
2.4	Interactions plantes - microorganismes .....	49
2.4.1	La rhizosphère : hotspot de diversité et d'interactions.....	49
2.4.2	Le microbiome à la rescousse .....	51
2.4.2.1	Au service de la nutrition des plantes.....	53
2.4.2.2	Au service de la protection contre les maladies .....	55
2.4.3	Cas particulier des relations symbiotiques chez les légumineuses .....	55
2.4.3.1	La nodulation par des bactéries fixatrices d'azote .....	57
2.4.3.2	Les microorganismes endophytes .....	63
2.4.3.3	Les champignons mycorhiziens arbusculaires .....	67
2.4.4	La notion de pathobiome.....	73
3	Projet de recherche.....	79
3.1	1 <sup>er</sup> axe de recherche : L'expression de la pourriture racinaire fluctue-t-elle en fonction du type variétal du pois protéagineux ?.....	83
3.2	2 <sup>ème</sup> axe de recherche exploratoire : La diversité bactérienne intra-nodules du pois protéagineux est-t-elle cultivar-dépendant et contient-elle des bactéries antagonistes d'intérêt envers <i>A. euteiches</i> ?.....	83
3.3	3 <sup>ème</sup> axe de recherche : Est-il possible d'isoler des antagonistes bactériens d'intérêt envers <i>A. euteiches</i> au sein de la rhizosphère de différents couverts végétaux ? Quelle influence va exercer ces couverts végétaux sur la diversité et la structure globale des communautés microbiennes ainsi que sur l'assemblage des populations bénéfiques au sein de la rhizosphère ?.....	85
4	Résultats.....	89
4.1	Le choix variétal : un premier outil de gestion de la pourriture racinaire du pois causée par <i>Aphanomyces euteiches</i> .....	89
4.2	Le rôle du microbiome associé à la plante dans la résistance à la pourriture racinaire du pois causée par <i>Aphanomyces euteiches</i> .....	139
4.2.1	Diversité intra-nodules de six variétés de pois : influence des variétés.....	139
4.2.2	Rôle de l'espèce végétale dans la sélection du microbiome de sa rhizosphère.....	189
5	Synthèse, discussion générale et perspectives .....	261
5.1	Synthèse des résultats de thèse .....	261

5.1.1	Expression différentielle de la pourriture racinaire du pois causée par <i>A. euteiches</i> en fonction du génotype variétal.....	261
5.1.2	Influence des cultivars sur la diversité intra-nodules des endophytes bactériens du pois.	265
5.1.3	Influence de l'espèce végétale sur la modification de la diversité et la structure du microbiome de la rhizosphère.....	271
5.2	Intérêt de ces résultats pour une compréhension systémique des interactions Pois – microorganismes telluriques : contribution au développement de moyens de lutte contre <i>A. euteiches</i> .....	275
5.2.1	Le choix variétal : premier levier agronomique.....	277
5.2.2	Le rôle des microorganismes dans la gestion de la pourriture racinaire du pois.	281
5.2.2.1	Les microorganismes : arsenal antagoniste naturel envers <i>A. euteiches</i> .....	281
5.2.2.2	Le pilotage des phytobiomes.....	285
5.2.2.3	Cas de la variété Indiana .....	291
5.2.2.4	Conclusion : l'ingénierie écologique des microbiomes au service de la santé des plantes .....	293
5.3	Quelques perspectives de recherche.....	295
5.3.1	La spectroscopie Infra-Rouge en tant qu'outil de diagnostic précoce.....	295
5.3.2	Décryptage des mécanismes de défenses mis en place par les variétés d'hiver	297
5.3.3	Mesurer l'impact des BCAs identifiés lors de cette thèse sur la pourriture racinaire du pois dans l'objectif de concevoir des consortia bénéfiques adaptés.....	299
5.3.4	Détermination des facteurs du déterminisme du recrutement des microorganismes au sein de la rhizosphère et des nodules.....	301
5.3.5	Evaluer le pouvoir de la rotation culturale, et plus particulièrement de l'héritage du précédent cultural pour le modelage du phytobiome en faveur de la lutte contre <i>A. euteiches</i> .....	301
	Références.....	307





---

## Liste des abréviations

---

---

6-PAP	6-pentyl- $\alpha$ -pyrone
ACC	Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique
AGPs	Arabinogalactan Proteins
AON	Autoregulation of nodule number
ARN	Acide ribonucléique
ATR	Attenuated Total Reflectance
CMA	Champignon mycorhiziens arbusculaire
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
DAPG	2,4-diacetylphloroglucinol
DI	Disease index
ENR	Endophytes non rhizobiacées
FAO	Food and Agriculture Organization
FTIR	Fourier Transformed Infrared spectroscopy
HCN	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated
IAA	indole-3-acetic acid
LB	Luri Broth
NO <sub>2</sub>	Dioxyde d'azote
OGs	Oligogalacturonides
OTU	Operational taxonomic unit
PAC	Politique Agricole Commune
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PR	Pathogen related
ROS	Reactive oxygen species
SIE	Surface s'Intérêt Ecologique
UV	Ultra-violets
YMA	Yeast Manitol Agar

---



---

## Liste des figures

---

- Figure 1| Surfaces de 4 cultures protéagineuses majeures en France de 1982 à 2018
- Figure 2| Surfaces de pois cultivées en France en 2018
- Figure 3| Bénéfices apportés par un précédent de type légumineuse dans un système de culture
- Figure 4| Composition moyenne de la graine sèche de pois
- Figure 5| Bilan matières riches en protéines de 1973 à 2017
- Figure 6| Teneur en acides aminés essentiels de différents apports protéagineux pour l'alimentation animale : tourteau de soja, tourteau de colza et pois
- Figure 7| Représentation schématique de pois protéagineux
- Figure 8| Principales étapes du cycle de la culture du pois protéagineux
- Figure 9| Photographies de pois protéagineux et pois fourrager
- Figure 10| Principaux ravageurs et dégâts occasionnés
- Figure 11| Symptômes d'*A. euteiches* visibles à l'échelle de la parcelle dans une culture de pois
- Figure 12| Symptômes d'*A. euteiches* sur les parties racinaires du pois
- Figure 13| Arbre phylogénétique simplifié des Eucaryotes
- Figure 14| Répartition des espèces oomycètes pathogènes des plantes et des animaux
- Figure 15| Cycle de développement d'*Aphanomyces euteiches*
- Figure 16| Oospores et sporanges avec zoospores d'*Aphanomyces euteiches*
- Figure 17| Echelle de notation des symptômes sur pois
- Figure 18| Cellules bordantes (BC) libérées à l'extrémités des racines de *Pisum*
- Figure 19| Mise en évidence de la présence d'arabinogalactanes protéines (AGP) au niveau des cellules bordantes du pois ; par immunomarquage et observation au microscope à fluorescence
- Figure 20| Schéma récapitulatif des mécanismes d'action directs et indirects mis en œuvre par les microorganismes de biocontrôle
- Figure 21| Catégories d'éliciteurs
- Figure 22| Résistance systémique induite
- Figure 23| Rôle des bactéries produisant des sidérophores dans la suppression des pathogènes
- Figure 24| Enroulement mycoparasitaire de *Trichoderma atroviride* autour d'un hyphe de *Botrytis cinerea*
- Figure 25| Exemple de tests de confrontation entre isolats bactériens et *Colletotrichum gloeosporioides*, comparé à la croissance du pathogène seul
- Figure 26| Ensembles des mécanismes d'action directs et indirects sur les plantes des PGPR

Figure 27| Intégration des communautés microbiennes dans le triangle de la recherche actuelle en phytopathologie

Figure 28| Classification par taille des organismes du sol

Figure 29| Réseaux d'échange de métabolites dans la rhizosphère

Figure 30| Vue d'ensemble des interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère et le sol entourant les racines

Figure 31| Le microbiome associé à la plante

Figure 32| Mécanismes utilisés par les PGPR pour l'amélioration de la croissance des plantes

Figure 33| Cycle de l'azote entre sol et plante ; et voies de transformation de l'azote régulées par des processus physiologiques

Figure 34| Processus influençant la disponibilité et la transformation du phosphore dans la rhizosphère

Figure 35| Modification de l'architecture racinaire induite par l'inoculation avec une bactérie PGPR

Figure 36| Représentation schématique des différentes associations symbiotiques pour la fixation de l'azote au sein du règne végétal

Figure 37| Dialogue moléculaire entre la plante et les bactéries induisant la nodulation, depuis la sécrétion des flavonoïdes par la plante jusqu'à la synthèse des facteurs Nod

Figure 38| Formation de la nodosité

Figure 39| Schéma illustrant le métabolisme général de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique au niveau des nodules et des échanges de métabolites avec la plante

Figure 40| Modèle de régulation du nombre de nodules impliquant la voie de la giberelline

Figure 41| Abondance relative des phyla dominants (A) et des genres (B) dans la rhizosphère et dans les nodules de plantules de *D. odorifera*, selon la fertilisation azotée apportée

Figure 42| (a) Abondance relative des genres bactériens majeurs (représentés > 1% séquences) détectés par analyse du gène codant l'ARNr 16S dans les nodules des racines du haricot mango. (b) Diagramme de venn indiquant les différences observées de genres bactériens présents dans les nodules entre les sites étudiés

Figure 43| Arbre phylogénétique montrant le positionnement des Glomeromycètes

Figure 44| Etapes de la mise en place de la symbiose mycorhizienne

Figure 45| Représentation schématique d'un arbuscule, PAM : membrane périarbusculaire

Figure 46| Observation microscopique de la colonisation mycorhizienne des nodules

Figure 47| Abondance relative des différentes séquences CMA type dans les racines et nodules de plusieurs espèces de plantes légumineuses et non légumineuses

Figure 48| Comparaison des abondances relatives de genres mycorhiziennes pour différentes pratiques de gestion et sous différentes espèces végétales

Figure 49| Flux métaboliques entre la plante et le champignon mycorhizien

Figure 50| Vue générale du concept de pathobiome

Figure 51| Représentation schématique de l'expérience mise en place pour l'axe 1 de recherche

Figure 52| Représentation schématiques des 2 parcelles cibles de l'étude.

Figure 53| Schéma récapitulatif sous forme de concept qu'est l'ingénierie écologique au bénéfice de la santé des cultures. La santé des plantes est influencée par un grand nombre de facteurs dont par exemple le climat, les pratiques agricoles et les interventions humaines, les paramètres physico-chimiques et biologiques du sol. Par ces travaux de recherche, on y ajoute, le choix variétal avec son architecture racinaire ainsi que sa capacité à recruter des agents de biocontrôle qui proviennent d'un pool microbien directement influencé par le précédent cultural et donc par la rotation. A tous ces facteurs influençant la santé des plantes, le pool microbien peut être agrémenter par un consortium artificiel bénéfique pour les plantes.



---

## Liste des tableaux

---

Tableau 1 | Caractéristiques générales du génome assemblé du pois

Tableau 2 | Effets des états du milieu sur l'élaboration du rendement du pois

Tableau 3 | Pathologies d'origine bactérienne, fongique et oomycète affectant le pois

Tableau 4 | Exemples d'endophytes bactériens retrouvés dans différents tissus chez les légumineuses





## **1 Introduction générale**

### **1.1 Les légumineuses à graines, ressources agronomiques d'intérêt**

Les légumineuses à graines (« pulses » selon la FAO) constituent un sous-groupe appartenant à la famille des légumineuses dont les graines une fois sèches et mures, sont utilisées par la suite pour la nutrition animale et humaine. La classification de la FAO (1994) répertorie ainsi plus de 20 espèces, les plus importantes étant le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.), le haricot mungo (*Vigna radiata* [L.] Hepper), le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), le niébé (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.), la lentille (*Lens culinaris* Medik.), le pois cajan (*Cajanus cajan* [L.] Huth) et le pois protéagineux (*Pisum sativum* L.).

Les légumineuses à graines ont pendant longtemps constitué une part essentielle de l'alimentation humaine. Par la suite, leurs bienfaits nutritionnels et agronomiques ont été sous-estimés voire même oubliés. L'intérêt de ces cultures en Agriculture est aujourd'hui pourtant largement souligné (Calles, 2016). En reconnaissance des contributions majeures pour le bien-être humain et pour l'environnement, l'Assemblée Générale des Nations Unies a ainsi déclaré l'année 2016 comme année internationale des légumineuses à graines (résolution 68/231), sous l'égide conjointe de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Ces cultures, par leurs caractéristiques, sont ainsi reconnues comme indubitablement et étroitement reliées aux notions de sécurité alimentaire, de santé humaine, d'agriculture durable et d'adaptation aux changements climatiques (Calles *et al.*, 2019). Malgré les nombreux bénéfices, leur production n'a pourtant pas suivi un accroissement semblable à celui des céréales (Alexandratos and Bruinsma, 2012). Dans le but de surmonter cet écart, différentes politiques ont été mises en place ces dernières années dans le but de promouvoir ces cultures, d'encourager les parties prenantes à augmenter les surfaces cultivées, d'améliorer la productivité et d'augmenter le potentiel d'investissement pour la recherche et le développement (Calles, 2016). Par exemple, en France, le déclin des surfaces dédiées à la culture de protéagineux, depuis le début des années 2000, a conduit à l'instauration du Plan Protéines végétales (2014-2020). Ce plan a pour enjeux de sécuriser voire d'augmenter les rendements, d'intégrer de plus en plus de cultures riches en protéines dans les assolements, en particulier les légumineuses à graines, de sécuriser les débouchés actuels voire d'en développer d'autres et d'améliorer la concertation et la coopération entre les différents acteurs de la filière. L'objectif à terme est de viser l'indépendance protéique à la fois pour l'alimentation humaine mais aussi animale.

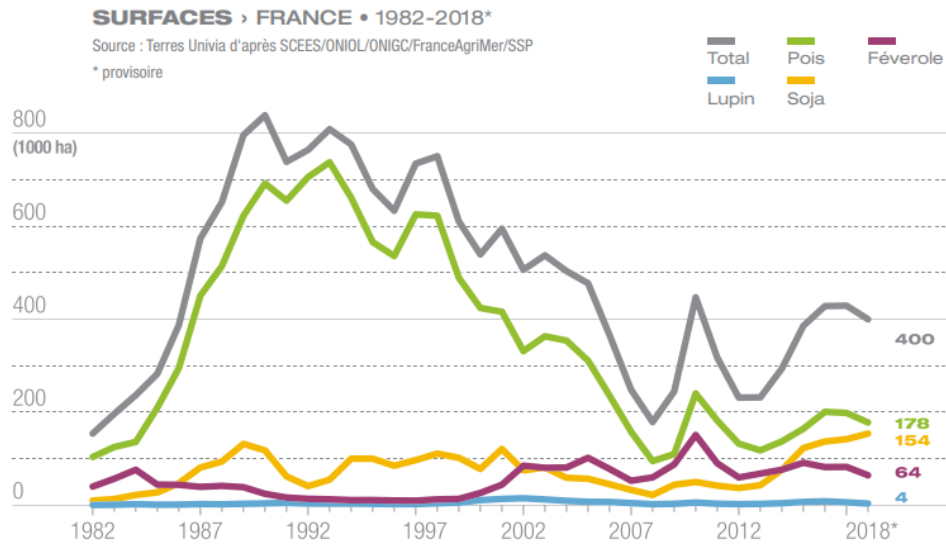


Figure 1 : Surfaces de 4 cultures protéagineuses majeures en France de 1982 à 2018 (Sources : Terres Univia)

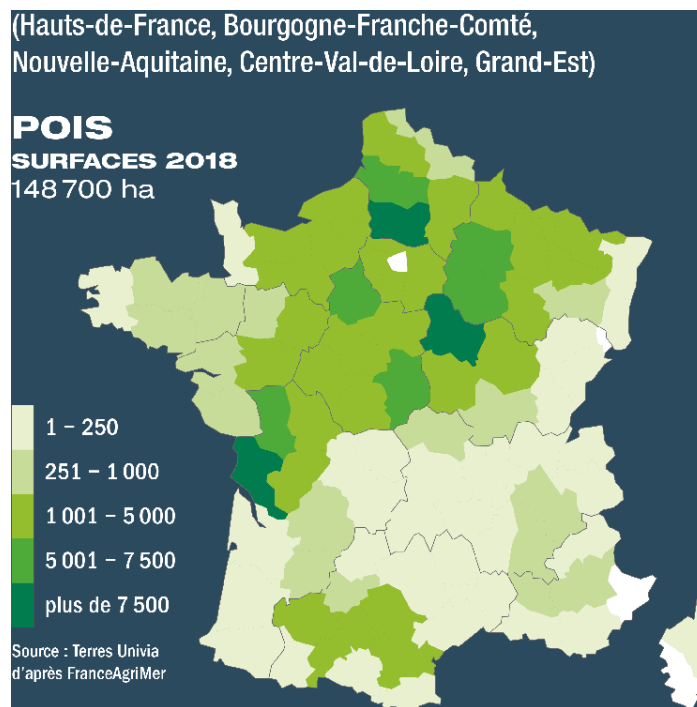


Figure 2 : Surfaces de pois cultivées en France en 2018 (Source : Terres Univia)

## 1.2 Le pois protéagineux en France

Le pois cultivé *Pisum sativum* L. présente deux débouchés principaux en France :

- L'alimentation humaine, assurée par la culture de pois potager ou petits pois, en production de plein champ ou en maraichage. La récolte étant effectuée avant la pleine maturité des graines, le petit pois n'est pas considéré comme une légumineuse à graine à part entière.
- L'alimentation animale, assurée par les pois fourragers généralement récoltés en vert à la floraison et les pois protéagineux, dont les graines sont récoltées lorsqu'elles sont sèches (appartenant donc au sous-groupe des légumineuses à graines). Ces derniers sont cultivés en plein champ. Deux types de variétés sont déployés par les agriculteurs : les pois de printemps et les pois d'hiver. Le pois d'hiver possède une tolérance hivernale plus ou moins forte cultivar-dépendant (Source : Terres Inovia, Guide 2019 de culture du pois).

La culture du pois représente aujourd'hui la culture protéagineuse principale en France (Figure 1), suivi par le soja, la féverole et le lupin. La France est le 1<sup>er</sup> producteur et exportateur de pois en Europe. Les surfaces dédiées à cette culture couvraient 173 000 ha en 2019 (Source : Agreste, Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation). Le rendement du pois protéagineux se situe en moyenne entre 45 et 60 quintaux / ha pour les cultivars de pois d'hiver et 30 et 60 quintaux / ha pour ceux du pois de printemps, (source : Terres Inovia, campagne 2019). Les zones de production sont surtout localisées dans la moitié nord de la France : Haut de France, Bretagne, Centre-Val de Loire, Bourgogne-Franche Comté, Normandie, où les conditions climatiques relativement tempérées sont les plus favorables (Figure 2). Face aux coûts liés aux importations de soja, apport protéique majoritaire à l'heure actuelle au sein des rations alimentaires animales, et à la dépendance vis-à-vis des pays producteurs, la culture du pois protéagineux représente une solution pour se diriger vers l'autonomie en protéines végétales en France. De nombreuses mesures incitatives ont été instaurées pour promouvoir le développement des surfaces agricoles dédiées à cette culture. Cependant, malgré ces aides, les surfaces dédiées aux cultures de pois protéagineux n'augmentent pas de façon conséquente. De nombreux facteurs peuvent en effet rendre difficile la conduite de cette culture : évolution réglementaire menant à des diminutions des aides de la PAC (Politique Agricole Commune), cours fluctuant du marché des cultures, les contraintes agronomiques importantes telles que la diminution des rendements, le changement climatique et surtout les risques phytopathogènes (Doré and Varoquaux, 2006).



### **1.3 Quels sont les enjeux de la culture du pois protéagineux ?**

#### **1.3.1 Enjeux agronomiques**

Une des caractéristiques principales du pois est sa capacité à fixer l'azote atmosphérique. En effet, le pois, comme toute plante de la famille des légumineuses, entre en symbiose avec certaines bactéries de la rhizosphère, permettant une conversion de l'azote atmosphérique en composés azotés utilisables par la plante (Maroti and Kondorosi, 2014; Schneider and Huyghe, 2015; Calles, 2016; Stagnari *et al.*, 2017). Cette symbiose permet une autonomie totale de la plante pour sa nutrition azotée. La culture de pois va permettre une restitution d'azote dans les sols, améliorant de fait sa fertilité (Schneider and Huyghe, 2015; Stagnari *et al.*, 2017). La culture de pois constitue donc un excellent précédent pour une culture suivante exigeante en azote (Abrás *et al.*, 2017). L'utilisation moindre d'intrants couplée à la restitution en azote dans les sols constitue les deux atouts agronomiques majeurs du pois. Outre ce rôle, la culture de pois apporte d'autres services écologiques favorables à l'équilibre, la résilience et la durabilité des agrosystèmes (Calles, 2016; Powers and Thavarajah, 2019). La présence de pois dans les agrosystèmes va avoir un effet positif sur la fertilité des sols à travers une augmentation de la quantité de carbone organique mais aussi d'humus (Hajduk *et al.*, 2015; Stagnari *et al.*, 2017) ainsi que sur la structure même du sol (Abberton, 2010; Preissel *et al.*, 2015; Calles, 2016).

De plus, la culture du pois va jouer un rôle important sur la structuration et la diversité des communautés microbiennes telluriques et leurs fonctions associées, que ce soit au cours de son développement (Sharma *et al.*, 2004, 2005 ; Yu *et al.*, 2012 ;Turner *et al.*, 2013;) ou lors de la dégradation des résidus post culture (Schutter and Dick, 2001 ; Biederbeck *et al.*, 2005; Piotrowska-Długosz and Wilczewski, 2014). L'introduction du pois au sein de la rotation peut aider à réduire les pressions pathogènes parce qu'elle crée une rupture des cycles d'infection. En effet, cette espèce végétale n'est généralement pas sensible aux mêmes nuisibles et pathogènes, en particulier telluriques, que les céréales (Zander *et al.*, 2016). De même, le pois peut contribuer au contrôle du développement ou tout du moins à la stabilisation de la composition des adventices (Bàrberi, 2002 ; Seymour *et al.*, 2012 ; Preissel *et al.*, 2015).

Plus globalement, l'introduction du pois dans les paysages va permettre une diversification des systèmes et des paysages, conduisant à une meilleure utilisation à l'échelle du territoire des ressources et une augmentation générale des rendements (Calles, 2016).

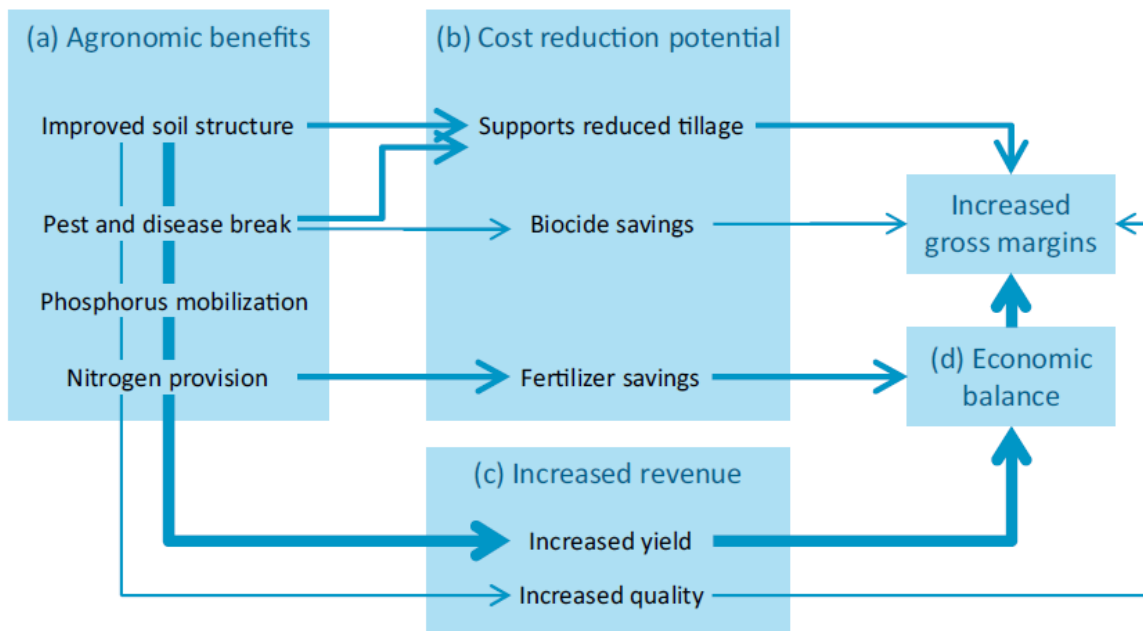


Figure 3 : Bénéfices apportés par un précédent de type légumineuse dans un système de culture. La taille des flèches indique la pertinence économique de l'effet (Preissel *et al.*, 2015).

### 1.3.2 Enjeux économiques

L'intérêt économique de la culture de pois est directement en lien avec ses avantages agronomiques (Figure 3). La valeur ajoutée se perçoit à l'échelle de la rotation sur la base principalement des gains apportés par effet de précédent : économie d'apport d'azote, augmentation des rendements de la céréale suivant le pois [par exemple +8 qx / ha de blé, source : Arvalis 2012 ; + 9 qx / ha, Evans *et al.*, 1991 ; + 4.5 qx ha<sup>-1</sup>, Seymour *et al.*, 2012], réduction de l'utilisation de produits phytosanitaires, réduction des pratiques de labour et des besoins en machinismes ; pour au final une meilleure robustesse et productivité des agrosystèmes (Preissel *et al.*, 2015). De plus la culture du pois en elle-même entraîne des charges opérationnelles (coût des engrais, des semences et des produits phytosanitaires nécessaires) moindres que celles des cultures de blé ou de colza, car non soumise au cours du marché des engrais azotés. Enfin, cette culture bénéficie d'un dispositif d'aides spécifiques, modulées en fonction des surfaces cultivées (PAC, Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation).

### 1.3.3 Enjeux environnementaux

Parmi les nombreux bénéfices apportés par la culture du pois protéagineux, leur rôle dans l'atténuation des changements climatiques est de plus en plus souligné *via* la limitation les émissions de gaz à effet de serre (CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>). En effet leur capacité à fixer des quantités importantes d'azote atmosphérique permet de limiter les besoins en fertilisation minérale, dont la synthèse est fortement génératrice de CO<sub>2</sub> (Reckling *et al.*, 2014). De plus la réduction des besoins d'application d'engrais azotés sur les sols va permettre de limiter les processus conduisant à la production de NO<sub>2</sub>. Pour chaque application de 100 kg de fertilisant azoté, environ 1 kg d'azote est émis sous forme de NO<sub>2</sub> (Jensen *et al.*, 2012). La culture du pois peut aussi être un contributeur important pour la séquestration du carbone dans les sols, principalement à travers une augmentation de la biomasse (Abberton, 2010). Par ailleurs, les légumineuses à graines présentent aussi des capacités d'adaptation au changement climatique. Les légumineuses à graines favorisent une accumulation plus importante de carbone dans les sols que les céréales par exemple (Jensen *et al.*, 2012), ainsi qu'une redistribution de celui-ci dans les couches les plus profondes, et donc moins susceptible à la décomposition (Batjes and Sombroek, 1997; Venkatesh *et al.*, 2013). Enfin, l'introduction du pois protéagineux dans les systèmes de culture, grâce à la réduction des interventions nécessaires au cours de la culture



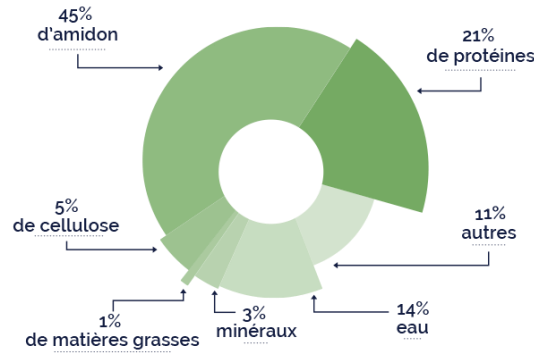


Figure 4 : Composition moyenne de la graine sèche de pois (Source : Terres Univia).

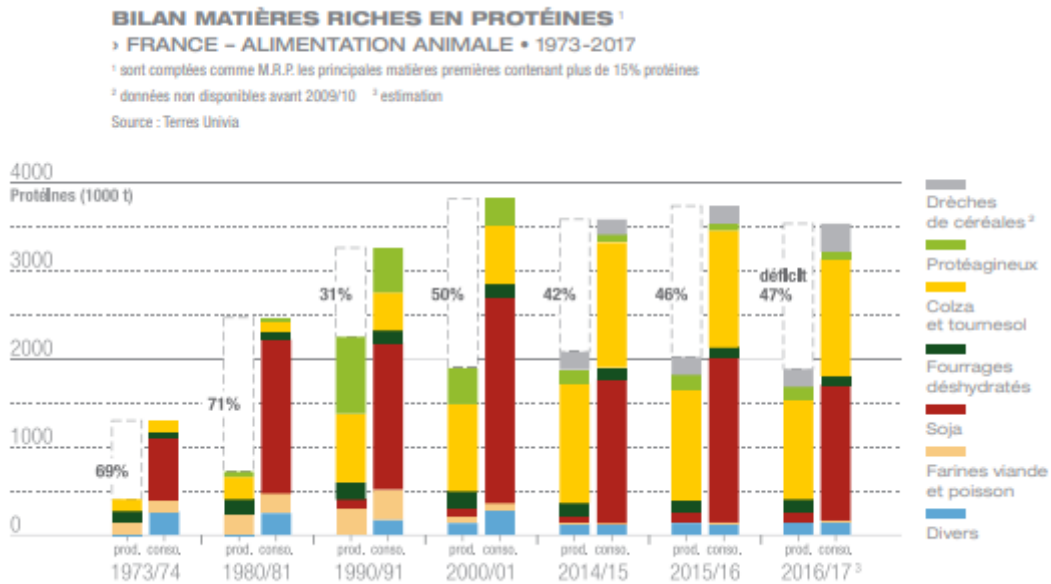


Figure 5 : Bilan matières riches en protéines de 1973 à 2017 (Sources : Terre Inovia).

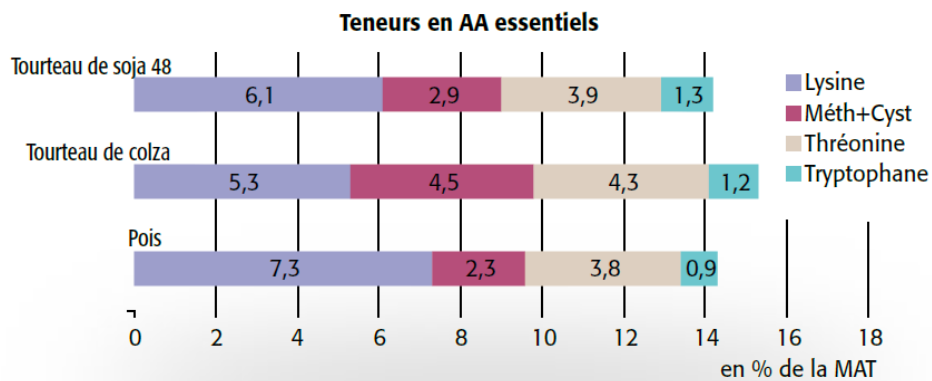


Figure 6 : Teneur en acides aminés essentiels de différents apports protéagineux pour l'alimentation animale : tourteau de soja, tourteau de colza et pois (Sources : INRA, UNIP).

ainsi que lors des cultures suivantes, permet une réduction de l'utilisation d'énergie fossile (Stagnari *et al.*, 2017). Par ailleurs, les légumineuses à graines présentent aussi des capacités d'adaptation au changement climatique. Leur forte diversité génétique représente un atout certain, à la base du développement de variétés plus résilientes et adaptées aux différents scénarios possibles, et contribue ainsi à la durabilité des agrosystèmes (Considine *et al.*, 2017). La PAC considère donc le pois protéagineux comme une culture dont la surface dédiée est une SIE, surface d'intérêt écologique.

#### **1.3.4 Enjeux alimentaires**

Les cultivars de pois protéagineux ont été sélectionnés sur la base de leurs graines particulièrement riches en protéines (environ 21 % du poids de la matière sèche) et en amidon (45 %) (Figure 4), sans tannin qui peut être préjudiciable à la qualité de l'aliment. La composition reste proche de celle des céréales, à l'exception d'une teneur plus importante en lysine, acide aminé essentiel dans l'alimentation (Schneider and Huyghe, 2015). Les graines sont aussi riches en minéraux (fer, magnésium, potassium, phosphore, zinc) et en vitamine B (thiamine, riboflavine, niacine, B6 et folate) (Calles, 2016). Ces graines sont historiquement et principalement destinées à l'alimentation animale (Figure 5). Par exemple, grâce à sa teneur élevée en lysine, le pois associé au tourteau de colza (plus pauvre en lysine) peut se substituer au tourteau de soja (Figure 6). Toutefois la proportion en protéagineux des rations alimentaires pour animaux, au plus haut dans les années 1990, a fortement chuté ses dernières années au profit du soja, majoritaire aujourd'hui. Il s'agit de retrouver une attractivité pour ces espèces végétales afin de mieux approvisionner les secteurs de l'alimentation animale mais aussi de développer et de valoriser la consommation de ces protéines végétales dans l'alimentation humaine. En effet, la consommation de légumineuses à graines peut contribuer à réduire les risques de maladies cardiovasculaires et de cancers (à travers la présence de métabolites secondaires comme les isoflavonoïdes) (Dixon and Sumner, 2003), à prévenir le diabète (grâce à leur faible index glycémique) et à lutter contre l'obésité (Campos-Vega *et al.*, 2010).

*Fort de la nécessité d'acquérir une autonomie face à la demande croissante en protéines végétales, en particulier pour l'alimentation animale, de nombreuses politiques sont entreprises aujourd'hui pour promouvoir la culture des légumineuses à graines comme le pois protéagineux et la valorisation de ces débouchés. L'augmentation des pressions économiques et environnementales sur les agro-écosystèmes font émerger le rôle majeur de ces cultures,*



*dont les bénéfices agronomiques, économiques, environnementaux et alimentaires sont largement reconnus, dans les futurs systèmes de culture. Dans un contexte d'Agriculture durable, l'atout essentiel que constitue la culture du pois protéagineux s'accompagne de questionnements scientifiques et d'opportunités de recherche importants. Il s'agit de construire les systèmes de culture et les filières à la lumière des bénéfices à tirer sans oublier pour autant les limites actuelles à surmonter. Ainsi le développement de la culture de pois protéagineux passe par une meilleure compréhension des systèmes et surtout des multiples interactions entre la plante et son environnement, entre les cultivars et les systèmes de culture, pour une sécurisation à la fois des rendements mais aussi des avantages apportés à l'écosystème.*





---

## Synthèse bibliographique

---



Selim *et al.*, 2017



## 2 Synthèse bibliographique

### 2.1 Le pois, *Pisum sativum* L.

#### 2.1.1 Histoire et classification

Le pois (*Pisum sativum*), classé parmi la division des Magnioliophyta, fait partie de la famille des Fabacées (Genre : *Pisum*, sous-famille : *Faboideae*, tribu : *Fabeae*). Le pois est une des espèces cultivées domestiquées les plus anciennes, dès l'Antiquité (Smýkal *et al.*, 2011; Zohary *et al.*, 2012). Son aire d'origine et de domestication initiale se situerait dans la zone Méditerranéenne, probablement au Moyen Orient (Singh and Jauhar, 2005; Smýkal *et al.*, 2012). Par la suite, cette culture s'est répandue en Europe et est aujourd'hui cultivée dans des zones tempérées (Smýkal *et al.*, 2011). Les graines de pois sec ont constitué pendant longtemps une ressource alimentaire de base très importante depuis le Moyen Age (Pitrat and Faury, 2003). Cette espèce constitue un des modèles végétaux les plus célèbres, car à la base des découvertes fondamentales de Mendel, dont l'analyse de l'hérédité des morphotypes chez cette espèce végétale a permis d'élucider les lois de la génétique (Smýkal *et al.*, 2012). Carl Von Linné lui attribue en 1753 sa dénomination binomiale encore actuelle de *Pisum sativum* dans son ouvrage *Species Plantarum*. La classification au sein du genre *Pisum*, sur la base des différences morphologiques et au niveau des caryotypes, n'a cessé d'évoluer et de se modifier, de 5 espèces jusqu'à une seule espèce possible. La classification taxonomique la plus récente et la plus utilisée distingue 3 espèces (Maxted and Bennett, 2001) : *Pisum sativum* L., avec les sous espèces *sativum* (var. *sativum* et var. *arvense*) et *elatius* Aschers & Graebn (var. *elatius*, var. *brevipedunculatum* et var. *pumilio*) ; *Pisum fulvum* Sibth & Sm. et *Pisum abyssinicum* A. Br. L'histoire évolutive du genre *Pisum* reste malgré tout encore soumise à de nombreuses hypothèses (Smýkal *et al.*, 2011). *Pisum sativum* est une plante annuelle et autogame. Les variétés cultivées appartiennent plus particulièrement au type « afile » porteuses du gène récessif *afile* (*af*) qui provoque la transformation des folioles en vrilles, augmentant ainsi leur résistance à la verse et facilitant les récoltes (Mishra *et al.*, 2009).

#### 2.1.2 Génétique du pois et variétés de pois protéagineux

Le pois est une plante diploïde ( $2n = 14$  chromosomes) dont la taille du génome est estimée à 4,45 Gbp (Doležel *et al.*, 1998; 2010; Smýkal *et al.*, 2012). Depuis 2000, de nombreux travaux se focalisent sur la construction de cartes génétiques de *P. sativum* (Bordat *et al.*, 2011). Jusqu'à



Tableau 1: Caractéristiques générales du génome assemblé du pois (Kreplak *et al.*, 2019).

	Values
<b>Length of genome assembly (bp)</b>	<b>3,920,161,095</b>
<b>Total length of scaffolds<sup>a</sup> (bp)</b>	<b>3,919,096,294</b>
Number of scaffolds	24,623
N50 of scaffolds (bp)	415,940
Number of anchored scaffolds	10,357
<b>Total length of contigs (bp)</b>	<b>3,159,358,344</b>
Number of contigs	218,010
N50 of contigs (bp)	37,931
GC content (%)	37.6
<b>Total length of pseudomolecules (bp)</b>	<b>3,234,741,624</b>
<b>Total length of unanchored scaffolds (bp)</b>	<b>685,419,471</b>
Number of unanchored scaffolds	14,266
<b>Total length of retrotransposons (Class I, bp)</b>	<b>2,457,319,695</b>
<b>Total length of transposons (Class II, bp)</b>	<b>171,953,356</b>
<b>Total length of genes (bp)</b>	<b>124,595,921</b>
Number of genes	44,756
Average gene length (bp)	2784
Number of mRNA	57,835
Number of exons	193,976
Average exon length (bp)	308.5
Average exon number	4.33
Average 3' UTR length (bp)	443.3
Average 5' UTR length (bp)	261.9
Number of annotated genes	30,687

<sup>a</sup>Scaffolds include super-scaffolds.



Figure 7 : Représentation schématique de pois protéagineux : système racinaire d'environ 20 cm, système aérien d'environ 1 mètre, tige principale constituée de plusieurs étages foliaires (stipules) et gousses.

présent, les travaux de sélection ont engendrés une banque de ressources génétiques très conséquentes réparties dans différents centres de recherche (Smýkal *et al.*, 2012). Au sein de cette large collection de lignées, les cultivars retenus sont ceux présentant des caractéristiques morphologiques d'intérêt, en particulier concernant les gousses et les graines. Toutefois, malgré l'existence de ces multiples collections fournies, une certaine érosion génétique est souvent notée, due principalement à la faible représentativité des pois sauvages, pourtant riche en diversité génétique (Smýkal *et al.*, 2012). En 2019, une première annotation complète du génome assemblé du pois (variété Caméor, 7 chromosomes) a été publiée (Kreplak *et al.*, 2019). Comparé aux génomes d'autres légumineuses, celui du pois montre une forte dynamique des gènes (translocations, transpositions, réarrangements, présence de nombreux transposons et rétrotransposons) (Tableau 1), très probablement associée à une expansion de la taille du génome lors de la divergence de la tribu *Fabeae* des autres tribus. L'étude du génome ouvre la voie à des possibilités de sélection variétale assistée pour une amélioration ciblée des variétés. Contrairement à certaines cultures d'hiver qui ont besoin d'une période d'hivernage, appelée vernalisation dans le cycle de leur développement (par exemple, pour initier la floraison comme chez le colza (Murphy and Scarth, 1994), les variétés d'hiver sont décrites en tant que telles uniquement en raison de leur capacité à résister au gel. Des recherches concernant ce caractère ont été mises en œuvre pour le déploiement de nouvelles variétés par sélection variétale (Singh and Jauhar, 2005).

### 2.1.3 Morphologie et croissance du pois

*Pisum sativum* possède un système racinaire composé d'une racine principale dite « pivot » sur lequel se forment des racines latérales primaires, secondaires voire tertiaires (Figure 7). Les nodosités, siège des interactions symbiotiques avec les bactéries fixatrices d'azote, sont localisées principalement sur les racines latérales. *P. sativum* possède un système foliaire très développé mais peu ramifié pouvant mesurer jusqu'à plus d'un mètre de hauteur. La partie aérienne est constituée d'une succession de structures particulières appelées phytomères, composés d'un segment de tige et d'un nœud portant les feuilles (Figure 7). L'organisation des feuilles est complexe. Les variétés feuillues présentent une paire de stipules à la base des feuilles, puis 1 à 3 paires de folioles ainsi qu'une vrille alors que les variétés afilea ont des vrilles supplémentaires observées à la place des folioles. Les gousses contenant les graines se forment à partir d'un certain nombre d'étages foliaires, en fonction des variétés mais aussi des conditions environnementales. Plusieurs stades clés sont considérés chez le pois (Figure 8) : la



Figure 8 : Photographies de pois protéagineux et pois fourrager. A gauche, du pois protéagineux à fleurs blanches, à droite du pois fourrager à fleurs roses-violettes. (Source, Terre-Univia et Arvalis).

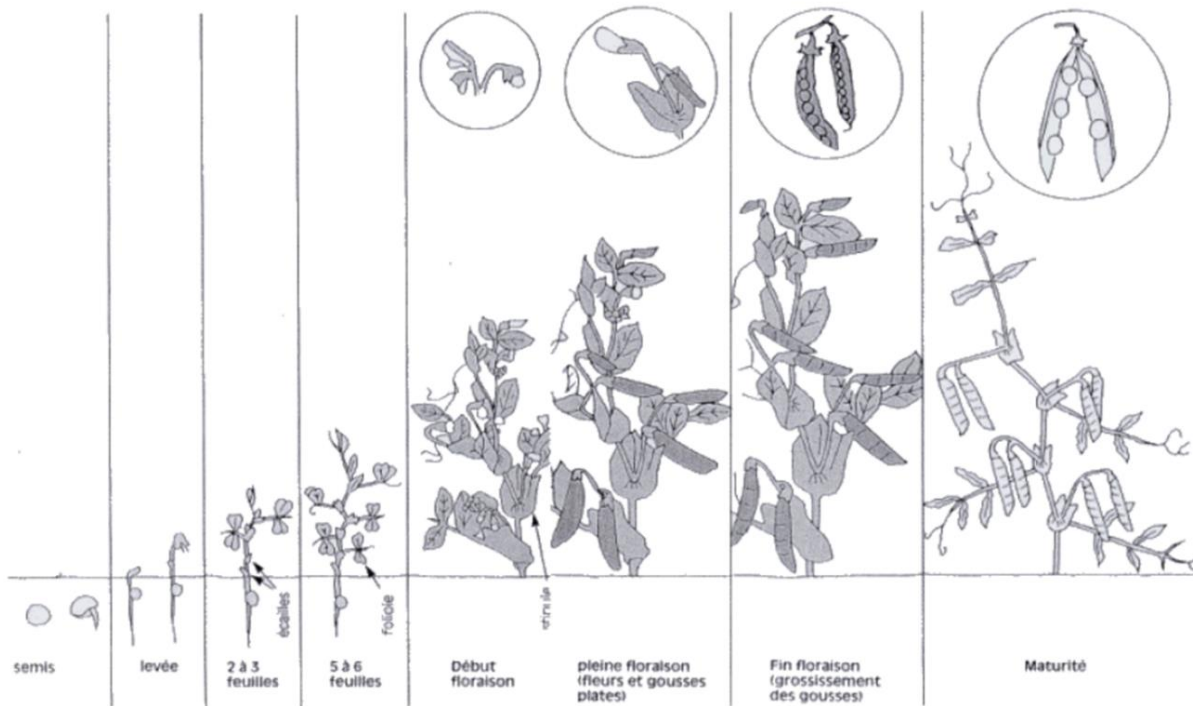


Figure 9 : Principales étapes du cycle de la culture du pois protéagineux (Boyeldieu, 1991)

germination (sans période de dormance) suivie du stade 2-3 feuilles puis 6 feuilles, le début puis la pleine floraison (fleurs et gousses plates, de couleur blanche car pauvres en tanin chez le pois protéagineux, roses à violettes contenant du tanin chez le pois fourrager (Figure 8)), la fin floraison (grossissement des gousses) et la maturité (maturation des graines) (Figure 9).

Les dates de semis des variétés d'hiver vont de septembre pour les plus précoces à novembre pour les plus tardives (en fonction des conditions climatiques). Les variétés de printemps se sèment en février-mars, et la date de récolte de toutes ces variétés sont aux alentours de fin mai à fin juillet. La croissance des variétés d'hiver est donc plus lente, puisque ralentie durant la période de froid de l'hiver. La levée des semis de pois nécessite une température supérieure à 0°C. Passé ce stade très sensible, les températures supportées peuvent être plus basses, en particulier pour les variétés de pois d'hiver. Par la suite, les cultures de pois sont sensibles au stress hydrique surtout pendant le stade de floraison-nouaison où les besoins en eau sont à leur maximum dus à une production végétative importante. La croissance et le développement des plantes sont fortement dépendants des facteurs abiotiques du sol, tels que la quantité et la qualité des éléments nutritifs, mais aussi les conditions pédoclimatiques (Tableau 2). La croissance des racines des plantes est, plus particulièrement, sous la contrainte forte des propriétés des sols (Gregory, 2006). Par exemple, une compaction importante du sol va ralentir la croissance des racines. Un faible pH du sol ainsi qu'une forte salinité vont de la même façon agir négativement sur le développement racinaire. La présence de différents métaux tels que l'aluminium, le manganèse ou le molybdène vont induire une inhibition de la croissance des racines latérales (Gregory, 2006). Les teneurs en eau et en nutriments vont également exercer une influence importante sur le développement des racines (Gregory, 2006). Les facteurs climatiques vont aussi agir de concert, puisqu'en lien avec certaines propriétés du sol. Ainsi, une corrélation négative a été démontrée entre la profondeur d'enracinement et les précipitations annuelles (Gregory, 2006). L'architecture racinaire, en particulier le nombre et la longueur des racines latérales va aussi dépendre des conditions hydriques du sol (Schenk and Jackson, 2002). La température lors du développement de la plante joue un rôle essentiel à son bon déroulement (Gregory, 2006). Concernant le pois, la température optimale pour l'expansion racinaire se situe entre 9 et 33 °C, même si au-delà de 25°C les racines sont considérées alors comme étant sous contrainte thermique (Munier-Jolain *et al.*, 2005).

Tableau 2 : Effets des états du milieu sur l'élaboration du rendement du pois ; DF = début de floraison, FF = fin de floraison (Source : AgroParisTech).

	Germination/ Levée	Croissance		Alimentation minérale	Fixation symbiotique	Date de		Remplissage des graines
		parties aériennes	racinaire			DF	FF	
Rayonnement		X				X		X
Excès d'eau	X	X			X		X	
Basses t°C	X							
Hautes t°C								
Déficit hydrique		X	X	X	X		X	X
Etat structural	couche labourée	X	X	X	X			
	lit de semence	X			X			
Nitrates dans le sol		X		X	X			
P, K dans le sol				X	X		X	X

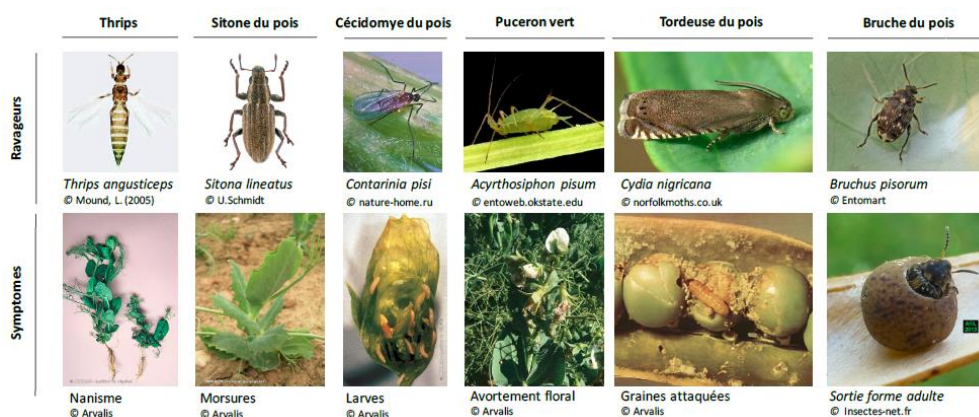


Figure 10 : Principaux ravageurs et dégâts occasionnés (Laloum, 2018)

#### 2.1.4 La culture du pois : principaux ravageurs et maladies

De nombreuses espèces d'insectes sont répertoriées en tant que ravageurs du pois cultivé en plein champ, altérant le pois à différents stades de développement et pouvant affecter toutes les parties végétales (Figure 10). Selon Terres Inovia, le plus préoccupant reste le puceron vert (*Acyrtosiphon pisum*) qui présente une nuisibilité due à sa forte présence en France, entraînant des pullulations rapides. Ces invasions de pucerons verts mènent à un affaiblissement des jeunes pousses et peuvent aussi entraîner des avortements de fleurs. Les dégâts touchent l'ensemble des organes de la plante. Ce ravageur va conduire à des pertes non négligeables, pouvant atteindre jusqu'à 30 q / ha de baisse de rendement mais aussi une diminution du poids de 1000 grains (Sources : Terres Inovia et BASF). Les infestations de thrips et de sitones vont plutôt toucher les variétés de pois de printemps, tandis que le puceron vert, la bruche et la tordeuse peuvent affecter autant les variétés de printemps que les variétés d'hiver (Source : Terres Inovia). Les conditions climatiques environnantes constituent le facteur principal du déterminisme de l'impact de l'ensemble de ces ravageurs.

De nombreuses viroses sont recensées chez le pois, véhiculées et transmises par des pucerons (Biddle and Cattlin, 2007). Également, de nombreux agents pathogènes microbiens (bactéries, champignons et oomycètes) aériens et telluriques vont infecter les cultures de pois à différents stades (Tableau 3). En France, les maladies du pois protéagineux les plus fréquentes sont : l'anthracnose pouvant conduire à des pertes de rendement jusqu'à 25 qx / ha, la pourriture grise avec des pertes de rendement possibles jusqu'à 20 qx / ha et la rouille du pois dont les attaques précoces peuvent provoquer une baisse de rendement entre 5 à 12 qx / ha. Pour ces 3 maladies, des traitements fongicides sont disponibles. *Aphanomyces euteiches* est l'une des maladies les plus dommageables provoquant la pourriture racinaire du pois mais un test préventif permet d'éviter un semis sur parcelle trop infestée ce qui en réduit la fréquence. D'autres maladies moins fréquentes peuvent être aussi préjudiciables : l'oïdium (peu nuisible car très tardive dans les parcelles), le sclérotinia du pois (perte de rendement en général inférieure à 5 qx / ha), le mildiou (perte de rendement jusqu'à 20 qx / ha, traitement possible des semences), la bactériose du pois (facteur favorisant le développement de l'anthracnose). Toutes ces maladies vont altérer la croissance du pois.

L'altération du pois par ces pathogènes et ravageurs, est cependant variable selon des facteurs dont l'architecture. En effet, des études ont pu mettre en évidence des corrélations entre l'architecture du pois et le développement de certaines phytopathologies. Le May *et al.* (2012) ont par exemple montré que l'index de surface foliaire et la distance moyenne entre nodes chez

Tableau 3 : Pathologies d'origine bactérienne, fongique et oomycète affectant le pois

Champignons et oomycètes	Nom commun	Agents pathogènes	Organes principaux touchés	Symptômes principaux	Références
Maladies aériennes	Anthracnose (consortium pathogène)	<i>Ascochyta pisi</i> <i>Ascochyta pinodes</i> <i>Phoma medicaginis</i> var. <i>pinodella</i>	Tiges, feuilles, gousses	Tâches, lésions brunes, présence de punctuations noires (pycnides) et nécroses	Onfroy et al., 2007
	Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i>	Tiges, feuilles, gousses	Tâche de pourriture grise, nécroses	Davidson et al., 2007
	Mildiou	<i>Peronospora viciae</i> f. sp. <i>pisi</i>	Jeunes plantules, feuilles	Plantules naines et recroquevillées, jaunissement, feuillage gris violacé	Liu et al., 2013
	Oidium	<i>Erysiphe pisi</i>	Tous les organes aériens	Feuillage blanc et poudreux	Bhery et al., 2016
	Rouille (consortium pathogène)	<i>Uromyces pisi</i> <i>Uromyces viciae-cracca</i> <i>Uromyces viciae-fabae</i>	Feuilles	Pustules fauves	Barilli et al., 2009
	Sclerotiniose	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Toute la plante, surtout la tige	Tâches humides et irrégulières, mycélium blanc et cotonneux	Jain et al., 2011
	Fonte des semis	<i>Pythium</i> sp.	Semences et racines	Noircissement du collet et des racines, déperissement des plantules	Barilli et al., 2012
	Fonte des semis	<i>Rhizoctonia solani</i>	Semences et racines	Lésions rouge/brune sur la racine et le collet, déperissement des plantules	Mathew et al., 2012
	Fusariose	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> <i>Fusarium solani</i>	Racines, collet, feuilles	Brunissement des tissus vasculaires de la racine puis nécrose, pourrissement	Kraft, 1994
	Pied noir (complexe pathogène)	<i>Phoma medicaginis</i> var. <i>pinodella</i> <i>Pythium</i> sp. (parfois) <i>Rhizoctonia solani</i> (parfois) <i>Ascochyta pinodes</i> (parfois)	Racines et collet	Nécrose racinaire, noircissement du collet jusqu'à déperissement et jaunissement des plantules	Gaurilčikienė et al., 2012
Bactéries	Pourriture racinaire	<i>Aphanomyces euteiches</i>	Racines	Lésions brunes molles sur les racines et le collet, jaunissement et	Gangneux et al., 2014
	Nom commun	Agents pathogènes	Organes principaux touchés	Symptômes principaux	Références
	Bactériose grasseuse	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>pisi</i>	Feuilles, tiges	Tâches vertes à brunes, aspect huileux	Fondevilla et al., 2012
Maladies aériennes	Maladie des tâches brunes	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>syringae</i>	Feuilles, tiges	Tâches brunes	Martin-Sanz et al., 2010

le pois influencent directement la sévérité de la maladie causée par *Mycosphaerella pinodes*. Richard *et al.*, (2012) ont quant à eux observé une augmentation de la maladie causée par *Didymella pinodes* en lien avec la densité de l'architecture aérienne des cultures de pois. Desgroux *et al.*, (2018) ont montré un lien fort entre l'architecture racinaire et la résistance à *A. euteiches*, signe d'une potentielle interdépendance des gènes contrôlant ces caractéristiques.

## **2.2 La pourriture racinaire du pois**

La pourriture racinaire du pois, et son agent pathogène *Aphanomyces euteiches*, ont été décrit pour la première fois en 1925 par Jones et Drechsler aux Etats-Unis. Par la suite, la présence de ce pathogène a été rapportée sur le continent européen mais aussi en Australie, au Canada ou encore au Japon (Papavizas and Ayers, 1974). Aujourd'hui, *A. euteiches* est retrouvé dans toutes les régions du monde où est cultivé le pois (Wicker *et al.*, 2003).

### **2.2.1 Symptômes et conséquences**

Le pathogène oomycète *Aphanomyces euteiches*, présent dans le sol, attaque préférentiellement les cultures Fabacées, en particulier le pois (*Pisum sativum*) qui est la culture la plus sensible (Wicker *et al.*, 2001). À l'échelle de la parcelle, les symptômes visibles sont une chlorose et un nanisme des plantes, avec une forte réduction des parties aériennes (Figure 11). Lorsque les conditions climatiques sont favorables au développement de la maladie, une atteinte très précoce des cultures de pois de printemps peut être observée dès le stade 3-4 feuilles. Les racines présentent alors des lésions molles, d'abord translucides puis de couleur brune qui se répandent sur toute la racine jusqu'au collet ainsi qu'aux radicelles (Figure 12). La racine ainsi affaiblie peut alors aussi être soumise à l'attaque d'autres pathogènes opportunistes (*Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*), formant un complexe pathogène (Wu *et al.*, 2018). L'ensemble des lésions induites conduisent à la dégradation totale du système racinaire qui ne peut plus remplir ses fonctions pour l'alimentation en eau et en nutriments de la plante (Wu *et al.*, 2018). Quinze jours après infection, des symptômes sont visibles au niveau du système aérien, en particulier en lien avec une carence en azote en raison de la destruction des nodosités racinaires (Figure 12). Un étranglement au niveau de l'épicotyle, accompagné d'une décoloration foliaire jaunâtre par foyer ainsi qu'un nanisme des parties aériennes seront alors visibles au champ. Ce retard de croissance induit par la défaillance du système racinaire fait que la majorité des plantes n'atteindront pas le stade floraison. Pour celles





Figure 11 : Symptômes d'*A. euteiches* visibles à l'échelle de la parcelle dans une culture de pois (Source : Pilet-Nayel ML, booklet Projet Peamust)



Figure 12 : Symptômes d'*A. euteiches* sur les parties racinaires du pois (Pilet-Nayel ML, booklet Projet Peamust)

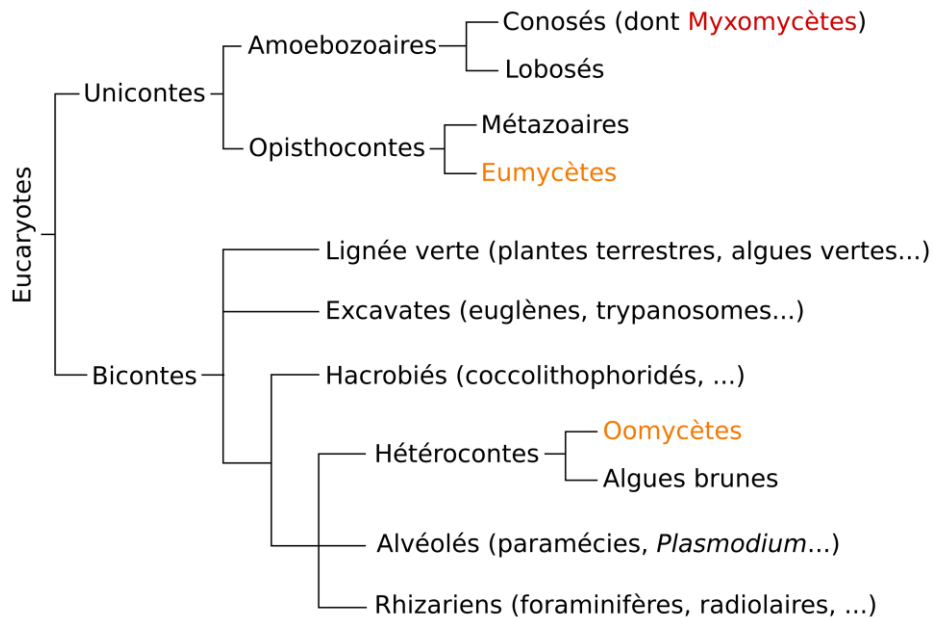


Figure 13 : Arbre phylogénétique simplifié des Eucaryotes, d'après Lecointre et Le Guyader (2016).

qui arrivent à se maintenir, le nombre de gousses ou de graines produites ainsi que la qualité de ces dernières peuvent être affectés (Chupp and Sherf, 1960; Papavizas and Ayers, 1974). Lorsque la maladie est sévère, cela peut même aboutir à la mort de la plante. Lors d'une infection plus tardive, peu de symptômes sont visibles sur la partie aérienne. Toutefois, les atteintes du système racinaire ont tout de même souvent des conséquences importantes sur le rendement de la culture. Ce pathogène est responsable de dégâts considérables dans les parcelles fortement infestées par celui-ci et est considéré à ce titre comme l'agent pathogène le plus nuisible du pois (Persson *et al.*, 1999). La longévité des formes infectieuses dans les sols combinée à l'absence de variété résistante ou de traitement efficace, augmente la difficulté de gestion de cette pathologie (Wu *et al.*, 2018).

### 2.2.2 Classification d'*Aphanomyces euteiches*

*A. euteiches* appartient à la classe des Oomycètes (division : Straménopiles ; règne : Chromistes, domaine : Eucaryotes) (Figure 13). Les Oomycètes ont longtemps été considérés comme des champignons à cause de nombreuses similitudes morphologiques (Latijnhouwers *et al.*, 2003). Cependant, ces organismes, au contraire des champignons, produisent des zoospores bi-flagellés mobiles (Papavizas and Ayers, 1974). Des études cytologiques et biochimiques ont pu mettre en évidence des différences additionnelles entre les oomycètes et les vrais champignons (Kamoun, 2003). Les Oomycètes sont finalement plus proches des diatomées et des algues brunes que des champignons (Baldauf *et al.*, 2000; Judelson, 2017). Au sein des Oomycètes se distingue 2 sous classes : les Saprolegniomycetidae (en milieu aquatique) et les Peronosporomycetidae (en milieu terrestre) (Jiang and Tyler, 2012). La sous-classe des Peronosporomycetidae comprend en majorité des espèces pathogènes des plantes, avec les ordres des Rhipidiales, des Pythiales (avec les espèces du genre *Pythium* par exemple) et des Peronosporales (avec les espèces du genre *Phytophthora* par exemple). La sous-classe des Saprolegniomycetidae, ou « moisissures aquatiques », inclut les ordres des Eurychasmales, des Leptomitales et des Saprolegniales, dont fait partie le genre *Aphanomyces* (Jiang and Tyler, 2012 ; Fawke *et al.*, 2015) (Figure 14).

### 2.2.3 Spectre d'hôtes et virulence

Le genre *Aphanomyces* comprend environ 40 espèces saprophytes ou de pathogènes de poissons, d'écrevisses et de plantes (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2009). La plupart ont un spectre

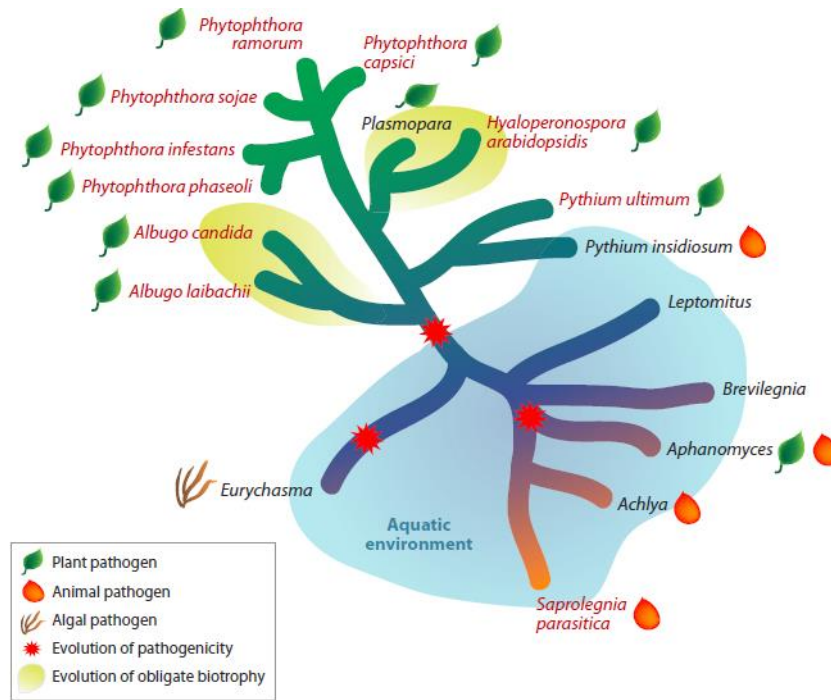


Figure 14 : Répartition des espèces oomycètes pathogènes des plantes et des animaux. Les gradients de couleurs indiquent la spécialisation pathogène envers les plantes (vert) ou les animaux (orange) (Jiang and Tyler, 2012).

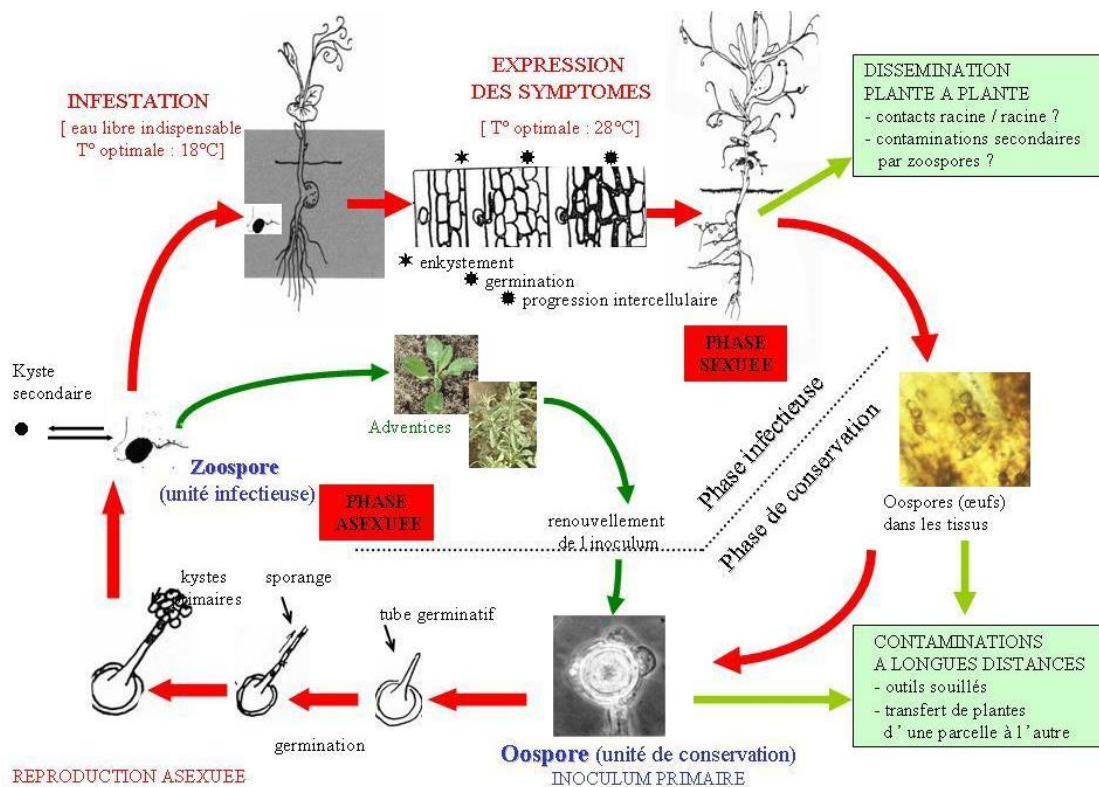


Figure 15 : Cycle de développement d'*Aphanomyces euteiches* (Wicker, 2001)

d'hôte assez large, appartenant à différentes familles végétales. Bien que les Fabacées représentent les hôtes principaux d'*A. euteiches* et sont les plus étudiés à cet égard, de nombreuses autres espèces peuvent être affectées (Papavizas and Ayers, 1974). Les dégâts peuvent être considérables chez les espèces les plus sensibles, comme le pois, le haricot, la luzerne mais aussi la lentille. Quelques Fabacées sont à l'inverse résistantes car ne développant pas de symptômes, comme la féverole, la vesce, le trèfle, le lupin et le pois chiche (Moussart *et al.*, 2008). Par ailleurs, certaines souches d'*A. euteiches* semblent plus spécifiques envers les cultures de haricot (Pfender and Hagedorn, 1982), tandis que d'autres non spécifiques sont capables d'infecter un plus large panel de Fabacées. Les diverses souches d'*A. euteiches* sont toujours plus virulentes contre le pois (Holub *et al.*, 1991 ; Malvick *et al.*, 1998). Wicker *et al.*, (2001) ont pu souligner la grande variabilité du degré de pathogénicité chez différents isolats et de la virulence des souches en fonction des hôtes testés. Dans cette étude, 70 % des isolats récupérés en France sont hautement virulents sur le pois, modérément sur la vesce et la luzerne et très faiblement voire pas du tout sur la fève ou le haricot (Wicker *et al.*, 2001).

#### 2.2.4 Cycle de vie

Le cycle de vie de cet oomycète inclut à la fois des étapes asexuées et sexuées. *A. euteiches* peut ainsi être trouvé sous deux formes (Figure 15). L'oospore constitue l'unité pathogène asexuée, résistante à la fois dans le temps et lorsque les conditions environnementales sont plus extrêmes. Ces structures peuvent ainsi survivre dans le sol pendant plus de 10 ans et résister à des températures jusque - 20 °C (Pfender and Hagedorn, 1983; Maufra, 1997) (Figure 16). Les zoospores sont quant à eux les unités pathogènes mobiles sexuées, très peu viables dans le temps, en général seulement quelques jours (Figure 16).

Brièvement, les oospores vont détecter la présence de la plante hôte par la sécrétion de certains composés dans les exsudats racinaires de celle-ci (Shang *et al.*, 2000). Le pathogène va alors soit directement s'enkyster sur la racine s'il en est proche, ou s'il en est loin, mettre en place la production de sporanges (Figure 16) sécrétant jusqu'à 300 zoospores flagellés chacun (Scott, 1961). Ces zoospores, dotées d'un flagelle, sont mobiles et se déplacent jusqu'à l'hôte, attirées par chimiotactisme (Deacon and Donaldson, 1993; Sekizaki *et al.*, 1993; Deacon and Saxena, 1998) puis vont s'enkyster. Tout d'abord, les zoospores se fixent sur l'épiderme de la cellule racinaire hôte puis perdent leur flagelle. Ensuite, les zoospores sans flagelle vont germer en formant un hyphes mycéliens qui va pénétrer et passer l'épiderme pour ensuite se développer de façon inter- puis intra-cellulaire. La colonisation de la racine par le pathogène conduit à de

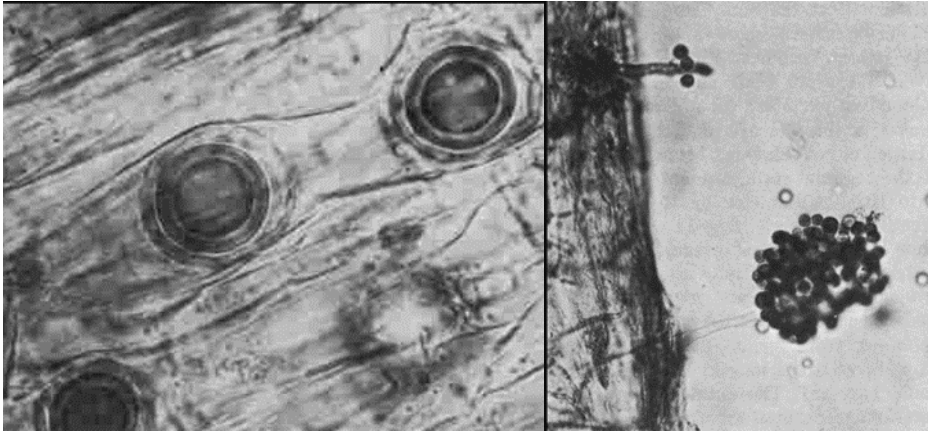


Figure 16 : Oospores et sporanges avec zoospores d'*Aphanomyces euteiches*. (Fry and Grünwald, 2010).

nombreuses nécroses (Manning and Menzies, 1980). Durant l'infection, *A. euteiches* comme d'autres pathogènes vont sécréter différents effecteurs protéiques, facilitant la colonisation des tissus végétaux (Unestam, 1966; Hogenhout *et al.*, 2009; Ramirez-Garcés *et al.*, 2016).

Une fois les tissus racinaires colonisés, la dernière étape du processus infectieux correspond à la formation de structures de reproduction sexuée et la production nouvelle d'oospores, unité de conservation de l'oomycète. Le stock d'inoculum augmente donc alors avec production des oospores qui constitueront l'inoculum primaire lors du prochain cycle infectieux (Mitchell and Yang, 1966).

### **2.2.5 Facteurs impactant la pourriture racinaire causée par *A. euteiches***

Les symptômes principaux de la maladie commencent en général à apparaître 7 à 14 jours après l'infection. Les facteurs majeurs conditionnant l'infection et le développement d'*A. euteiches* sont l'humidité du sol, la température et la quantité de pathogène présente dans le milieu (Papavizas and Ayers, 1974 ; Chan and Close, 1987 ; Pfender and Hagedorn, 1983). Plus les quantités de pathogènes sont grandes, plus l'incidence et la sévérité des symptômes sur les plantes seront importantes. Cette corrélation positive entre le nombre d'oospores et la sévérité de la maladie est largement démontrée en sol, que ça soit par expérimentation au laboratoire mais aussi en plein champ (Papavizas and Ayers, 1974 ; Sauvage *et al.*, 2007 ; Gangneux *et al.*, 2014). L'humidité du sol va quant à elle directement influencer la formation des sporanges et la libération des zoospores. Elle est essentielle au bon déplacement des zoospores vers les racines (Wu *et al.*, 2018). Le développement de la pourriture racinaire est fortement favorisé par une pluviométrie importante (Pfender, 1984). La température optimale pour l'infection par *A. euteiches* est aux alentours de 16 °C, entre 20 et 28 °C pour le développement des symptômes (Wu *et al.*, 2018). La maladie se développe donc dans les mêmes gammes de température que celles favorables à la croissance du pois (Pfender, 1984). Enfin, bien que parfois décrite comme pouvant se produire à n'importe quel stade du développement de la plante (Gaulin *et al.*, 2008), l'infection semble se produire le plus souvent au stade plantule (King and Parke, 1993).

Certaines caractéristiques physico-chimiques des sols peuvent être suppressives ou au contraire faciliter l'apparition de la pourriture racinaire du pois (Oyarzun *et al.*, 1997). Il existe une corrélation forte entre la concentration en calcium du sol et la suppression de la maladie, par l'inhibition de la production des zoospores (Heyman *et al.*, 2007). De la même façon, le contenu en argile ainsi qu'un pH élevé contribuent à réduire le développement de la maladie



(Persson and Olsson, 2000). Au contraire, la compaction des sols semble plutôt exacerber le développement de la pourriture racinaire du pois (Fritz *et al.*, 1995).

### **2.2.6 Distribution spatiale d'*Aphanomyces euteiches***

La distribution spatiale du pathogène à l'échelle de la parcelle a été étudiée verticalement et horizontalement par Moussart *et al.*, (2008). La quantification de la densité pathogène, évaluée à travers un test biologique du potentiel infectieux (décrit ci-après) a montré la présence du pathogène sous forme de foyers infectieux localisés dans les parcelles agricoles. La distribution spatiale horizontale est donc considéré comme non homogène. L'étude de la distribution spatiale verticale a montré que le potentiel infectieux est faible dans l'horizon du sol 0-10 cm, du fait de l'exposition aux UV. De la même façon, au-delà de 50 cm, le potentiel infectieux est faible car le sol n'est pas colonisé par les racines, ou très peu et avec un taux d'oxygène plus faible. Le principal de l'inoculum pathogène se situe donc entre 10 et 50 cm de profondeur.

## **2.3 Moyens de lutte contre la pourriture racinaire du pois provoquée par *A. euteiches***

### **2.3.1 Utilisation de produits phytosanitaires**

*A. euteiches* est résistant à la plupart des fongicides utilisés habituellement contre les oomycètes (Wu *et al.*, 2018). Cette inefficacité s'explique principalement par la composition biochimique de la paroi des oospores, constituée pour majeure partie de composés cellulosiques et de très peu de chitine (Tyler, 2001). Toutefois, quelques exceptions sont à noter, certains fongicides sont capables d'inhiber la croissance du mycélium d'*A. euteiches*, tels que le tebuconazole et l'epoxiconazole (Madoui *et al.*, 2009). Cependant, ces traitements ne peuvent être utilisés puisque seul le mycélium se voit impacté, et *A. euteiches* se trouve sous cette forme principalement *in planta*. D'autres fongicides (hydroxyisoxazole, hymexazol, fosetyl-Al, ethaboxam, etc.) ont pu de la même façon démontrer une certaine efficacité à supprimer le pathogène, ou en tout cas limiter le développement de la maladie, en conditions contrôlées, mais les effets restent très limités et particulièrement variables en plein champ (Kotova and Tsvetkova, 1980; Oyarzun *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 2019). Dans un contexte plus durable de



l'agriculture, l'utilisation des pesticides, nocifs pour la santé et l'environnement, n'est de toute façon plus une solution recommandée et envisageable à long terme.



Figure 17 : Echelle de notation des symptômes sur pois (Wicker, 2001).

### 2.3.2 Diagnostic préventif et prédictif de la maladie

Il s'agit ici de baser la stratégie de lutte sur l'évitement de la maladie plutôt que son éradication par l'évaluation de la quantité d'*A. euteiches* présente et la détermination d'un risque de développement de la maladie avant semis d'une culture sensible. Plusieurs méthodes existent mais la plus utilisée reste le test du potentiel infectieux créé par Anne Moussart. Ce test biologique va quantifier la pourriture racinaire chez des plantes de pois de printemps, par observation selon une échelle bien précise (Figure 17), après croissance de celles-ci dans le sol agricole à tester mises dans des conditions optimales pour une infection par *A. euteiches* (Kraft, 1990 ; Moussart *et al.*, 2008). Cette analyse permet d'estimer le risque *A. euteiches* d'un sol et permet d'éviter le semis de pois dans une parcelle présentant une trop forte infestation (Anne Moussart, fiche technique Terre Inovia). Une autre méthode possible consiste à détecter et quantifier le pathogène directement dans les sols, sans nécessité de cultiver des plantes, selon une approche moléculaire de PCR en temps réel (Sauvage *et al.*, 2007 ; Gangneux *et al.*, 2014). Gangneux *et al.*, (2014) ont ainsi pu montrer l'existence d'une relation linéaire positive entre la quantité d'ADN d'*A. euteiches* retrouvée dans le sol et le potentiel infectieux, réalisé en parallèle par un test biologique. Enfin, Larsen *et al.*, (2000), ont détecté et quantifié la présence du pathogène dans des racines selon une approche biochimique ciblant les acides gras.

### 2.3.3 Sélection variétale

Depuis 1960, de nombreux travaux de recherche se sont focalisés sur l'identification de résistance du pois à *A. euteiches*, notamment en décryptant les mécanismes génétiques liés à des résistances partielles observées, dans le but de créer des variétés résistantes à ce pathogène (Lockwood, 1960 ; Enquist, 1992 ; Pilet-Nayel *et al.*, 2002, 2005 ; Wicker *et al.*, 2003 ; Hamon *et al.*, 2011, 2013; Lavaud *et al.*, 2015, 2016 ; Desgroux *et al.*, 2016, 2018). Aucune accession de pois ne présente à ce jour de résistance complète. Seuls différents niveaux de résistance partielle ont pu être détectés. Plusieurs QTL (Quantitative Trait Loci) d'intérêt ont pu être identifiés selon une approche de cartographie de liaison de populations provenant de croisements entre lignées parentales de géotypes contrastées. Par exemple, les travaux de Lavaud *et al.* (2015), Desgroux *et al.*, (2016) ont pu mettre en évidence de nombreux QTL d'intérêt de résistance à *A. euteiches*, via un programme de sélection variétale. Desgroux *et al.*, (2018) ont montré une interdépendance entre la résistance à la pourriture racinaire du pois causée par *A. euteiches* et les traits racinaires du pois. Ces découvertes pourraient rapidement



permettre de trouver une solution de résistance à *A. euteiches*. Malgré tout, la conception par sélection variétale d'une lignée résistante (totalement ou partiellement) a aussi des limites. Comme beaucoup d'organismes, les oomycètes possèdent une grande flexibilité génétique et donc une grande capacité d'adaptation. Le contournement de la résistance des plantes est souvent observé, par exemple chez la luzerne (Munkvold, 2001, Latijnhouwers *et al.*, 2003).

#### **2.3.4 Leviers agronomiques**

Différents leviers agronomiques peuvent être déployés dans l'objectif de limiter le développement de la pourriture racinaire du pois. Ainsi, les successions de cultures constituent un outil souvent recommandé pour gérer les phytopathologies (Krupinsky *et al.*, 2002). En particulier, l'espacement et/ou la diminution de la fréquence des cultures de pois dans la succession permet de diminuer la sévérité des symptômes (Temp and Hagedorn, 1967 ; Hagedorn, 1984 ; Oyarzun *et al.*, 1993 ; Wu *et al.*, 2018), de même que l'introduction d'espèces résistantes ou non-hôtes (Chan and Close, 1987 ; Moussart *et al.*, 2013). Toutefois, la praticité et l'efficience de mobilisation du levier des successions culturales restent limitées du fait de la longévité longue des oospores d'*A. euteiches* dans les sols (Papavizas and Ayers, 1974). De plus, de nombreux hôtes alternatifs, ne présentant pas ou peu de symptômes peuvent contribuer à maintenir les niveaux d'inoculum pathogène dans les sols (Papavizas and Ayers 1974).

Certaines espèces végétales comme celles de la famille des Brassicaceae, utilisées en couverture sur le sol, incluses dans une rotation, ou par incorporation de tissus végétaux dans le sol, présentent un intérêt particulier pour la lutte contre les pathogènes. L'incorporation et la dégradation des tissus végétaux dans le sol, ou biofumigation, entraîne la libération de molécules toxiques, comme les isothiocyanates, issus de l'hydrolyse des glucosinolates (Gimsing and Kirkegaard, 2009). L'incorporation de résidus de culture de chou, moutarde, colza ou navet, a montré une certaine efficacité pour réduire la sévérité de la pourriture racinaire du pois (Papavizas, 1966 ; Muehlchen, 1990). Dans le cas d'une utilisation des brassicacées comme couvert végétal intermédiaire ou au sein des rotations des cultures, les glucosinolates et leurs produits d'hydrolyse seraient alors libérés par les racines tout au long de la croissance des plantes (Rumberger and Marschner, 2003). Hossain *et al.*, (2014) ont montré l'efficacité d'une couverture végétale constituée de moutardes brune et blanche précédant une culture de pois pour limiter le développement de la maladie. D'autres études montrent l'effet des composés volatiles libérés par la moutarde ou le chou sur la réduction de la mobilité des zoospores (Muehlchen *et al.*, 1990 ; Smolinska *et al.*, 1997). Outre les Brassicaceae, des cultures de maïs

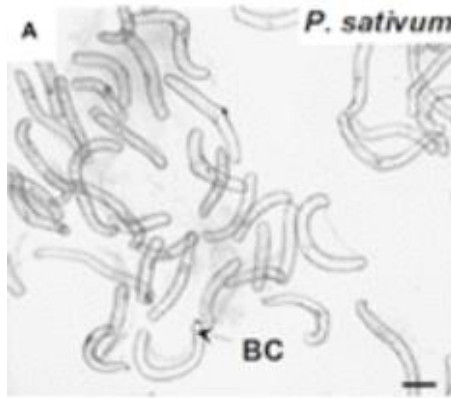


Figure 18 : Cellules bordantes (BC) libérées à l'extrémités des racines de *Pisum* (Driouich *et al.*, 2010)

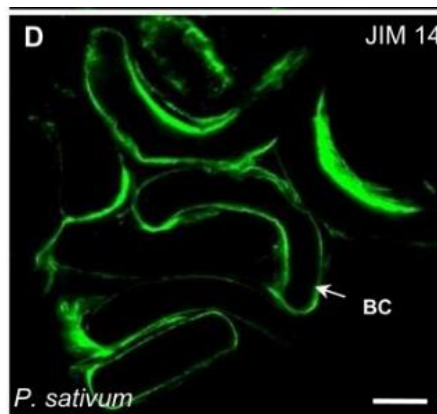


Figure 19 : Mise en évidence de la présence d'arabinogalactanes protéines (AGP) au niveau des cellules bordantes du pois ; par immunomarquage et observation au microscope à fluorescence (Cannesan *et al.*, 2012).

ainsi que des espèces de la famille des Poaceae, comme l'avoine ou le seigle ont permis de réduire la sévérité de la pourriture racinaire du pois (Fritz *et al.*, 1995; Williams-Woodward *et al.*, 1997). Ainsi Fritz *et al.*, (1995) ont pu montrer que les saponines libérées par l'avoine entraînent une lyse des zoospores d'*A. euteiches*.

### 2.3.5 Exploiter les mécanismes de défense racinaire du pois

Une autre piste consiste à exploiter les mécanismes de lutte naturels existants chez les plantes. En effet, les plantes, en réponse aux attaques pathogènes, mettent en place un système de défense particulièrement complexe, à travers par exemple l'activation de gènes de défense, la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), la synthèse de protéines PR (pathogenesis-related), un renforcement localisé des parois cellulaires et la production de métabolites secondaires possédant des propriétés antimicrobiennes (Walters, 2011 ; Ahuja *et al.*, 2012; Chuberre *et al.*, 2018). Ces métabolites, globalement appelées phytoalexines, présentent des activités antimicrobiennes envers une multitude de pathogènes et constituent à ce titre une part très importante du répertoire de défense des plantes (Hammerschmidt, 1999; Ahuja *et al.*, 2012). Chez le pois, il a été constaté une production plus importante d'une phytoalexine appelée pisatine en cas d'infection par *A. euteiches* dans certaines zones de la racine, en particulier dans les cellules bordantes (Figure 18) (Cannesan *et al.*, 2011). De nombreux travaux ont contribué à mettre en lumière la forte implication de ces cellules dans la défense du pois contre *A. euteiches* (Cannesan *et al.*, 2011; Driouich *et al.*, 2013; Hawes *et al.*, 2016). Ces cellules, produites par le méristème apical de la racine, constituent la première ligne de front de cet organe en interactions fortes avec les microorganismes du sol. Les cellules bordantes sécrètent de nombreux autres composés, comme par exemple les AGPs (ArabinoGalactane Protéines), appartenant à la superfamille des glycoprotéines. Cannesan *et al.* (2012) (Figure 19) ont montré que les AGP provenant de l'apex racinaire et des cellules bordantes du pois sont capables d'attirer spécifiquement les zoospores d'*A. euteiches*, de provoquer un enkystement précoce puis d'inhiber leur germination. Ces composés présentent donc un intérêt pour la lutte contre ce pathogène. Par la suite, des travaux, réalisés en collaboration avec l'unité AGHYLE, ont cherché à évaluer la potentialité biocontrôle des AGPs par incorporation en enrobage de graines de pois. Les résultats obtenus après culture en sol montrent une diminution significative des symptômes observés sur les racines (Cannesan, com. pers.).



### 2.3.6 Lutte biologique

La lutte biologique se base sur l'utilisation soit de prédateurs ou de parasites naturels soit de substances directement extraites d'organismes vivants pour contrôler d'autres organismes nuisibles (Pal and Gardener, 2006 ; O'Brien, 2017). Les produits de biocontrôle qui peuvent être des macroorganismes sont aussi des microorganismes ou encore des médiateurs chimiques comme les phéromones, les kairomones et des substances naturelles d'origine végétale, animale ou minérale (Article L.253-6, code rural et de la pêche maritime). Le biocontrôle repose sur une protection en favorisant des mécanismes et des interactions naturelles pour lutter contre les ennemis des cultures. Il s'appuie généralement sur la gestion des équilibres des populations d'agresseurs plutôt que sur leur éradication.

#### 2.3.6.1 Utilisation de microorganismes comme agent de lutte contre les pathogènes

L'utilisation de microorganismes bénéfiques comme agent de biocontrôle est aujourd'hui considérée comme une alternative réaliste aux traitements chimiques pour lutter contre les phytopathologies. La valeur de ces agents microbiens pour le contrôle des maladies a longtemps été négligée mais est aujourd'hui de plus en plus reconnue et étudiée (Alabouvette, 2001 ; Howell, 2003 ; Kannan and Sureendar, 2009 ; Muthukumar *et al.*, 2010 ; Sarma *et al.*, 2015 ; Chen *et al.*, 2017 ; Palmieri *et al.*, 2017). Certains microorganismes, souvent issus du sol, présentent des propriétés bénéfiques pour la santé et la croissance des plantes (Barea *et al.*, 2005, cf paragraphe 2.2.8). Les premières souches bactériennes commercialisées en tant que solution biocontrôle pour lutter contre des champignons pathogènes appartenaient au genre *Pseudomonas* (Emmert and Handelsman., 1999) et *Bacillus* dont les endospores permettent une viabilité plus longue lors du stockage (Cawoy *et al.*, 2011).

Chez les champignons, les agents de biocontrôle les plus utilisés à travers le monde appartiennent au genre *Trichoderma*, en particulier des souches des espèces *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* et *Trichoderma virens* (Tronsmo and Hjeljord, 1998). L'intérêt de l'utilisation des champignons mycorhiziens arbusculaires pour la protection des plantes contre des pathogènes issus du sol va en grandissant (Hooker *et al.*, 1994 ; Dar and Reshi, 2017). Enfin, parmi les oomycètes, *Pythium oligandrum* est largement reconnu pour son efficacité (Gerbore *et al.*, 2014).

De nombreux genres microbiens ont ainsi pu être identifiés comme possédant une action biocontrôle envers les oomycètes pathogènes (Bibi *et al.*, 2012; Shrestha *et al.*, 2014) et plus



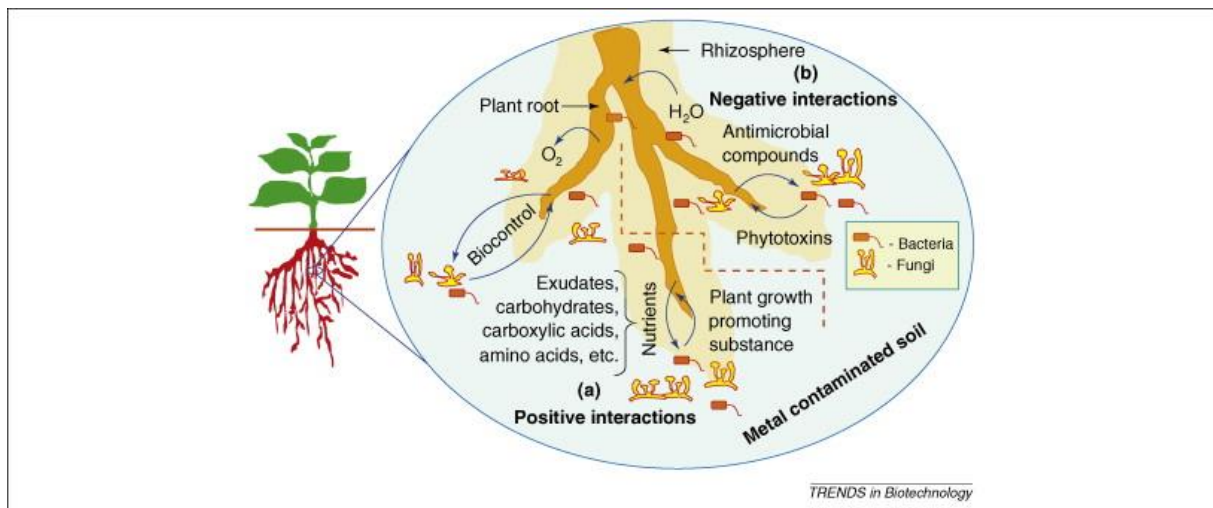


Figure 20 : Schéma récapitulatif des mécanismes d'action directs et indirects mis en œuvre par les microorganismes de biocontrôle (Rajkumar *et al.*, 2009)

particulièrement *A. euteiches*. Des études récentes ont pu mettre en lumière l'efficacité de protection apportée par différentes espèces fongiques et bactériennes contre *A. euteiches*, telles que par exemple *Pseudomonas fluorescens* (Parke *et al.*, 1991 ; Bowers and Parke, 1993), *Burkholderia cepacia* (Heungens and Parke, 2001), *Gliocladium roseum* (Xue, 2002), *Clonostachys rosea* (Xue, 2002), *Trichoderma harzianum* (Prashar and Vandenberg, 2017) ou encore des champignons mycorrhiziens (Bødker *et al.*, 2002; Thygesen *et al.*, 2004). L'ajout de spores de certaines espèces bactériennes (souches des genres *Bacillus* et *Paenibacillus*) dans l'enrobage de graines de pois ont permis de contrôler le développement de la pourriture racinaire du pois au champ (Wakelin *et al.*, 2002). Toutefois, encore trop souvent, l'efficacité observée au laboratoire ou en conditions contrôlées n'est pas reproductible au champ (Bødker *et al.*, 2002; Thygesen *et al.*, 2004). Plus récemment, Godebo *et al.* (2020) ont quant à eux réalisé un screening des potentialités d'un large panel de souches bactériennes isolées du sol pour leur activité biocontrôle. Cette étude a permis de mettre en évidence la multitude des genres bactériens présents dans les sols présentant un intérêt pour la lutte contre la pourriture racinaire du pois (*Rhizobium*, *Lysobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Pantoea*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Brevibacillus*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pedobacterium*, *Variovorax*).

### **2.3.6.2 Mécanismes d'action**

Une grande variété de mécanismes directs et indirects a été identifiée pour expliquer les effets biocontrôles des microorganismes envers les pathogènes (Figure 20). Leur compréhension est essentielle au succès du biocontrôle.

#### **2.3.6.2.1 Résistance systémique induite et phénomène de priming**

Les plantes vont se défendre contre les pathogènes en mettant en place une vaste série de mécanismes physiques et chimiques. L'induction de ces mécanismes de défense se fait en réponse à des stimuli (PAMPS) reconnus par la plante. Certains microorganismes bénéfiques vont induire de la même façon un déclenchement des mécanismes de défense dans toute la plante, permettant ainsi une meilleure résistance face aux pathogènes (résistance systémique induite). Les microorganismes, non pathogènes pour la plante pourtant, peuvent en effet produire des molécules spécifiques (MAMPs) reconnues par cette dernière et conduisant à l'enclenchement des réactions de défense telles que la production de ROS, de phytoalexines,

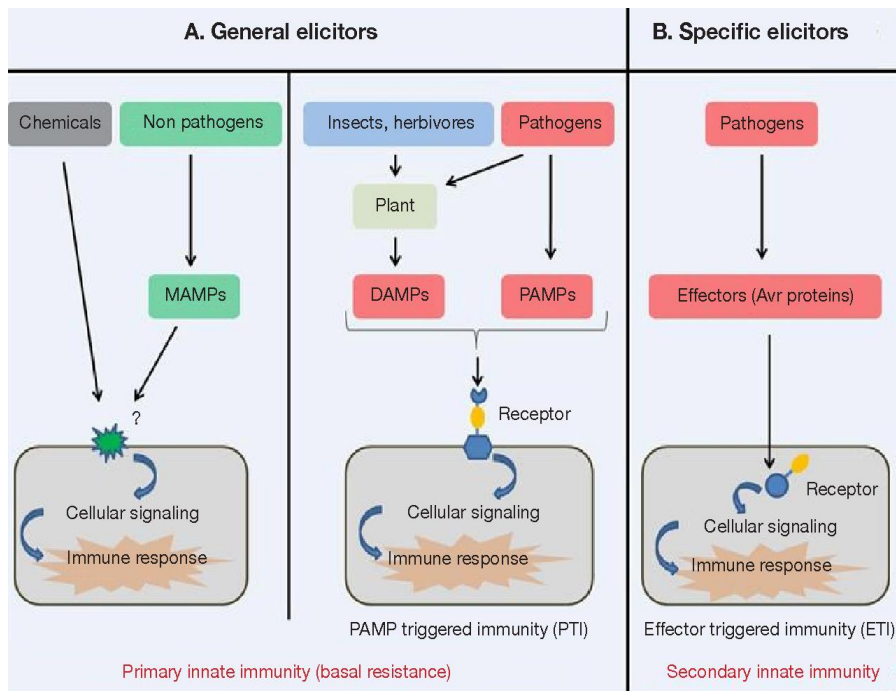


Figure 21 : Catégories d'éliciteurs (Henry *et al.*, 2012).

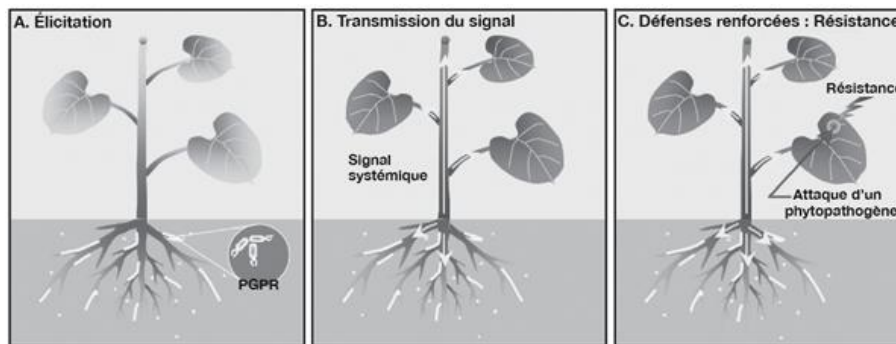


Figure 22 : Résistance systémique induite : A) élicitation : perception des éliciteurs produits par les rhizobactéries ; B) transmission du signal ; C) en cas d'attaque par un pathogène, la plante sera en mesure de répondre plus efficacement à l'agression, (Jourdan *et al.*, 2008)

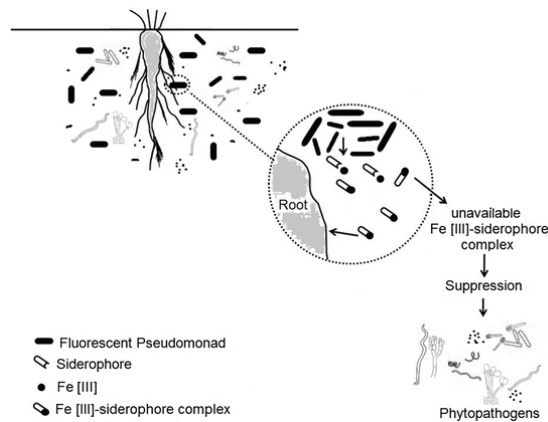


Figure 23: Rôle des bactéries produisant des sidérophores dans la suppression des pathogènes (Chaudhari *et al.*, 2017).

de composés phénoliques, de protéines PR, ou encore la modification des parois cellulaires (Figure 21) (Pieterse *et al.*, 2014; Wiesel *et al.*, 2014). Au contraire de cette induction directe, généralement coûteuse en énergie pour la plante, un phénomène particulièrement intéressant est celui du priming (ou élicitation). Le stimulus que représente l'application de microorganismes bénéfiques va agir comme un signal d'alarme pour la plante, entraînant des modifications physiologiques, transcriptionnelles, métaboliques voire même épigénétiques parfois. Lors d'un défi ultérieur, tel que l'attaque par un pathogène, les mécanismes de défense des plantes vont être déclenchés plus rapidement et de façon moins coûteuse en énergie, permettant ainsi d'accroître la résistance de celles-ci à la maladie (Figure 22). Cet effet peut être maintenu durant tout le cycle de vie de la plante, voire même transmis aux générations suivantes (Conrath *et al.*, 2015 ; Mauch-Mani *et al.*, 2017).

#### **2.3.6.2.2 Compétitions pour les nutriments et l'espace**

Le succès de l'infection d'une plante hôte par un pathogène fongique, même s'il est nécrotrophe, est directement lié à la disponibilité en nutriments dans le milieu. Ceux-ci sont en effet indispensables pour la germination initiale des spores et la formation des structures envahissant les tissus végétaux. De la même façon, les pathogènes bactériens sont souvent dépendants des nutriments présents dans le milieu pour se multiplier jusqu'à atteindre un niveau de populations suffisant afin d'attaquer l'hôte (Köhl *et al.*, 2019). Cette dépendance les rend de ce fait vulnérable à tout microorganisme présentant une compétitivité plus importante constituant ainsi de bons candidats en tant qu'agents de biocontrôle (Blumenstein *et al.*, 2015). De la même façon, l'efficacité à utiliser les microéléments, rares mais essentiels, comme le fer ou le manganèse, constitue un avantage compétitif certain. Ainsi, les microorganismes qui ont la capacité de produire de grande quantité de sidérophores à forte affinité pour les ions ferriques  $Fe^{3+}$  vont jouer un rôle important dans la suppression des pathogènes produisant eux des quantités moindres de sidérophores et à plus faible affinité pour le fer (Whipps, 2001 ; Ahmed and Holmström, 2014; Chaudhari *et al.*, 2017) (Figure 23). Les microorganismes présentant une compétitivité spatiale supérieure pour l'occupation physique du milieu constituent aussi des agents de biocontrôle intéressants car pouvant réduire ou retarder la colonisation des racines par le pathogène (Ghorbanpour *et al.*, 2018; Köhl *et al.*, 2019).

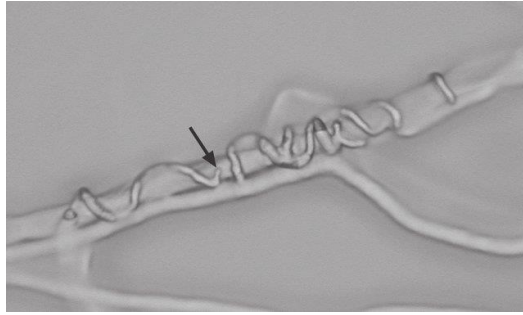


Figure 24 : Enroulement mycoparasitaire de *Trichoderma atroviride* autour d'un hyphe de *Botrytis cinerea*. Les flèches indiquent le site de pénétration (Steyaert, 2003).

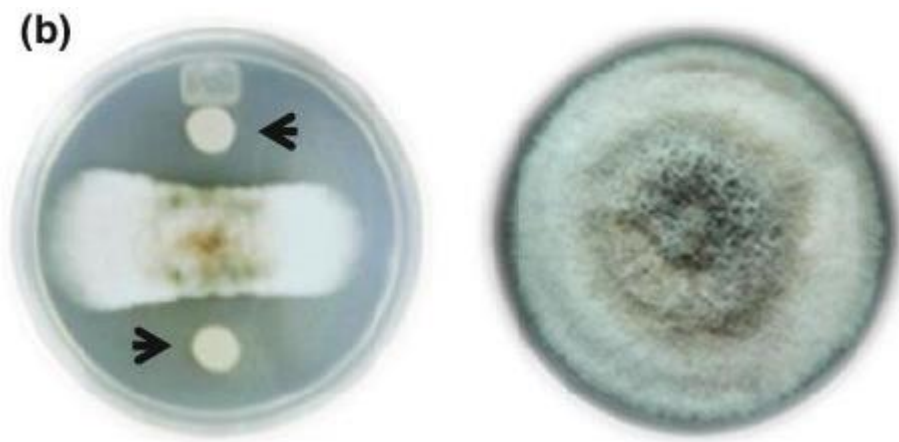


Figure 25 : Exemple de tests de confrontation entre isolats bactériens et *Colletotrichum gloeosporioides*, comparé à la croissance du pathogène seul (De Los Santos-Villalobos *et al.*, 2012).

### 2.3.6.2.3 Antagonisme direct par hyperparasitisme

L'hyperparasitisme représente le mécanisme le plus connu permettant de lutter contre les organismes pathogènes (Pal and Gardener, 2006). Il implique la croissance de l'agent de biocontrôle au détriment du pathogène qui constitue alors la source de nutriments. Ce type d'interactions est souvent observé entre les champignons (mycoparasitisme), beaucoup plus rarement entre les bactéries (Köhl *et al.*, 2019). C'est un des principaux mécanismes expliquant le succès des espèces du genre *Trichoderma* en tant qu'agent de biocontrôle (Qualhato *et al.*, 2013) ainsi que par exemple *Gliocladium catenulatum* (Papavizas, 1985). Le mycoparasitisme repose souvent sur l'enroulement de l'agent de biocontrôle autour des hyphes du champignon pathogène (Figure 24), puis la dégradation de la paroi des cellules par l'action d'une large gamme d'enzymes comme des chitinases (produites par exemple par *Bacillus thuringiensis* et *B. licheniformis* (Gomaa, 2012)), de la  $\beta$  1-3 glucanase (produite par exemple par *Trichoderma harzianum* (Ait-Lahsen *et al.*, 2001)), de protéases (à nouveau retrouvés chez *T. harzianum* (Elad and Kapat, 1999)), de cellulases (produites par *Pythium oligandrum* (Picard *et al.*, 2000)), de lipases (observé chez *Streptomyces* (Karimi *et al.*, 2012)) , d'amylases (retrouvées chez *Bacillus* et *Pseudomonas* (Abed *et al.*, 2016)) (Junaid *et al.*, 2013; Köhl *et al.*, 2019). La production de ces enzymes constitue une caractéristique recherchée lors d'un screening biocontrôle.

### 2.3.6.2.4 Antibiose par production de métabolites à propriété antimicrobienne

De nombreux microorganismes produisent des métabolites secondaires présentant des propriétés antimicrobiennes (Thomashow *et al.*, 2008) (Figure 25). La production de telles métabolites est souvent considérée comme le mode d'action le plus puissant des microorganismes, leur apportant un formidable avantage compétitif dans leur environnement (Raaijmakers and Mazzola, 2012). La production de différents types d'antibiotiques et antifongiques a été rapportée chez de nombreux genres bactériens (Junaid *et al.*, 2013). Au sein du genre *Bacillus*, la production de composés comme l'iturine, la surfactine ou la fengycine est souvent rapportée (Ongena and Jacques, 2008). Chez les *Pseudomonas*, de nombreuses molécules antibiotiques sont retrouvées telles que le DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol), la pyrrolnitrine ou la phénazine (Srivastava *et al.*, 2012). Certains champignons peuvent aussi produire des composés antimicrobiens, comme par exemple la 6-PAP (6-pentyl- $\alpha$ -pyrone), la gliovirine, la gliotoxine, la viridine, etc., retrouvés chez des espèces des genres *Trichoderma* et

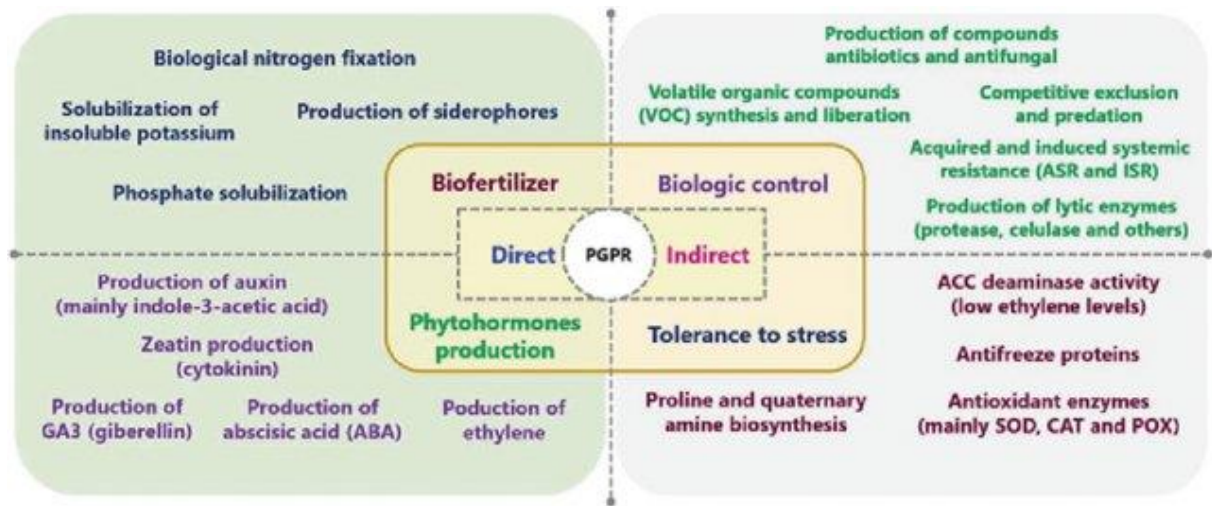


Figure 26 : Ensembles des mécanismes d'action directs et indirects sur les plantes des PGPR (Chauhan et al. 2015 ; Pii et al. 2015) dans Figueiredo *et al.*, (2016).

*Clonostachys* (Ghorbanpour *et al.*, 2018). La capacité d'un même microorganisme à produire plusieurs types d'antibiotiques constitue une caractéristique pouvant maximiser l'efficacité biocontrôle, en particulier par la possibilité d'une action envers plusieurs pathogènes simultanément (Glandorf *et al.*, 2001). D'autres métabolites produites par des microorganismes peuvent aussi contribuer à la suppression de pathogènes, telles que le cyanure d'hydrogène (HCN), inhibiteur de la cytochrome oxydase (Schippers *et al.*, 1990)

#### **2.3.6.2.5 Stimulation de la croissance des plantes**

Certains agents de biocontrôle peuvent réduire l'incidence des maladies des cultures à travers une action de promotion de la croissance des plantes. Augmenter et soutenir la croissance des plantes durant les stades les plus sensibles à l'infection par les pathogènes est une façon possible de modérer les effets délétères et les dommages occasionnés (Junaid *et al.*, 2013). Ainsi, les bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) sont bien connues pour leur intérêt vis-à-vis de la croissance des plantes, *via* une multitude de mécanismes (Figure 26). Cette large gamme de microorganismes peut agir directement sur le métabolisme des plantes par la synthèse de phytohormones, telles que l'auxine (IAA), leur métabolisation ou encore en modifiant leur synthèse par les plantes (Tsukanova *et al.*, 2017). Un autre mode d'action possible pour soutenir la croissance des plantes est d'intervenir sur la nutrition des plantes par une augmentation de la solubilisation des éléments nutritifs dans le sol ou par une augmentation de l'absorption de ces derniers par stimulation de la croissance ou modification de l'architecture racinaire (Whipps, 2001 ; Chaube *et al.*, 2004).

#### **2.3.6.3 Innovations et tendances actuelles**

Bien souvent l'efficacité et la reproductibilité d'action d'un agent de biocontrôle microbien pour lutter contre une phytopathologie peut être aléatoire d'une année sur l'autre, d'une situation à l'autre (Mathre *et al.*, 1999). Pour surmonter cette difficulté, différentes pistes sont étudiées. Ainsi une attention particulière va être portée à la formulation des produits (Keswani *et al.*, 2016). Une autre approche repose sur l'application de composés spécifiques ou complexes, agissant comme prébiotiques, pour stimuler la microflore bactérienne et fongique (Mazzola and Freilich, 2017). La recherche et la mise en œuvre de moyens de lutte efficaces contre les phytopathologies mettent de plus en plus en lumière la nécessité de considérer le système dans son intégralité. En effet les agents microbiens vont interagir à la fois



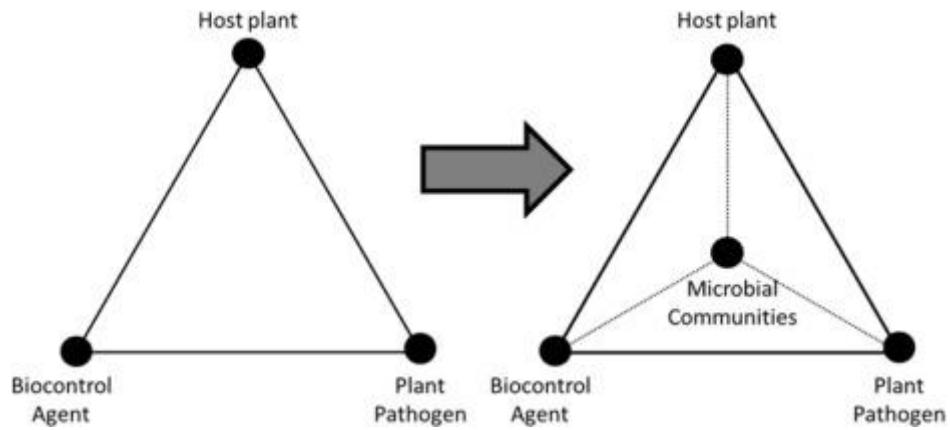


Figure 27 : Intégration des communautés microbiennes dans le triangle de la recherche actuelle en phytopathologie (Massart *et al.*, 2015).

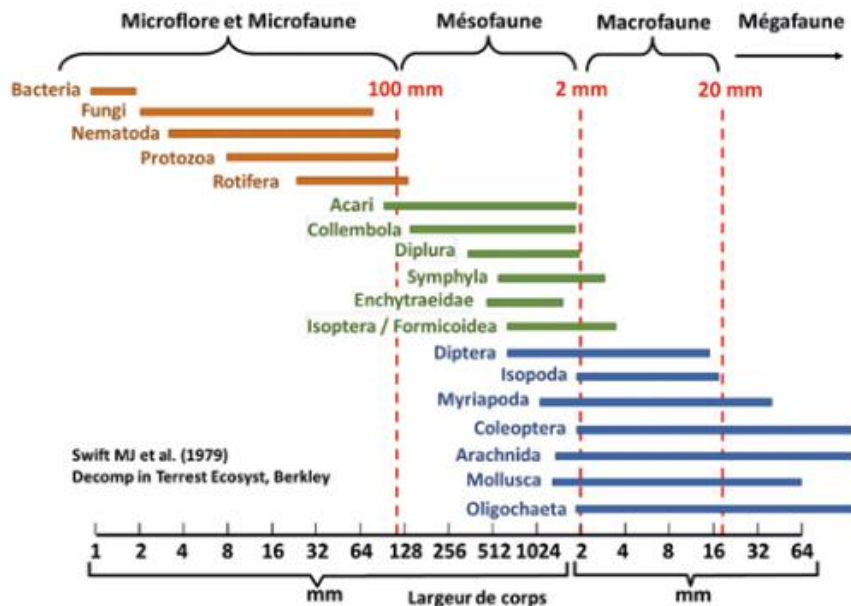


Figure 28 : Classification par taille des organismes du sol (Hattenschwiler *et al.*, 2018).

avec la plante, le pathogène ciblé mais aussi avec la communauté microbienne déjà en place (Figure 27). En effet l'application de ces agents microbiens exogènes peut aussi avoir un impact collatéral sur la communauté microbienne native (Massart *et al.*, 2015).

## **2.4 Interactions plantes - microorganismes**

Outre les interactions fortes avec les composantes physico-chimiques du sol, la racine des plantes va être en étroite relation avec le compartiment biotique du sol, en particulier les communautés microbiennes (Gregory, 2006). La diversité microbienne du sol, longtemps oubliée dans l'étude des pathosystèmes, intervient pourtant fortement dans la santé et la croissance des plantes (Berendsen *et al.*, 2012; Raaijmakers *et al.*, 2009).

### **2.4.1 La rhizosphère : hotspot de diversité et d'interactions**

Le sol est un environnement abritant une grande abondance et une grande diversité d'êtres vivants dont de nombreux microorganismes (Figure 28). Ceux-ci jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'écosystème par la multitude des fonctions biologiques qu'ils remplissent telles que par exemple la minéralisation de la matière organique, la structuration du sol, la stabilité et le fonctionnement du sol, la dépollution ou encore la régulation des pathogènes. L'ordre de grandeur de la biomasse microbienne est évalué à 3,5 et 1,5 tonnes par hectare respectivement pour les champignons et les bactéries (Champomier-Vergès and Zagorec, 2015). La diversité microbienne des sols est quant à elle estimée entre  $10^4$  et  $10^6$  génotypes par gramme de sol (Schloss and Handelsman, 2006). Cette biodiversité est soumise à de nombreux facteurs édaphiques qui vont influencer sa composition, en particulier le pH, souvent considéré comme le plus influant (Fierer and Jackson, 2006). Outre ces contraintes de type édaphique, les plantes vont jouer un rôle important sur la composition des communautés microbiennes du sol (Bulgarelli *et al.*, 2013; Philippot *et al.*, 2013). En effet, les plantes exsudent par leurs racines une grande variété de composés dans le sol, comme des sucres simples, des acides aminés ou encore des acides organiques, des flavonoïdes, des protéines, des acides gras ; par des mécanismes de diffusion simple, par l'intermédiaire de canaux ioniques, des transporteurs membranaires ou encore par transport *via* des vésicules (Neumann and Römheld, 2000; Bais *et al.*, 2006; Badri *et al.*, 2009; Sasse *et al.*, 2018) (Figure 29). Les composés exsudés varient selon les espèces végétales (Gransee and Wittenmayer, 2000 ; Bais *et al.*, 2006 ; Phillipot *et al.*,

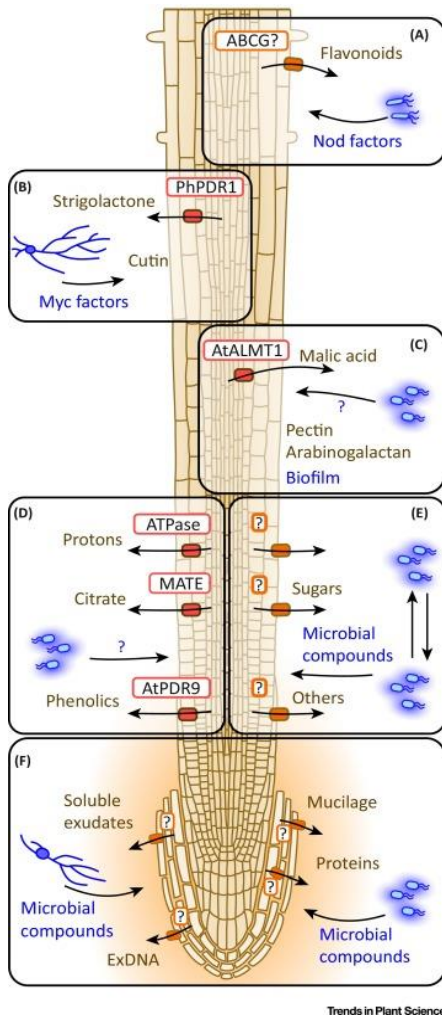


Figure 29 : Réseaux d'échange de métabolites dans la rhizosphère. (A) flavonoïdes, (B) strigolactones, (C) acide malique, (D) protons, citrate, composés phénoliques, (E) sucres et autres, (F) mucilage, protéines, et ADN extracellulaire. En bleu : composants microbiens ; en marron : composants végétaux ; en rouge : transporteurs connus ; en orange : transporteurs non caractérisés. (Sasse *et al.*, 2018).

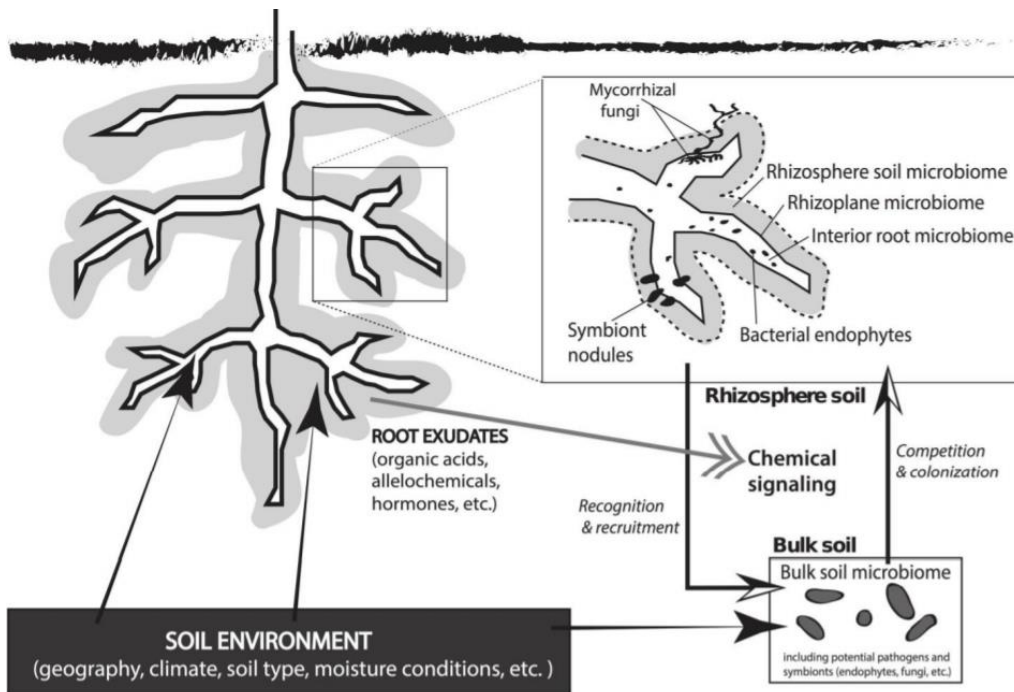


Figure 30 : Vue d'ensemble des interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère et le sol entourant les racines (Coats and Rumpho, 2014).

2013) entre les différentes parties du système racinaire d'une même plante (Uren, 2007), selon le stade de développement de la plante (Gransee and Wittenmayer, 2000), le type de sol (Neumann and Römheld, 2000) ou encore sous l'action de différents facteurs biotiques et abiotiques (Flores *et al.*, 1999; Philippot *et al.*, 2013).

La diversité des composés sécrétés va ainsi créer un environnement unique autour des racines des plantes, en altérant de façon globale la chimie du sol. Cette zone d'influence, appelée la rhizosphère (Figure 30), présente une densité microbienne nettement supérieure au reste du sol, entre  $10^8$  et  $10^9$  bactéries par gramme de sol et une diversité importante, jusqu'à plus de 10 000 espèces (Roesch *et al.*, 2007 ; Mendes *et al.*, 2018). Les exsudats racinaires sont utilisés comme source de nutriments par certains microorganismes du sol. Ils peuvent aussi parfois présenter des propriétés antimicrobiennes (Bais *et al.*, 2006). Ils constituent à ce titre un facteur majeur du déterminisme de la structure et de la diversité des populations microbiennes dans la rhizosphère (Bever *et al.*, 2012; Zhahnina *et al.*, 2018). Tout comme le système digestif chez les animaux, le système racinaire des plantes est donc peuplé et entouré d'une communauté microbienne complexe et spécifique : le microbiome racinaire (Hacquard *et al.*, 2015). La rhizosphère constitue alors le siège privilégié des multiples interactions qui s'établissent entre la plante et ces microorganismes, qu'elles soient bénéfiques ou non (Figure 30), (Philippot *et al.*, 2013).

#### **2.4.2 Le microbiome à la rescousse**

Les plantes sont colonisées par une riche diversité de microorganismes formant le microbiome des plantes, constitué des communautés microbiennes de la rhizosphère, de l'endosphère et de la phyllosphère (Figure 31). Ces consortia microbiens complexes vont avoir un impact important sur la croissance des plantes et la productivité (Berendsen *et al.*, 2012 ; Chaparro *et al.*, 2012 ; Hacquard *et al.*, 2015 ; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015 ; Lareen *et al.*, 2016 ; Busby *et al.*, 2017 ; Mendes *et al.*, 2018).

Le génome collectif que représente cette communauté microbienne complexe, bien plus grand et divers que celui de la plante, amène à le considérer finalement comme le second génome de cette dernière, en particulier au vue de la multitude des fonctions d'intérêt qu'il porte (Berendsen *et al.*, 2012). En conséquence, une vision holistique des plantes se dessinent. Ces dernières ne doivent plus être vues comme des entités simples et autonomes mais plutôt comme un holobionte à part entière (un macroorganisme et ses associés microbiens) au sein duquel tous

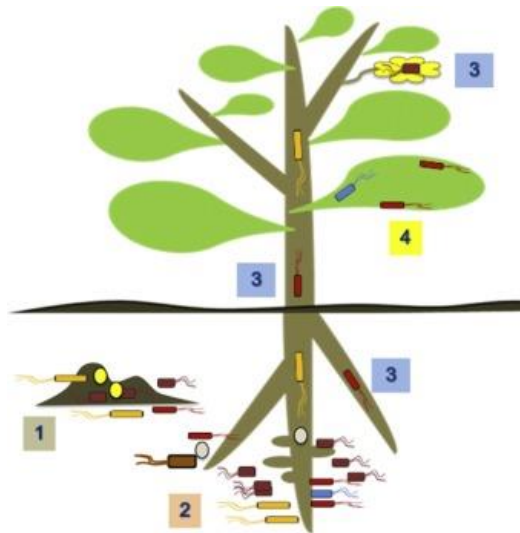


Figure 31 : Le microbiome associé à la plante, (1) sol hors rhizosphère, où les métabolites des racines n'ont pas d'influence sur les microorganismes ; (2) rhizosphère, zone du sol sous l'influence des exsudats racinaires. (3) endosphère, régions internes des tissus végétaux habités par des microorganismes endophytes. (4) phyllosphère, surface et apoplaste des feuilles (del Carmen Orozco-Mosqueda, 2018).

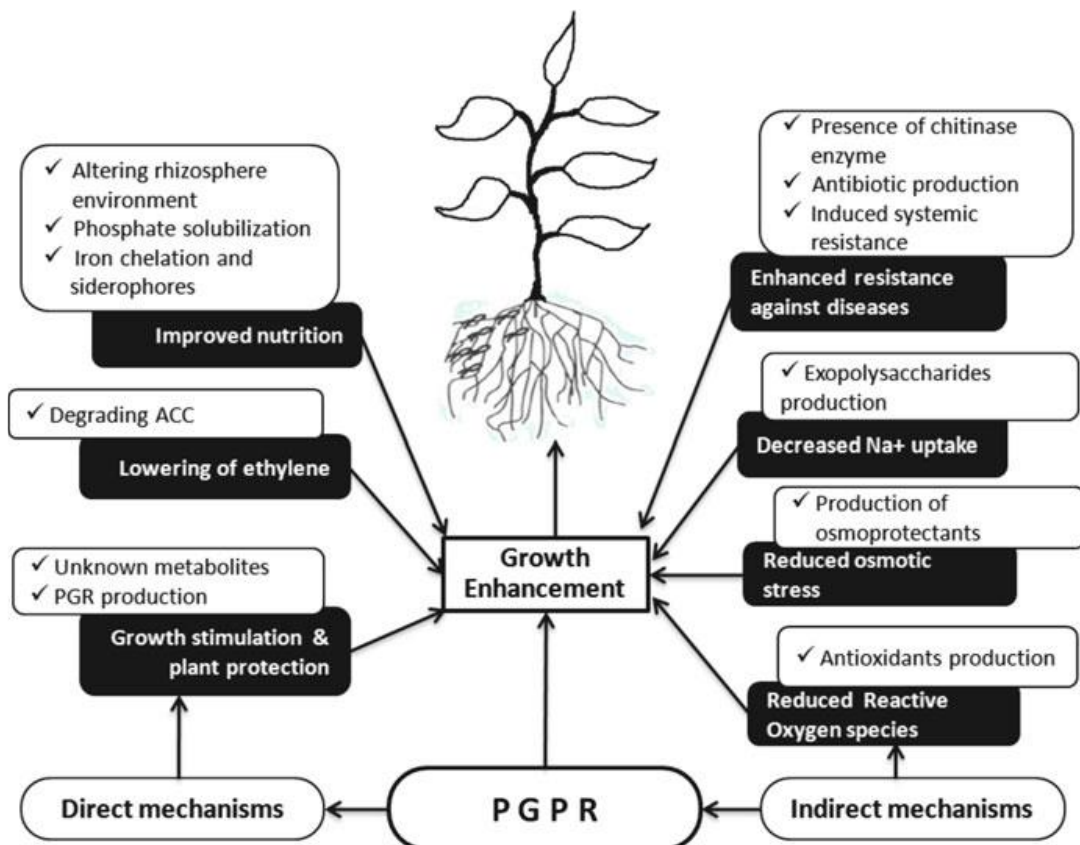


Figure 32 : Mécanismes utilisés par les PGPR pour l'amélioration de la croissance des plantes (Nadeem *et al.*, 2013).

les organismes interagissent, contribuant ainsi à la stabilité générale du système (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015 ; Sánchez-Cañizares *et al.*, 2017 ; Hassani *et al.*, 2018). Les microorganismes, ont une influence majeure sur la croissance et la survie des plantes (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015).

Plus particulièrement, la rhizosphère abrite de nombreuses populations microbiennes bénéfiques pour les plantes, comme les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), les organismes symbiotiques comme les bactéries fixatrices d'azote ou encore les champignons ecto et endomycorhiziens (Berendsen *et al.*, 2012; Chaparro *et al.*, 2012; Jacoby *et al.*, 2017 ; Gouda *et al.*, 2018). Les mécanismes mis en place sont finalement les mêmes que ceux exploités lors de l'utilisation de ces microorganismes pour la protection des cultures (et décrits précédemment) (Figure 32). Il existe de nombreux genres contenant des espèces PGPR (Berg and Smalla, 2009) dont certains sont déjà utilisés en tant qu'inoculant tels que par exemple *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus* ou encore *Phosphobacterium* (Berg and Smalla, 2009; Erturk *et al.*, 2010; Lim and Kim, 2009).

#### **2.4.2.1 Au service de la nutrition des plantes**

Certains microorganismes du sol ont la capacité de promouvoir la croissance des plantes en facilitant l'acquisition des éléments nutritifs. En effet, dans les sols, les nutriments tels que l'azote, le phosphore ou le soufre sont généralement liés à d'autres éléments et de ce fait non disponibles pour la plante. Les microorganismes possèdent la machinerie métabolique permettant de dépolymériser et minéraliser les formes organiques de l'azote, du phosphore et du soufre, mais aussi d'accéder et donc potentiellement de libérer les formes récalcitrantes, de l'azote (Figure 33) et du phosphore (Figure 34). Puis, lors du turnover de la biomasse microbienne, les nutriments sont alors libérés sous des formes assimilables par la plante, totalement dépendantes de ces mécanismes (Van der Heijden *et al.*, 2008 ; Richardson *et al.*, 2009 ; Pii *et al.*, 2015 ; Jacoby *et al.*, 2017). Ces microorganismes, peuvent aussi agir sur la nutrition des plantes à travers un accroissement du système racinaire ou *via* des modifications de son architecture (Figure 35), à travers la production de phytohormones comme l'auxine, la cytokinine, la gibbérelline (Sukumar *et al.*, 2013 ; del Carmen Orozco-Mosqueda *et al.*, 2018). D'autres microorganismes vont contribuer à diminuer les quantités d'éthylène produites par les végétaux, *via* la synthèse de l'enzyme acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) déaminase, capable de cliver le précurseur de l'éthylène, l'ACC (Glick, 2012) (Figure 32). En effet, l'éthylène peut s'avérer néfaste pour la plante, en trop grande quantité.

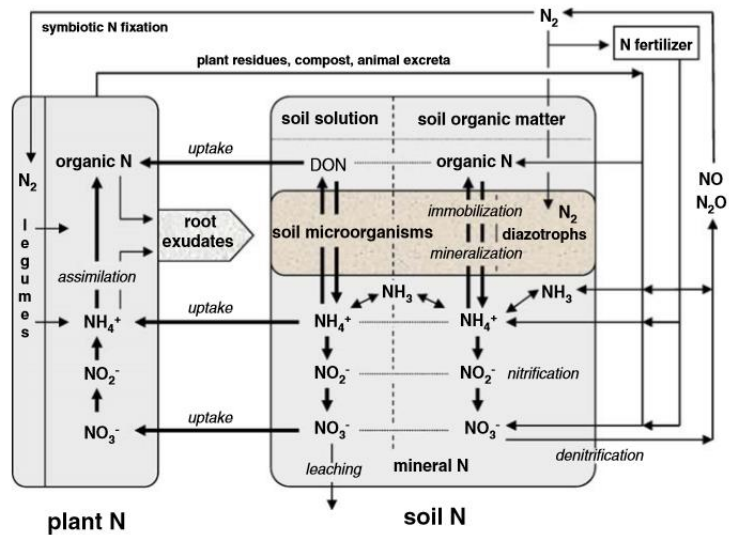


Figure 33 : Cycle de l'azote entre sol et plante ; et voies de transformation de l'azote régulées par des processus physiologiques (Richardson *et al.*, 2009)

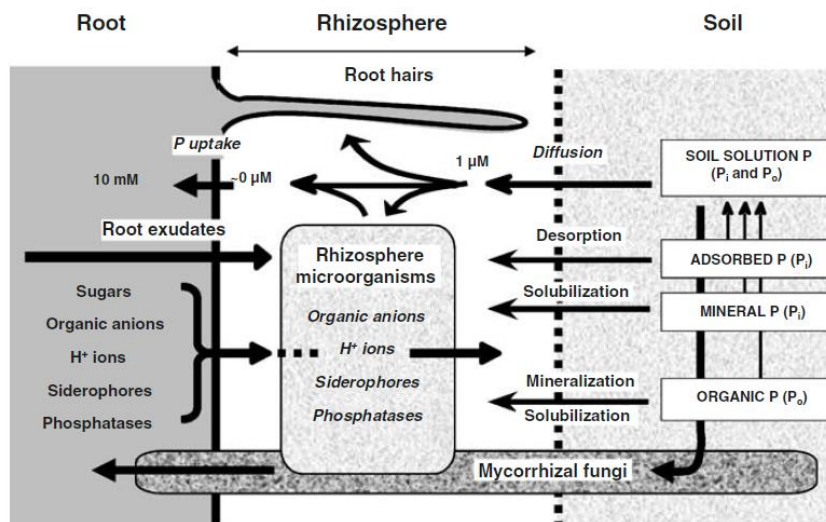


Figure 34 : Processus influençant la disponibilité et la transformation du phosphore dans la rhizosphère (Richardson *et al.*, 2009)



Figure 35 : Modification de l'architecture racinaire induite par l'inoculation avec une bactérie PGPR (*Bacillus simplex*, modalité B) (Schwartz *et al.*, 2013).

#### **2.4.2.2 Au service de la protection contre les maladies**

Le caractère suppressif des sols constitue le meilleur exemple montrant le rôle joué par le microbiome pour la protection des plantes envers les infections par des pathogènes telluriques (Gómez Expósito *et al.*, 2017). Les sols suppressifs ont en premier lieu été définis par Baker and Cook (1974) comme « des sols dans lesquels un pathogène ne peut pas s'établir ou persister ; ou s'établit mais ne cause que peu ou pas de dommages ». Deux types de suppressivité sont à distinguer : la suppressivité dite générale, qui est attribuée à l'activité globale de la communauté microbienne et la suppressivité dite spécifique, qui est plutôt en lien avec l'activité concertée d'un groupe de microorganismes (Berendsen *et al.*, 2012; Gómez Expósito *et al.*, 2017). La prise en compte du caractère suppressif envers les maladies est un élément fondamental pour une évaluation pertinente de la productivité d'un sol (Janvier *et al.*, 2007).

Le succès d'un pathogène est directement sous l'influence des communautés microbiennes du sol dans lequel a lieu l'infection. De nombreuses études s'attachent à identifier les taxons impliqués, voire même isoler des souches à potentialité biocontrôle (Gómez Expósito *et al.*, 2017). Les mécanismes mis en œuvre par les microorganismes pour le contrôle des pathogènes sont évidemment ceux exploités pour la lutte biologique (décrit précédemment dans le paragraphe 2.3.6.2), à savoir principalement la compétition (pour les ressources et l'espace), le parasitisme, l'antibiose et l'induction des défenses des plantes (Berendsen *et al.*, 2012; Junaid *et al.*, 2013). Dans le cas de la pourriture racinaire du pois causée par *Aphanomyces euteiches*, le rôle suppressif du contenu en calcium des sols sur la prévalence et la sévérité de la maladie est bien connu (Persson and Olsson, 2000 ; Heyman *et al.*, 2007). En revanche le rôle joué par le microbiome natif associé à la rhizosphère dans la suppression de l'infection par *A. euteiches* est encore peu connu. Worku *et al.*, (1996) ont pu mettre en évidence une large gamme de variation de la suppressivité de 142 sols envers *A. euteiches*. Leurs travaux ont aussi pu démontrer le rôle probable des communautés microbiennes du sol, du fait de la perte du caractère suppressif après stérilisation par traitement thermique ou autoclavage. Persson *et al.* (1999) ont réalisé la même observation sur des sols suppressifs, après traitement thermique ou  $\gamma$ -irradiation de ceux-ci.

#### **2.4.3 Cas particulier des relations symbiotiques chez les légumineuses**

La majorité des légumineuses forment des associations symbiotiques à la fois avec des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) et des bactéries fixatrices d'azote appartenant



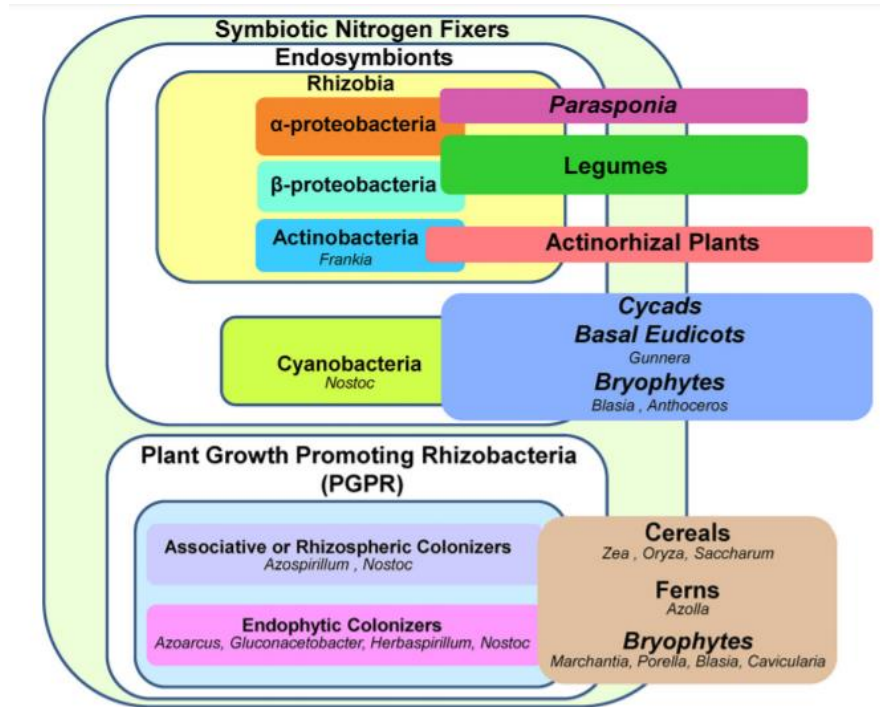


Figure 36 : Représentation schématisée des différentes associations symbiotiques pour la fixation de l'azote au sein du règne végétal (Mus *et al.*, 2016).

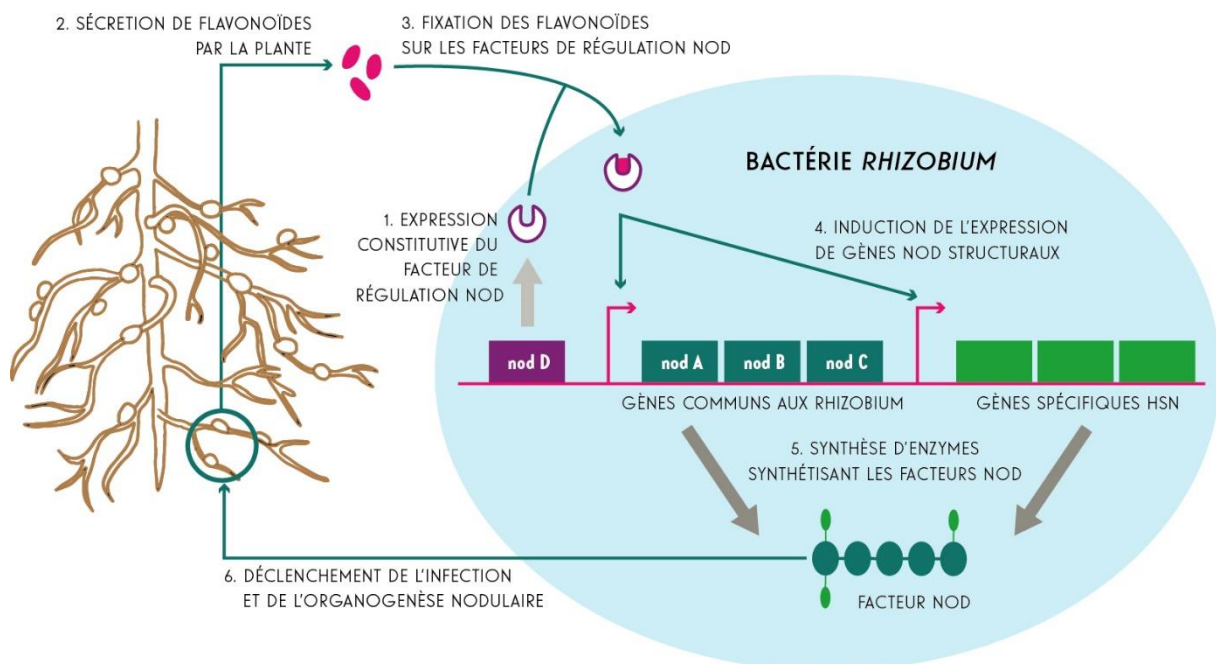


Figure 37 : Dialogue moléculaire entre la plante et les bactéries induisant la nodulation, depuis la sécrétion des flavonoïdes par la plante jusqu'à la synthèse des facteurs Nod (Sources : Museum National d'Histoires Naturelles, 2019).

au genre *Rhizobium*. Ceux-ci constituent les microorganismes les plus connus et les plus importants vivant en symbiose avec les plantes (Smith and Read, 2008 ; Downie, 2014).

#### **2.4.3.1 La nodulation par des bactéries fixatrices d'azote**

Un des facteurs majeurs expliquant le succès écologique des membres de la famille des légumineuses est leur capacité à pouvoir établir des relations bénéfiques de type symbiotique avec des bactéries rhizobiacées fixatrices d'azote. Dans la vision traditionnelle, ces rhizobiacées appartiennent le plus souvent aux genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* et *Azorhizobium* (Sawada *et al.*, 2003). Cependant, d'autres genres d'alphaprotéobactéries ont été reportés comme *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Devosia* et *Phyllobacterium* (Sawada *et al.*, 2003 ; De Meyer *et al.*, 2015). De plus, l'implication des genres *Burkholderia* et *Cupriavidus* (bétaprotéobactéries) a aussi pu être décrite (Moulin *et al.*, 2001 ; Klonowska *et al.*, 2018). Lors de cette association, la bactérie va induire le développement d'un nouvel organe chez la plante, le nodule. Au sein de ce nodule se crée une niche écologique particulière où va se réaliser la fixation de l'azote par la bactérie, rendant ainsi la plante indépendante de l'azote du sol (Bergersen, 1982). Il est estimé que 80 à 90% de l'azote disponible pour les plantes proviennent de la fixation biologique de l'azote et que cette association symbiotique permet la conversion d'environ 60 millions de tonnes par an d'azote à partir de l'azote atmosphérique (Smil, 1999). De nombreuses autres associations de type symbiotique se retrouvent au sein du règne végétal, impliquant divers groupes microbiens depuis des relations endosymbiotiques complexes jusqu'à des associations avec des PGPR (Figure 36).

Brièvement, chez le pois, ce processus est initié par la plante, dont les racines vont exsuder un mélange de molécules spécifiques, principalement des flavonoïdes (Figure 37). Ces composés sont alors reconnus par un partenaire bactérien compatible, alors attiré par chimiotactisme vers les racines des plantes (Ferguson *et al.*, 2010). La perception des molécules signal va stimuler la production par les rhizobiacées des facteurs Nod (Figure 37), déclenchant une cascade complexe de signaux conduisant à l'infection et à l'organogénèse nodulaire (Ferguson *et al.*, 2010) (Figure 38).

- **Mise en place de la nodulation**

Les rhizobiacées ayant envahi les nodules se différencient alors pour prendre leur forme endosymbiotique appelée bactéroïde. Elles sont alors capables de fixer l'azote atmosphérique par action de l'enzyme spécifique qu'elles possèdent, la nitrogénase (Figure 39), cette réaction

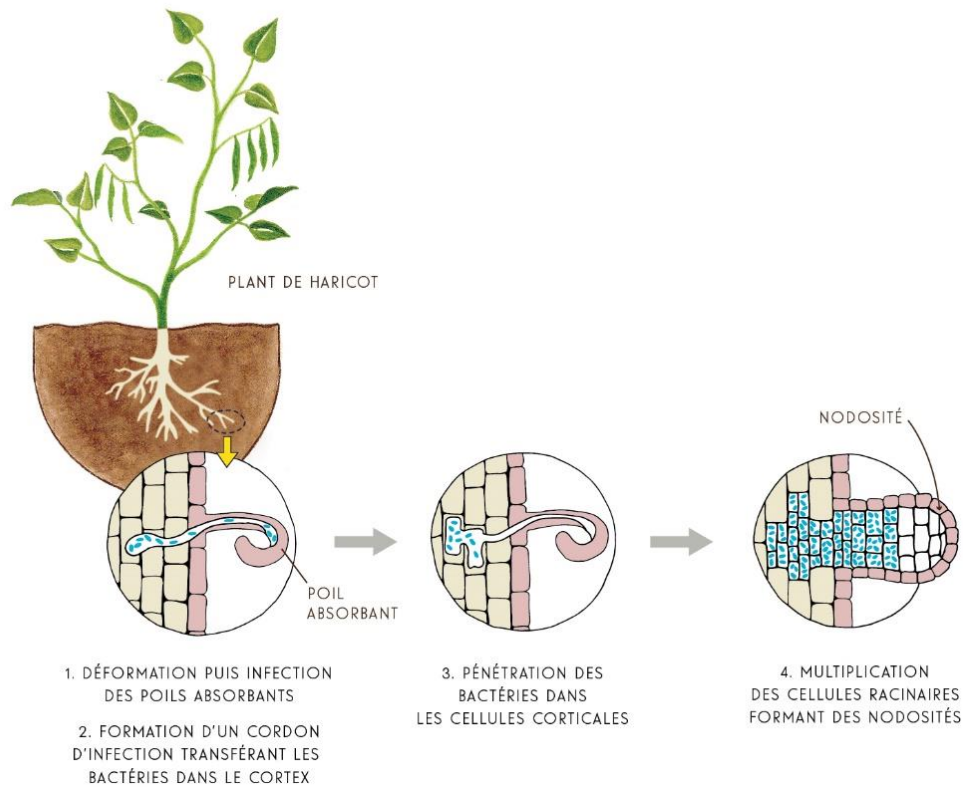


Figure 38 : Formation de la nodosité (Source : Muséum National d'Histoires Naturelles, 2019)

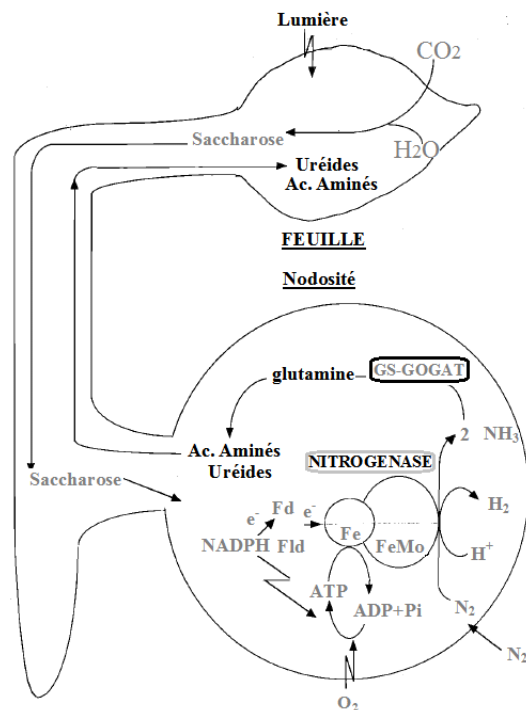


Figure 39: Schéma illustrant le métabolisme général de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique au niveau des nodules et des échanges de métabolites avec la plante (Faghire, 2012).

étant d'autant plus facilitée par la morphologie et la physiologie particulières des nodules. L'ammonium ainsi formé est transporté des bactéroïdes jusqu'au cytoplasme des cellules végétales qui constituent le nodule, où il est assimilé puis transporté vers les autres parties de la plante (Nap and Bisseling, 1990).

- **Régulation**

La formation et le maintien des nodules ayant un coût énergétique important pour la plante, celle-ci va étroitement réguler le nombre de nodules formés grâce à la mise en œuvre de voies de signalisation (Figure 40). L'autorégulation du nombre de nodules ou nodosités (AON) permet, par des mécanismes intrinsèques, de réguler ce nombre (pour description générale du mécanisme : Ferguson *et al.*, 2019; et chez le pois : Li *et al.*, 2009). La plante semble aussi posséder des mécanismes permettant d'évaluer la performance de ses symbiontes et de sanctionner les souches peu efficaces dans la fixation de l'azote (Oono *et al.*, 2011). La nodulation apparaît être sous l'influence forte des conditions environnementales (Ferguson *et al.*, 2019). Les plantes peuvent limiter le nombre et la taille des nodules, ainsi que l'activité de fixation de l'azote lorsque cet élément est disponible en quantité suffisante dans les sols (Streeter, 1985 ; Streeter and Wong, 1988 ; Kaiser *et al.*, 1997 ; Bollman and Vessey, 2006 ; Glyan'ko *et al.*, 2009 ; Voisin *et al.*, 2010). Ce mécanisme va aider à la préservation de l'énergie et des ressources de la plante lorsque la fixation de l'azote n'est pas nécessaire, et ainsi au maintien d'une balance optimale entre les éléments dans le but de répondre aux besoins de la plante en azote moyennant un coût carbone minimal (Voisin *et al.*, 2010).

- **Spécificité**

Les interactions symbiotiques qui s'établissent entre les rhizobiacées et les légumineuses présentent souvent une certaine spécificité d'association. Chaque espèce de légumineuse ne va généralement s'associer qu'à un nombre limité de souches bactériennes bien précises (Perret *et al.*, 2000). Dans la plupart des cas, le pois va préférentiellement établir une interaction symbiotique avec des souches *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* (Bourion *et al.*, 2018). Cependant, d'autres espèces de rhizobium ont récemment été reportés comme pouvant entrer en symbiose avec le pois comme *Rhizobium pisi* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008).

Cette spécificité d'association est le résultat de la reconnaissance mutuelle des signaux entre l'hôte et le symbionte (Andrews and Andrews, 2017). Il est généralement reconnu que le pois sélectionne ses symbiontes *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* à travers l'excrétion d'homosérine dans la rhizosphère (Vanderlinde *et al.*, 2014). Côté bactérien, le déterminant principal de la spécificité d'association rhizobiacée-légumineuse est la production de facteurs Nod, essentiels à la reconnaissance spécifique mutuelle permettant d'initier

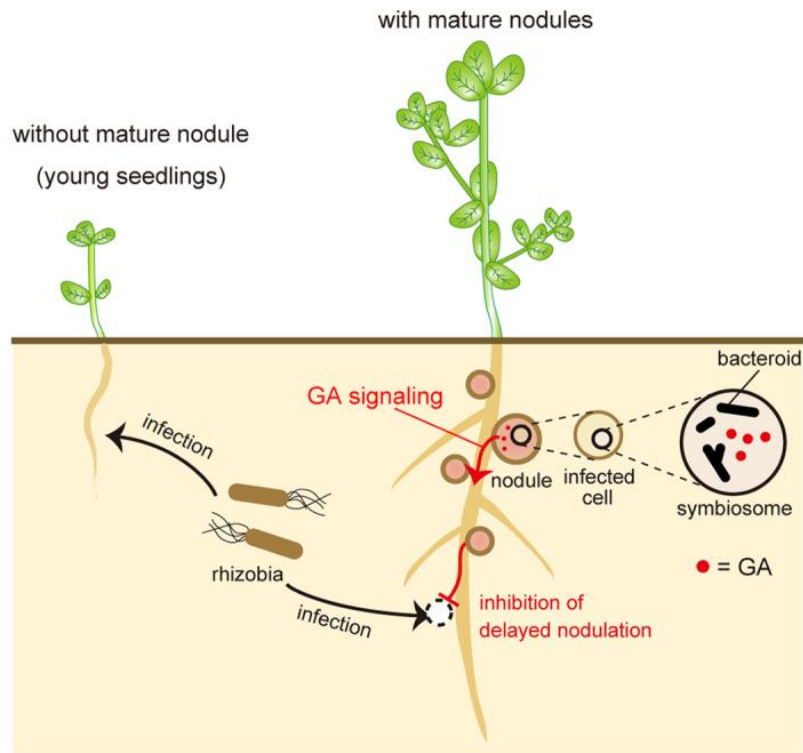


Figure 40 : Modèle de régulation du nombre de nodules impliquant la voie de la giberelline (Tatsukami and Ueda, 2016).

l'infection (Perret *et al.*, 2000 ; Downie, 2010). Ces composés sont codés par les gènes *nod* présentant une grande variation (Laguerre *et al.*, 2001). En réponse, côté végétal, la perception de ce signal est sous le contrôle de kinases transmembranaires spécifiques LysM-RLKs (Receptor-like Kinase), sous le contrôle des gènes *SYM2*, qui joue donc aussi un rôle dans cette spécificité d'interaction (D'Haese and Holsters, 2002).

- **Diversité**

Dans le sol, les racines des légumineuses sont exposées à des populations rhizobiacées hétérogènes et complexes contenant de multiples souches compatibles (Laguerre *et al.*, 2003). De nombreuses études ont en effet pu montrer que les isolats présents dans les sols présentent une large diversité génétique, supérieure à ce qui est retrouvé dans les nodules (Segovia *et al.*, 1991 ; Palmer and Young, 2000 ; Yang *et al.*, 2008 ; Wadhwa *et al.*, 2011). La structure et la diversité de ces populations est sous l'influence de différents facteurs tels que le couvert végétal (en particulier la présence d'hôte), la phénologie des plantes, le type de sol, les pratiques culturales (Palmer and Young, 2000 ; Laguerre *et al.*, 2007 ; Depret and Laguerre, 2008 ; Wielbo *et al.*, 2015). Les rhizobiacées entrant en symbiose avec une plante hôte vont alors être recrutées au sein d'un pool initial (Martínez-Romero, 2003). Chaque plante hôte peut être associée à une voire parfois plusieurs espèces de symbiontes (Unkovich *et al.*, 2010). Plusieurs études ont aussi rapporté l'existence possible d'une grande diversité génétique au sein des souches nodulant différentes variétés d'une même espèce de légumineuses, dont le pois (Russell and Jones, 1975 ; Paffetti *et al.*, 1996; Wadhwa *et al.*, 2011; Wielbo *et al.*, 2015 ; Bourion *et al.*, 2018). Les mécanismes déterminant les affinités et contrôlant cette diversité sont encore à élucider précisément.

- **Rôle dans la gestion des maladies**

De nombreuses espèces rhizobiacées présentent des propriétés biocontrôle, suscitant un intérêt fort dans le cadre de la gestion de différentes phytopathologies (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Par exemple, il a été rapporté que des souches comme *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium trifolii*, *Sinorhizobium meliloti* et *Bradyrhizobium japonicum* sont capables de sécréter des antibiotiques et des enzymes spécifiques permettant d'inhiber différents pathogènes (Bardin *et al.*, 2004 : *Pythium versus* pois et betteraves; Chandra *et al.*, 2007: *Sclerotinia sclerotiorum versus* moutarde; Özkoç and Delivelî, 2001: inhibition *in vitro* de *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani*; Siddiqui *et al.*, 1998 : *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium solani versus* pois chiche et tournesol, Siddiqui *et al.*, 2007: nématodes *versus* lentilles). Certaines souches rhizobiacées sont aussi capables d'induire une résistance



systemique chez les plantes, à travers la production de composés variés comme des lyposaccharides, la flagelline, l'homosérine lactone, etc (Yanni *et al.*, 2001 ; Peng *et al.*, 2002 ; Mishra *et al.*, 2006). De nombreuses études se sont ainsi penchées sur l'utilisation à bon escient des effets biocontrôle de ces souches et ont démontré l'efficacité pour la gestion des maladies chez de nombreuses espèces végétales légumineuses mais aussi non légumineuses par leur présence dans la rhizosphère (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Ainsi, en condition de plein champ, l'application d'une souche du genre *Rhizobium* a permis d'augmenter la croissance et le rendement chez le pois chiche, d'augmenter significativement le nombre de nodules racinaires mais aussi de limiter la sévérité des symptômes de la pourriture racinaire causée par le complexe pathogène entre le nématode *Meloidogyne incognita* et le champignon *Macrophomina phaseolina*. Chez le pois cajan (*Cajanus cajan*), face au flétrissement causé par le complexe pathogène constitué du nématode *Heterodera cajani* et du champignon *Fusarium udum*, Siddiqui et Mahmood (1995) ont montré qu'un traitement par *Bradyrhizobium japonicum* (seul ou en combinaison avec d'autres PGPR) permet d'augmenter la biomasse globale et le nombre de nodules mais aussi de réduire la multiplication des nématodes et la sévérité des symptômes causés par le champignon. Elbadry *et al.* (2006) ont quant à eux observé une meilleure résistance des plantes de féverole contre le virus BYMV (Bean Yellow Mosaic potyvirus) via une stimulation des défenses des plantes lorsque les graines de féverole sont inoculées avec une souche *Rhizobium leguminosarum*. Récemment, Godebo *et al.* (2020) ont pu établir l'activité antagoniste de souches du genre *Rhizobium* envers *Aphanomyces euteiches*, soulignant ainsi que leur utilisation en tant qu'agent de biocontrôle pourrait constituer une piste prometteuse pour lutter contre ce pathogène (Godebo *et al.*, 2020).

#### **2.4.3.2 Les microorganismes endophytes**

Les plantes constituent un ensemble d'habitats divers et variés pouvant être colonisés par de nombreux organismes endophytes (Dudeja *et al.*, 2012). Ce terme endophyte est utilisé pour décrire des microorganismes vivant au sein des tissus végétaux et, au sens strict du terme, ne causant pas de symptômes délétères (Dudeja *et al.*, 2012; Narula *et al.*, 2013). Une plante hôte peut abriter une multitude de genres et d'espèces microbiens en son sein, dans la majorité de ses tissus (Narula *et al.*, 2013). La diversité des espèces présentes ainsi que la densité de leurs populations sont très variables et vont dépendre principalement de l'espèce microbienne, du génotype de la plante hôte, de stade du développement de celle-ci, des tissus considérés et des conditions environnementales (Dudeja *et al.*, 2012; Narula *et al.*, 2013).



Tableau 4 : Exemples d'endophytes bactériens retrouvés dans différents tissus chez les légumineuses (Dudeja *et al.*, 2012).

Plant species	Plant tissue	Bacterial endophytes	References
Acacia	Root nodules	<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Ensifer</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Phyllobacterium</i> and <i>Devosia</i> and non rhizobial bacteria	[13]
Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.)	Roots, nodules, seed coat and lateral-root junctions	15 non rhizobial and 5 Gram + ve bacteria; <i>Bravibacillus chosinensis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Microbacterium trichothecenylyticum</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Azospirillum</i> sp. B510, <i>Ensifer</i> ( <i>Sinorhizobium</i> ) <i>meliloti</i>	[2, 14–18]
Bean	Root and stem nodules	<i>Azorhizobium caulinodans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Ensifer</i> ( <i>Sinorhizobium</i> ) <i>meliloti</i> , <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , <i>R. tropici</i>	[11, 12, 20]
Chickpea	Root nodules	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	[21, 22]
Clovers	Roots, nodules, stem and foliage	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> , <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	[23]
<i>Conzattia multiflora</i>	Root and nodules	<i>Pantoea</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> and <i>Klebsiella</i>	[24]
Cowpea	Nodules	<i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Rhizobium</i> sp. NGR 234	[21, 22]
Fenugreek	Nodules	<i>Ensifer</i> ( <i>Sinorhizobium</i> ) <i>meliloti</i>	[21, 22]
<i>Hedysarum glomeratum</i>	Nodules	<i>Agrobacterium</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>R. sulae</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Xanthomonas</i>	[25]
<i>Kennedia nigricans</i>	Roots	39 actinomycetes with 95% <i>Streptomyces</i>	[26]
<i>Leucaena</i>	Roots	<i>Mesorhizobium loti</i> , <i>Ensifer</i> ( <i>Sinorhizobium</i> ) <i>meliloti</i> , <i>Rhizobium</i> sp. NGR 234, <i>R. tropici</i> , <i>Ensifer</i> ( <i>Sinorhizobium</i> ) <i>meliloti</i> 1021	[27, 28]
<i>Lotus</i>	Nodules	<i>Mesorhizobium loti</i>	[28]
Mungbean	Nodules	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	[21, 22]
<i>Mimosa pudica</i>	Nodules	<i>Burkholderia</i>	[29]
<i>Medicago truncatula</i>	Roots	Microbial communities	[30]
<i>Ornithopus compressus</i>	Nodules	<i>Curtobacterium</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Pseudomonas</i>	[25]
Pea	Roots	<i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , <i>Streptomyces lydicus</i>	[3, 31]
Peanut	Root apoplast and nodules	<i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Burkholderia cepacia</i>	[32, 33]
<i>Psoralea bituminosa</i>	Nodules	<i>Arthrobacter</i>	[34]
Red clover	Root and nodules	22 rhizobial and non rhizobial bacteria, <i>Agrobacterium rhizogenes</i> , <i>Pantoea agglomerans</i>	[23, 35–37]
<i>Scorpiurus muricatus</i>	Nodules	<i>Bacillus</i> , <i>Thiobacillus</i>	[25]
<i>Sesbania</i>	Root and stem nodules	<i>Azorhizobium caulinodans</i> , <i>Ensifer</i> ( <i>Sinorhizobium</i> ) <i>saheli</i> , <i>Ensifer</i> ( <i>Sinorhizobium</i> ) <i>teranga</i> bv. <i>sesbania</i> .	[38, 39]
Siratro	Roots	<i>Rhizobium</i> sp. NGR 234	[40]
Soybean	Roots and Nodules	98 non symbiotic bacteria including <i>Pantoea</i> , <i>Serratia</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Agrobacterium</i> , and <i>Burkholderia</i> , and other bacteria <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Enterobacter sakazakii</i> , <i>Erwinia</i> sp.; <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Pantoea</i> sp., <i>Pseudomonas citronellolis</i> , <i>R. fredii</i> , <i>Rhizobium</i> sp. NGR 234, <i>Ensifer</i> ( <i>Sinorhizobium</i> ) <i>fredii</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>	[4, 5, 19, 38, 41–45]
Sweet clover	Roots	<i>Ensifer</i> ( <i>Sinorhizobium</i> ) <i>meliloti</i>	[21, 22]
<i>Tetragonolobus purpureus</i>	Roots	<i>Mesorhizobium</i> , <i>Staphylococcus</i>	[21, 22]
<i>Vicia</i> – wild species	Nodules	154 bacterial genera – <i>R. leguminosarum</i> <i>R. gallicum</i> , <i>Mesorhizobium huakuii</i> , <i>Ensifer meliloti</i> and <i>Bradyrhizobium</i> spp., and 14 strains related to <i>Agrobacterium</i> , <i>Phyllobacterium</i> , <i>Ensifer</i> , <i>Shinella</i> and <i>R. tropici</i> , 22 strains of <i>R. leguminosarum</i>	[11, 20]
Wild legumes	Roots and nodules	14 bacterial genera and 24 non rhizobial genera	[25, 46]
Mediterranean legumes	Nodules	100 unculturable rhizobia and 24 non rhizobial	[38, 45]

Chez les légumineuses, les bactéries fixatrices d'azote ne constituent finalement qu'une faible proportion de la totalité des bactéries endophytes les colonisant. Par exemple, *Pantoea agglomerans* et *Pseudomonas fluorescens* sont les espèces endophytes les plus communément retrouvées dans les tiges de différentes variétés de pois (Elvira-Recuenco and van Vuurde, 2000). Puisque le sol constitue un pool particulièrement riche d'inoculum potentiel et que les racines sont très vulnérables, la communauté endophyte, issue de la rhizosphère et colonisant le système racinaire, constitue une composante essentielle du microbiome des plantes (Dudeja *et al.*, 2012). Chez les légumineuses, une grande diversité d'autres espèces bactériennes va co-exister au sein des nodules dont des bactéries non-rhizobiacées (pour review: De Meyer *et al.*, 2015; Dudeja *et al.*, 2012; Narula *et al.*, 2013) (Tableau 4). Bien souvent, ces bactéries endophytes non-rhizobiacées (ENR), dont le rôle reste encore souvent à élucider, constituent une part importante de la microflore des nodules. Pourtant cette microflore ne constitue pas la cible privilégiée des études scientifiques, focalisées plutôt sur la nodulation, même si de plus en plus d'études s'y consacrent ces dernières années. Ainsi, par exemple, la présence de 71 genres bactériens différents ont été observés dans des nodules de la légumineuse *Lespedeza thunbergii* (Busby *et al.*, 2016). Huit genres différents (*Paenibacillus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Ensifer*, *Agrobacterium*, *Blastobacter*, *Dyadobacter*, et *Chitinophaga*) ont été isolés de nodules de haricot mungo (*Vigna radiata*) cultivé en plein champ (Pandya *et al.*, 2013). Une grande variété d'ENR (*Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, et *Phyllobacterium*) sont capables de coloniser des nodules de *Glycyrrhiza* (Li *et al.*, 2012). Bai *et al.* (2003) ont montré la cohabitation naturelle de *Bacillus subtilis* et *Bacillus thuringiensis* avec *Bradyrhizobium japonicum* dans les nodules de soja. Des actinobactéries telles que *Streptomyces lydicus* ont été reportées comme colonisant des nodules de pois (Tokala *et al.*, 2002).

Narula *et al.* (2013) ont quant à eux mis en évidence la coexistence de 17 génotypes bactériens différents dans des nodules de pois prélevés en parcelle agricole. De Meyer *et al.* (2015) ont décrits la présence d'une grande diversité d'espèces bactériennes appartenant à 50 genres au sein de nodules provenant de 30 espèces différentes de légumineuses indigènes des Flandres. Lu *et al.* (2017) ont observé une diversité et une abondance relative d'ENR plus conséquentes qu'attendues dans les nodules de la légumineuse *Dalbergia odorifera* (Figure 41). Outre les rhizobiacées issus de 5 genres bactériens, 32 autres genres bactériens ont été retrouvés, soulignant la coexistence effective d'une grande diversité d'ENR avec les rhizobiacées au sein des nodosités de cette espèce végétale, sous l'influence des pratiques de fertilisation appliquées. Hakim *et al.*, (2020) ont quant à eux mis en évidence la présence d'une grande diversité de genres ENR (*Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pantoea*,

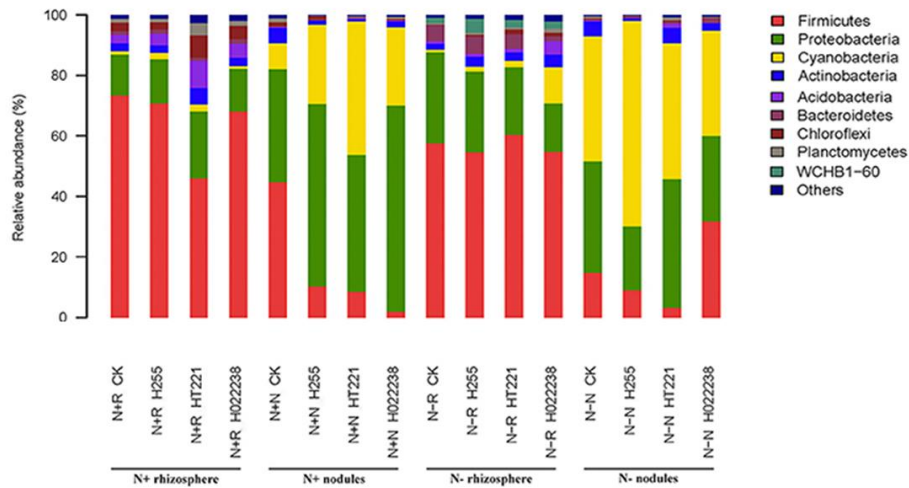


Figure 41 : Abondance relative des phyla dominants dans la rhizosphère et dans les nodules de plantules de *D. odorifera*, selon la fertilisation azotée apportée. N<sup>+</sup> R et N<sup>-</sup> R : sol rhizosphérique avec ou sans supplément d'azote ; N<sup>+</sup> N et N<sup>-</sup> N : nodules avec ou sans supplément azote ; CK, pas d'inoculation ; H255, HT221, and H022238, inoculation avec *Bradyrhizobium elkanii* H255, *Rhizobium multihospitium*-like HT221, et *Burkholderia pyrrocinia*-like H022238, respectivement (D'après Lu *et al.*, 2017)

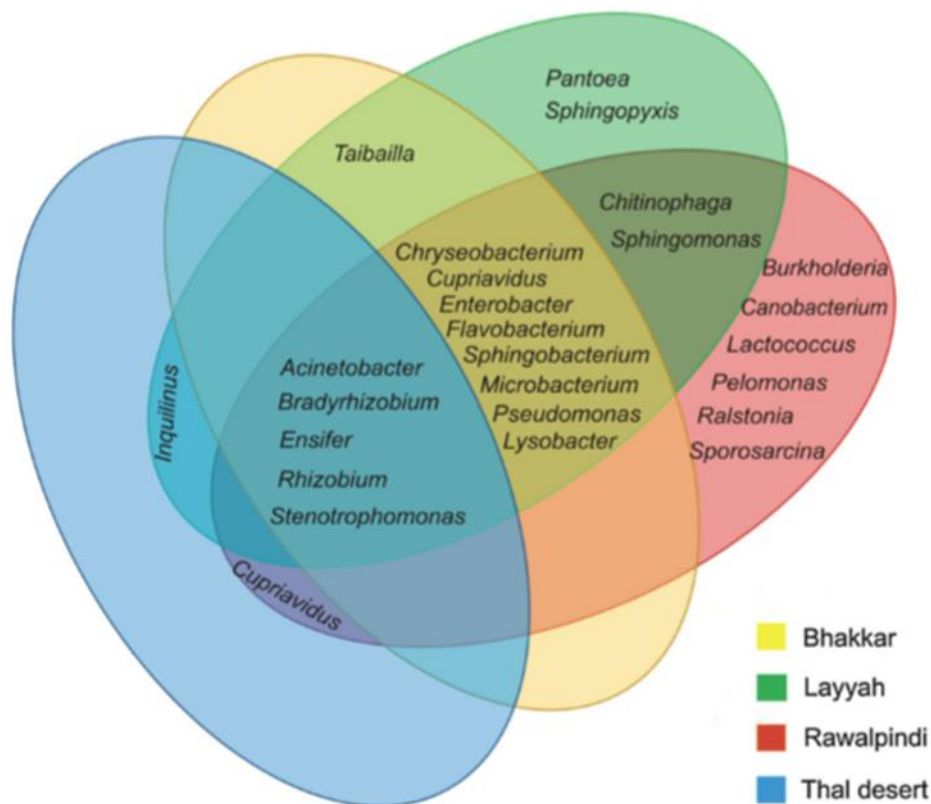


Figure 42 : Diagramme de venn indiquant les différences observées de genres bactériens présents dans les nodules entre les sites étudiés (D'après Hakim *et al.*, 2020).

*Pseudomonas*, *Ralstonia*, et *Stenotrophomona*) associée aux nodules d'haricot mungo ainsi qu'une distinction importante entre les sites de culture (Figure 42). Cette observation confirme la forte influence des propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols sur la diversité des endophytes associées aux nodules (Leite *et al.*, 2017).

De nombreux genres bactériens capables de coloniser les tissus végétaux possèdent des propriétés PGPR reconnues et vont donc jouer un rôle important en tant que support de la santé des plantes. Certaines espèces contribuent à promouvoir la croissance des plantes mais aussi à augmenter leur résistance à des stress de type biotique et abiotique. Plus particulièrement, le microbiome endophyte serait en mesure d'améliorer la résistance des plantes à différents pathogènes (El-Tarabily *et al.*, 2010; Dudeja *et al.*, 2012 ; Narula *et al.*, 2013 ; De Meyer *et al.*, 2015 ; Andrews and Andrews, 2017). Les modes d'action mis en œuvre sont les mêmes que ceux décrits précédemment (paragraphe 2.3.6.2). D'autres endophytes pourraient constituer quant à eux seulement des organismes opportunistes (Dudeja *et al.*, 2012). Des interactions entre les endophytes microbiens eux-mêmes sont possibles mais encore mal connus, de même que la nature de ces interactions, même si des effets synergiques ou combinés sont souvent soupçonnés (Dudeja *et al.*, 2012).

Pendant longtemps, l'étude de ces populations a reposé uniquement sur des techniques d'isolement classique, avec toutes les limites que cela sous-entend (influence des cinétiques de croissance des souches, sélectivité du milieu de culture et des conditions d'incubation, accès uniquement à la fraction cultivable de la communauté). L'avènement des techniques de biologie moléculaire, et en particulier les approches de métabarcoding par séquençage haut débit ouvre des perspectives nouvelles pour la mise en lumière de la diversité des ENR dans les nodules des légumineuses et la compréhension de leur rôle.

### **2.4.3.3 Les champignons mycorhiziens arbusculaires**

La majorité des légumineuses établissent des associations symbiotiques tripartites à la fois avec des bactéries fixatrices d'azote et des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) (Scheublin and Heijden, 2006). Ces champignons sont des organismes symbiotiques obligatoires formant des interactions de type mutualiste avec plus de 80 % des plantes terrestres, dont de nombreuses espèces cultivées d'intérêt (Berruti *et al.*, 2016). Les CMA appartiennent au phylum des Gloméromycètes (Figure 43) (Parniske, 2008). Ils apportent aux plantes hôtes des éléments minéraux essentiels, en particulier du phosphore, et de l'eau en échange de produits tels que des sucres issus de l'activité photosynthétique (Smith and Read, 2008). Le

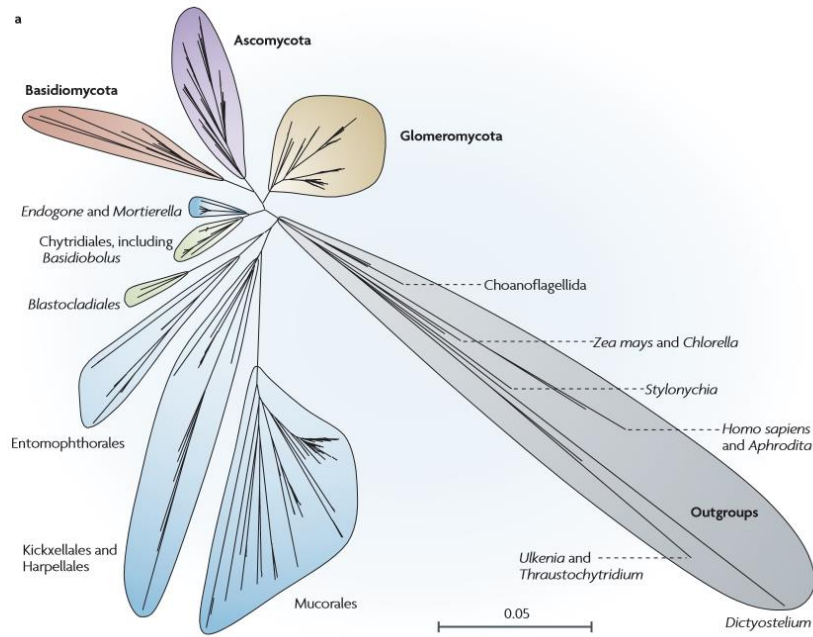


Figure 43 : Arbre phylogénétique montrant le positionnement des Glomeromycètes (Parniske, 2008).

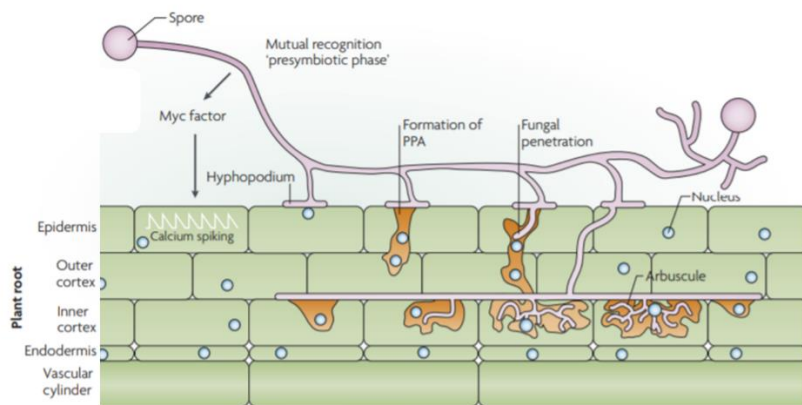


Figure 44 : Etapes de la mise en place de la symbiose mycorhizienne (Parniske, 2008).

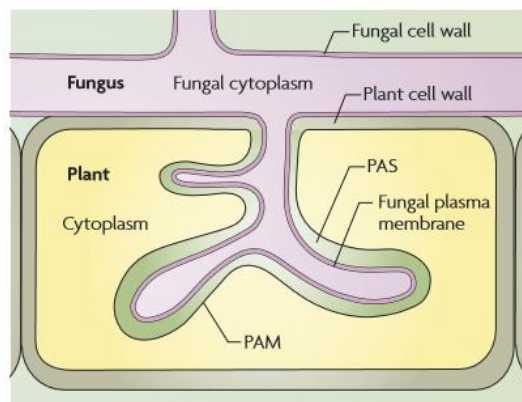


Figure 45 : Représentation schématique d'un arbuscule, PAM : membrane périarbusculaire, PAS : espace périarbusculaire (Parniske, 2008).

mycélium qui émerge du système racinaire permet d'acquérir des nutriments par l'exploration d'un volume de sol qui serait inaccessible aux racines sans cette association (Smith *et al.*, 2000). Les CMA jouent aussi un rôle important dans la tolérance des plantes à des stress de nature abiotique comme la sécheresse ou l'excès de salinité (Evelin *et al.*, 2019; Sendek *et al.*, 2019), la résistance aux maladies (Hooker *et al.*, 1994 ; Whipps, 2004 ; Xavier and Boyetchko, 2004 ; Neeraj and Singh, 2011) ou encore la tolérance à de fortes concentrations en métaux lourds dans les sols, utile en phytoremédiation (Lin *et al.*, 2007 ; Meier *et al.*, 2012).

- **Mise en place de la mycorhization**

Comme dans le cas de la nodulation, l'activation des voies spécifiques et le déclenchement des mécanismes nécessaires à la mise en place de la symbiose mycorhizienne sont sous la dépendance d'échanges complexes de signaux entre la plante et les CMA (Figure 44). Les racines des plantes exsudent des composés particuliers, les strigolactones, reconnus par les champignons mycorhiziens. Ils induisent une germination des spores puis la mise en place de la phase pré-symbiotique, caractérisée par une croissance des hyphes, une stimulation de la ramification du système racinaire des plantes et une augmentation des activités physiologiques de part et d'autre (Akiyama *et al.*, 2005 ; Besserer *et al.*, 2006; Parniske, 2008). Les champignons produisent à leur tour des molécules signales appelées facteurs Myc, dont la perception par la plante engendre une cascade de signaux et de mécanismes cellulaires (Parniske, 2008 ; Bonfante and Requena, 2011). Au contact de la plante, l'hyphe fongique va former une structure particulière d'appressorium. L'hyphe pénètre ensuite au sein de la cellule végétale, jusqu'au cortex. A ce niveau-là, l'hyphe sort de la cellule pour entrer dans l'apoplaste où il se développe le long de l'axe racinaire. Les hyphes vont alors induire la mise en place de structures ramifiées, les arbuscules (Parniske, 2008) (Figure 45). Les arbuscules constituent le site fonctionnel d'échange des nutriments (Balestrini *et al.*, 2014).

- **Spécificité**

Contrairement à la nodulation, la symbiose mycorhizienne est généralement considérée comme ne présentant pas de spécificité absolue d'association. Un même champignon mycorhizien est capable de coloniser de nombreuses espèces végétales. Réciproquement, une plante peut être associée à plusieurs espèces CMA (Sanders, 2003). Cette absence de spécificité est néanmoins remise en cause par certaines études (Bidartondo *et al.*, 2002; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002). Différentes espèces végétales sont colonisées par différentes communautés CMA (Helgason *et al.*, 2002; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003). Dans le cas des légumineuses, peu d'études se sont penchées sur la possible colonisation des nodosités par les CMA. Pourtant, ces

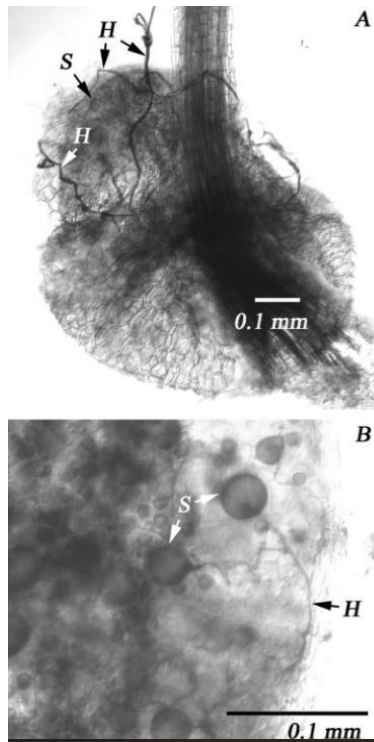


Figure 46 : Observation microscopique de la colonisation mycorhizienne des nodules. (A) nodule racinaire avec hyphe attaché (H) et spore (S) ; (B) Détails d'un nodule colonisé (Scheublin *et al.*,2004).

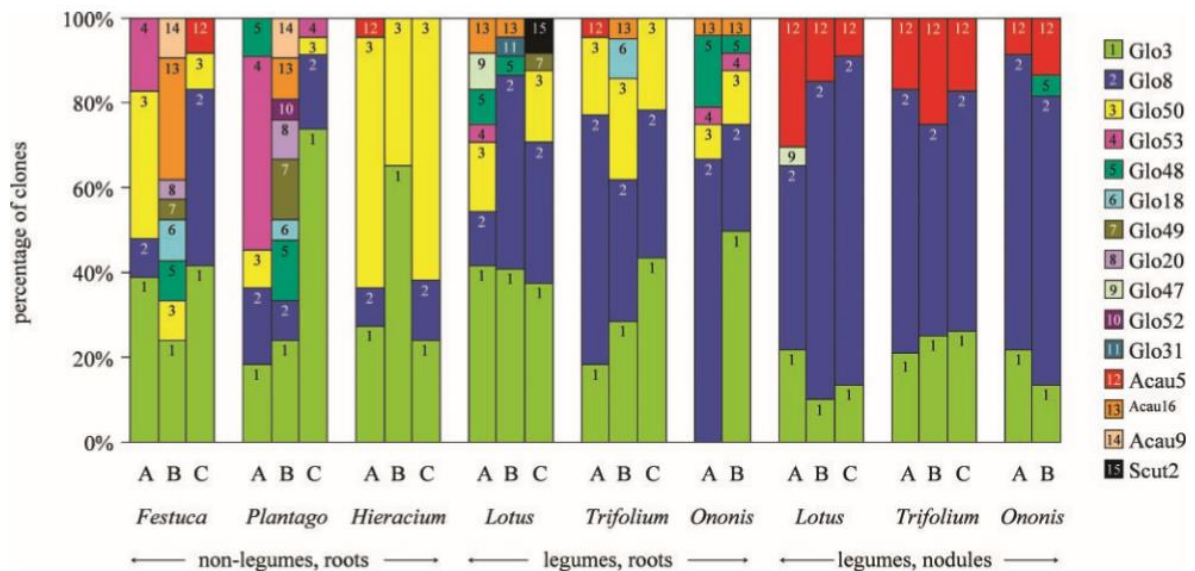


Figure 47 : Abondance relative des différentes séquences CMA type dans les racines et nodules de plusieurs espèces de plantes légumineuses et non légumineuses (Scheublin *et al.*, 2004).

structures particulières peuvent aussi effectivement abriter des structures mycorhiziennes en conditions contrôlées (Vidal-Dominguez *et al.*, 1994) mais aussi au champ (Scheublin *et al.*, 2004) (Figure 46). Scheublin *et al.* (2004) ont ainsi décrit la diversité des CMA présents au sein des nodules de trois légumineuses cultivées dans un même environnement. Les auteurs ont aussi souligné les différences observées au niveau des espèces rencontrées dans les racines chez les trois légumineuses (Figure 47).

- **Diversité**

La diversité des CMA est un facteur essentiel qui va jouer sur la biodiversité et la productivité des écosystèmes. Le genre *Glomus* est souvent retrouvé dans les sols agricoles, alors que les genres *Gigaspora*, *Scutellospora* et *Acaulospora* sont plus présents dans des sols non cultivés (Błaszowski, 1993; Talukdar and Germida, 1993). Une plus grande diversité de CMA est en général constatée dans les environnements forestiers par rapport aux parcelles agricoles (Helgason *et al.*, 1998). Les pratiques agricoles constituent une pression de sélection majeure conditionnant la diversité et l'assemblage des communautés CMA (Helgason *et al.*, 1998 ; Jansa *et al.*, 2002, 2006 ; Oehl *et al.*, 2004 ; Manoharan *et al.*, 2017) (Figure 48). Le développement des outils moléculaires au service de l'étude des communautés microbiennes a permis des avancées importantes dans la compréhension de ces organismes symbiotiques (Lee *et al.*, 2013 ; Řezáčová *et al.*, 2016 ; Bhargava *et al.*, 2019 ; Victorino *et al.*, 2020) et ont permis de mettre en évidence une diversité insoupçonnée des CMA dans les écosystèmes, avec jusqu'à environ 50 à 80 OTUs différents selon les sols (Zhao *et al.*, 2017).

- **Nutrition des plantes**

L'amélioration des prélèvements en phosphore constitue le bénéfice principal des symbioses mycorhiziennes. Le réseau mycélien plus étendu va permettre une exploration d'un volume plus important de sol. De nombreux transporteurs vont alors l'acheminer depuis les hyphes extra-racinaires jusqu'aux arbuscules (Figure 49) (Parniske, 2008). Les CMA peuvent aussi accélérer la décomposition voire même directement acquérir de l'azote à partir de la matière organique (Hodge *et al.*, 2001), relargué sous une forme ammonium au bénéfice de la plante (Figure 49) (Govindarajulu *et al.*, 2005). La plante, quant à elle, va fournir principalement du sucrose, échangé au niveau des arbuscules (Figure 49) (Parniske, 2008).

- **Effet biocontrôle**

Le bénéfice des CMA ne se limite pas à la fourniture de nutriments. La colonisation des racines par ces champignons peut augmenter la résistance des plantes envers des pathogènes (Xavier and Boyetchko, 2004 ; Vierheilig *et al.*, 2008). De nombreux produits à base de



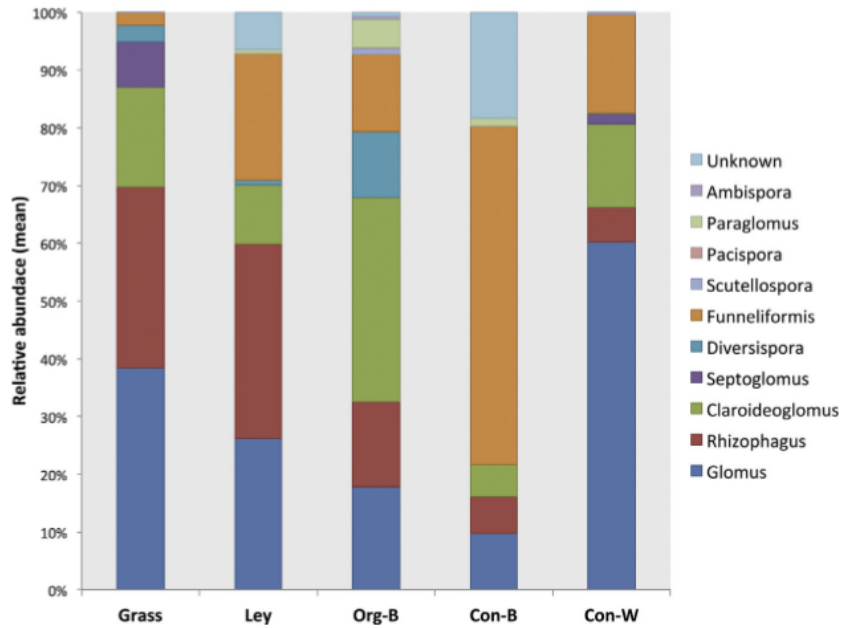


Figure 48 : Comparaison des abondances relatives de genres mycorhiziennes pour différentes pratiques de gestion et sous différentes espèces végétales ; Grass : prairie permanente, Ley : prairie temporaire avec plantes fourragères, Org-B : culture d’orge sous agriculture biologique, Con-B : culture d’orge sous agriculture conventionnelle, Con-W : blé sous agriculture conventionnelle (Manoharan *et al.*, 2017).

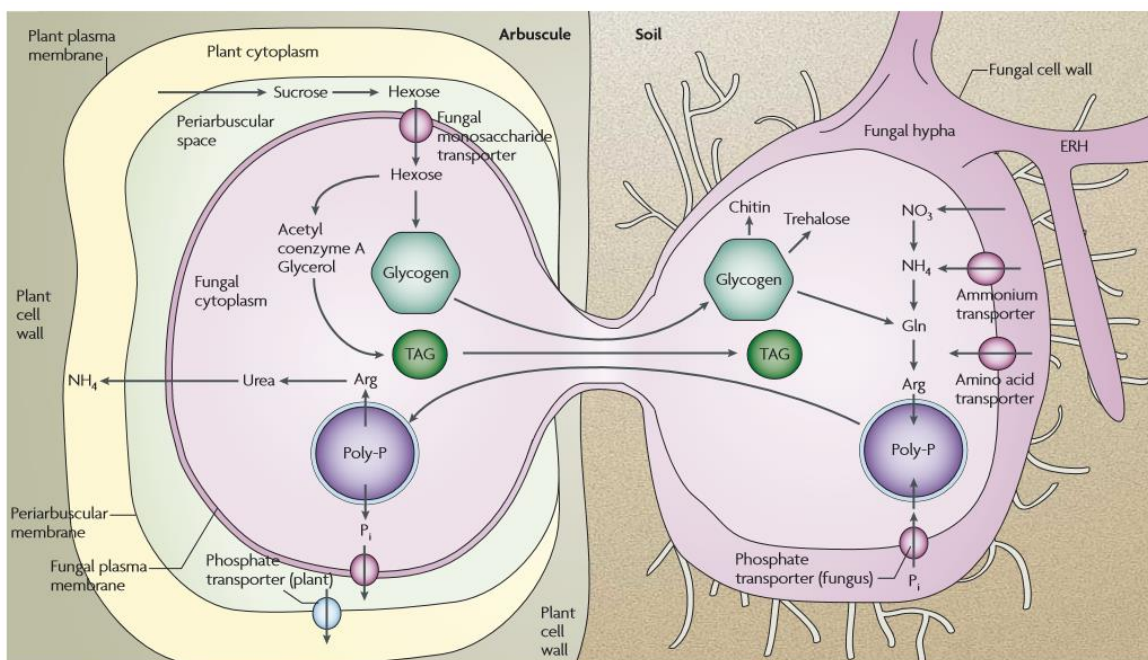


Figure 49 : Flux métaboliques entre la plante et le champignon mycorhizien (Parniske 2008).

champignons mycorhiziens sont actuellement développés en tant que solutions de lutte biologique contre les pathogènes, en général en combinaison avec d'autres microorganismes. Des études ont clairement démontré un effet de protection localisé (pour review: Singh *et al.*, 2000 ; Azcón-Aguilar *et al.*, 2002 ; Xavier and Boyetchko, 2004) mais aussi la possibilité d'une protection de type systémique (Poza *et al.*, 2002 ; Khaosaad *et al.*, 2007 ; Choudhary and Varma, 2016). Ainsi, l'existence d'une corrélation inverse a été établie entre la colonisation des racines de bégonia par un CMA et sa susceptibilité au mildiou, maladie causée par un pathogène aérien (Feldmann and Boyle, 1998). A l'inverse, Slezack *et al.* (2000) ont montré que chez le pois, une symbiose mycorhizienne importante est nécessaire pour observer une protection envers *Aphanomyces euteiches*. Bødker *et al.* (1998) ont mis en évidence une réduction des symptômes en lien avec ce même pathogène chez le pois par l'inoculation de CMA. Classiquement, 5 mécanismes d'action principaux sont avancés pour expliquer les effets biocontrôle des CMA (Vierheilig *et al.*, 2008): une compétition directe pour les sites d'infection et pour l'accès aux substrats carbonés, une amélioration du statut nutritif des plantes, une induction des systèmes de défense des plantes, une altération de l'exsudation racinaire, une modification des communautés microbiennes associées à la rhizosphère.

- **Régulation**

La plante est capable d'exercer un contrôle sur l'étendue de la colonisation de son système racinaire par les CMA en fonction de ses besoins nutritionnels. L'exemple le plus connu est le contrôle en fonction de la disponibilité en phosphore dans le sol. En effet, lorsque cet élément est disponible dans le milieu sous sa forme orthophosphate, une voie d'acquisition directe par la plante est privilégiée car moins coûteuse, conduisant à une réduction de la mycorhization des racines (Vierheilig *et al.*, 2008). Récemment, de plus en plus de données montrent qu'une fois la plante colonisée par des CMA, cette dernière va limiter voire supprimer les interactions avec d'autres mycorhizes afin de limiter le coût énergétique des symbioses (Vierheilig *et al.*, 2000 ; 2008). Vierheilig et Piché (2002) suggèrent que les plantes colonisées par des CMA, en tentant de limiter le coût de la symbiose mycorhizienne ont finalement aussi acquis une protection envers des pathogènes fongiques.

#### **2.4.4 La notion de pathobiome**

Le microbiome associé aux plantes constitue donc, par sa multiplicité d'espèces et de fonctions, un élément capital à considérer dans une vision plus holistique et pour une compréhension plus pertinente de la santé des agrosystèmes. C'est dans ce contexte que le concept de pathogénèse

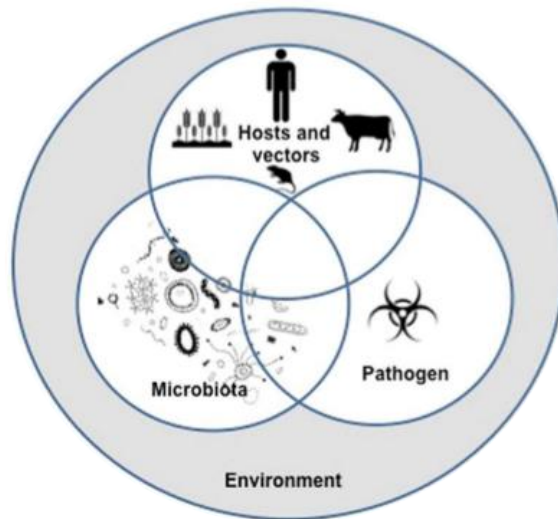


Figure 50 : Vue générale du concept de pathobiome (Vayssier-Taussat *et al.*, 2014).

a ainsi considérablement évolué ces dernières années. Le paradigme « le pathogène versus la plante hôte » basé sur le postulat fondamental de Koch et Hill est loin de la réalité. Il est souvent insuffisant pour expliquer de nombreuses maladies (Vayssier-Taussat *et al.*, 2014). Certaines maladies vont en fait résulter de la présence de plusieurs pathogènes, en combinaison avec différents facteurs externes (Bass *et al.*, 2019; McArdle *et al.*, 2018). Il est maintenant aussi bien établi que les pathogènes vivent et interagissent avec d'autres microorganismes au sein d'une vaste communauté, dans un réseau complexe d'interactions, pouvant influencer ou même être le moteur directement du développement des maladies (Vayssier-Taussat *et al.*, 2014).

Soutenu par la vision de la plante en tant qu'holobionte complexe, le nouveau concept de « pathobiome » se détache aujourd'hui clairement. Le pathobiome constitue la prise en compte globale du ou des pathogène(s), intégrés au sein d'un environnement biotique complexe, le microbiome associé à l'hôte considéré, sous l'influence des facteurs environnementaux (Figure 50) (Bass *et al.*, 2019; Vayssier-Taussat *et al.*, 2014). Ce concept permet de mieux prendre en compte la complexité des systèmes, et de rester au plus proche des situations naturelles. Une lutte efficace contre les pathologies passe en effet par l'étude et l'identification les plus précises possibles de l'ensemble des facteurs d'influence (Bass *et al.*, 2019). La prise en compte des communautés microbiennes en étroite collaboration avec les plantes, en particulier avec les racines, est donc un des éléments majeurs du déterminisme des phytopathologies et donc de leur gestion.





---

## Projet de recherche

---





### 3 Projet de recherche

Cette thèse, réalisée à UniLaSalle campus-Rouen, s'inscrit dans un projet de recherche intitulé « VIVEPOIS », financé par la Région Normandie. Ce projet s'intéresse à l'introduction d'une nouvelle culture au sein des rotations culturales de Normandie, le pois d'hiver. Un des 2 objectifs de ce projet était d'étudier l'effet de l'introduction du pois d'hiver au sein de la rotation sur les communautés microbiennes et sur les dynamiques de l'azote et du carbone ; l'autre objectif était d'évaluer le bénéfice apporté concernant la gestion de la pourriture racinaire du pois causée par *A. euteiches*. C'est dans ce dernier axe que s'inscrit ce travail de thèse. Il s'agit plus particulièrement d'évaluer l'influence des choix variétaux et du microbiome associé pour le contrôle de ce pathogène, et donc de mettre en lumière le poids des facteurs biotiques dans le déterminisme de la maladie.

- Pourquoi s'intéresser au pois protéagineux ?

Le pois protéagineux possède de nombreux bénéfices alimentaires, agronomiques, environnementaux et économiques. Cependant les surfaces dédiées à cette culture sont aujourd'hui en déclin, en particulier en Normandie. Un des freins principaux concernant cette culture est sa grande sensibilité à la pourriture racinaire causée par l'oomycète *Aphanomyces euteiches*. Cette maladie n'ayant aucun traitement efficace à l'heure actuelle, le seul moyen de lutte repose sur un diagnostic du risque par la détection de la présence du pathogène dans les parcelles agricoles. La recherche d'autres alternatives pour lutter contre cette phytopathologie revêt un caractère essentiel dans l'objectif de revaloriser la culture de pois protéagineux, à la lumière de toutes les externalités positives potentielles portées par cette espèce végétale.

- Pourquoi s'intéresser aux variétés de pois d'hiver ?

Un des bénéfices principaux de l'utilisation des variétés de pois d'hiver est le contournement apparent du risque lié à *A. euteiches*. Ce postulat empirique repose sur l'absence de symptômes aériens chez les variétés de pois d'hiver, observée sur le terrain par les agriculteurs et les conseillers agricoles. D'après les communiqués de Terre Inovia, les variétés de pois d'hiver peuvent être implantées dans des parcelles agricoles présentant une valeur seuil du test biologique du potentiel infectieux supérieure à celui des variétés de pois de printemps.





L'argumentaire principal repose sur une probable désynchronisation entre le stade de développement de la plante sensible à l'infection et le moment où les conditions environnementales sont optimales pour l'infection par *A. euteiches*.

Dans l'objectif régional et national de promouvoir l'implantation du pois d'hiver au sein des rotations, il paraissait important de mesurer la contribution du choix variétal sur l'expression de la maladie causée par cet oomycète.

- Pourquoi s'intéresser au compartiment biotique ?

La lutte biologique reposant sur l'utilisation de microorganismes antagonistes constitue une alternative possible pour la gestion des pathogènes d'origine tellurique. Le sol est un environnement complexe abritant une multitude de microorganismes dont certains présentent des potentialités importantes pour soutenir la croissance des plantes. L'environnement particulier que constitue la rhizosphère, zone sous l'influence forte des exsudats racinaires, est le siège privilégié des interactions entre les plantes et les microorganismes. La rhizosphère constitue une source importante d'isolats antagonistes d'intérêt pour le développement de solutions de biocontrôle. Outre les communautés microbiennes présentes dans la rhizosphère, il est reconnu que le système racinaire des plantes abrite une large communauté de microorganismes endophytes, pouvant jouer un rôle important dans la résistance des plantes aux maladies.

Dans le cas particulier des légumineuses, les associations symbiotiques avec des bactéries fixatrices d'azote au sein des nodules racinaires représentent une autre piste pour la compréhension globale des systèmes. De plus, de nombreuses autres populations microbiennes sont abritées au sein de cet environnement. Comprendre l'implication possible des populations microbiennes endophytes des nodules des légumineuses dans leur résistance aux maladies est une piste à considérer. Dans le cas d'*A. euteiches*, des études ont montré l'influence de certains éléments abiotiques en faveur du développement du pathogène. Mais le compartiment biotique, et surtout le microbiome associé, a longtemps été oublié dans les études concernant le pathosystème pois / *A. euteiches*.



Figure 51 : Représentation schématique de l'expérience mise en place pour l'axe 1 de recherche. Comparaison de la sensibilité de différentes variétés de pois à 3 doses pathogènes par notation des symptômes et caractérisation des systèmes aériens et racinaires (SP1 à SP3 : variétés de pois de printemps et WP1 à WP3 : variétés de pois d'hiver).

### **3.1 1<sup>er</sup> axe de recherche : L'expression de la pourriture racinaire fluctue-t-elle en fonction du type variétal du pois protéagineux ?**

L'objectif a été de mettre en évidence les patrons de tolérance/sensibilité des cultivars de pois étudiés à *A. euteiches*, et donc le poids du déterminisme génétique. L'hypothèse de départ était que le pois d'hiver présentait une sensibilité inférieure au pois de printemps. Une analyse comparative des sensibilités ainsi que des symptômes engendrés sur les architectures racinaires et aériennes a été réalisée sur 6 cultivars de pois protéagineux, 3 cultivars de printemps et 3 cultivars d'hiver. En conditions de culture contrôlées identiques printanières et à un stade précoce de développement de la plante, l'expression de la maladie (selon l'indice décrit par Wicker *et al.*, 2001) et les modifications architecturales induites (quatre traits mesurés) ont été évaluées à deux doses pathogènes (faible et moyenne) comparativement à une dose nulle sans pathogène, représentant les plantes témoins (Figure 51). Le choix variétal, en particulier les cultivars présentant des sensibilités moindres, pourraient constituer un premier levier pour lutter contre *A. euteiches*.

### **3.2 2<sup>ème</sup> axe de recherche exploratoire : La diversité bactérienne intra-nodules du pois protéagineux est-t-elle cultivar-dépendant et contient-elle des bactéries antagonistes d'intérêt envers *A. euteiches* ?**

L'objectif de cet axe de recherche a été d'étudier et de comparer la diversité des bactéries endophytes intra-nodulaires de plusieurs variétés de pois de printemps et de pois d'hiver. Il s'agissait plus particulièrement de faire un focus sur la potentielle existence au sein des nodules d'une diversité bactérienne et de genres bactériens protecteurs contre *A. euteiches*, et donc de montrer le pouvoir de recrutement des variétés, ainsi que l'importance du génotype du pois dans cette sélection. L'hypothèse de départ était que la diversité et l'abondance relative des populations bactériennes, en particulier les genres bactériens connus comme ayant un effet antagoniste envers *A. euteiches*, varient en fonction du génotype variétal. Pour valider cette hypothèse, une approche par isolement des bactéries cultivables contenus dans les nodules de 6 cultivars (utilisés dans la première expérience), suivie d'une évaluation de leur pouvoir antagoniste ont été mis en œuvre avec en parallèle la réalisation d'une analyse métabarcoding de l'ADN total extrait des nodules. Ce travail avait pour but de mettre en lumière les potentialités des populations endophytes pour la santé des plantes et l'implication de ce compartiment microbien spécifique dans la résistance des plantes aux maladies.

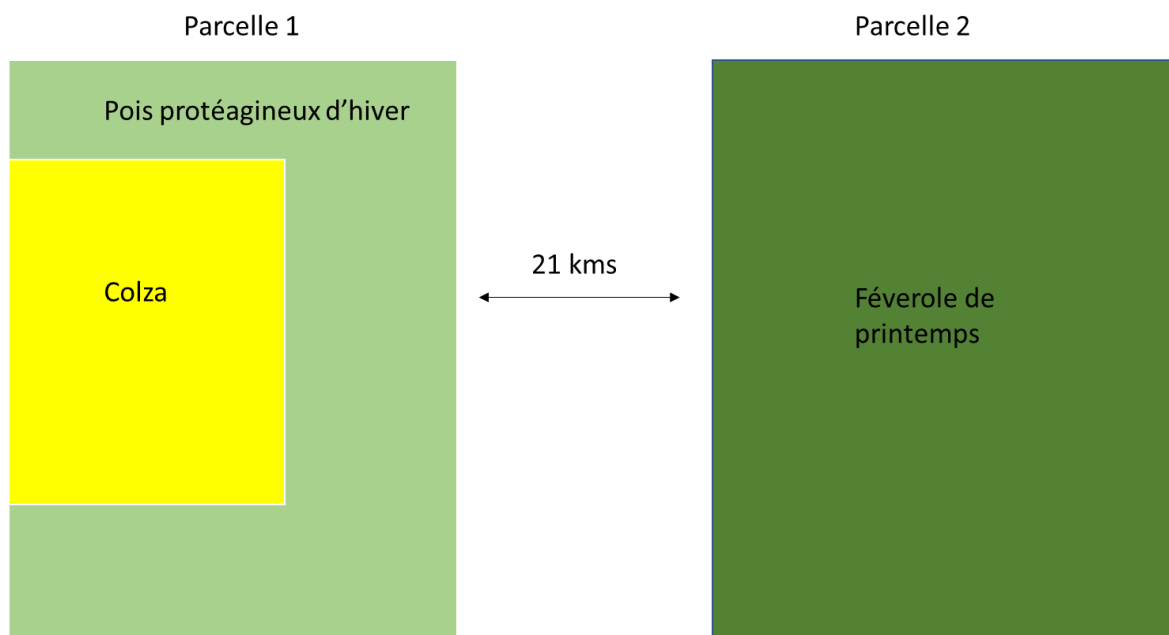


Figure 52 : Représentation schématiques des 2 parcelles cibles de l'étude.

### **3.3 3<sup>ème</sup> axe de recherche : Est-il possible d'isoler des antagonistes bactériens d'intérêt envers *A. euteiches* au sein de la rhizosphère de différents couverts végétaux ? Quelle influence va exercer ces couverts végétaux sur la diversité et la structure globale des communautés microbiennes ainsi que sur l'assemblage des populations bénéfiques au sein de la rhizosphère ?**

L'objectif de ce travail a été de valoriser le potentiel microbiologique des sols au bénéfice de la santé du pois. L'hypothèse de départ était que le couvert végétal influence la diversité et l'abondance relative des communautés bactériennes et fongiques du sol en particulier les genres biocontrôles contre *A. euteiches*. Une approche classique par isolement des bactéries des rhizosphères de trois couverts végétaux (Pois, Colza et Féverole), suivi d'un screening afin de détecter les isolats bactériens antagonistes envers *A. euteiches*, a été déployée. Ces 3 rhizosphères proviennent de 2 parcelles agricoles. Une première parcelle comportait une culture de colza incluse au sein d'une culture de pois d'hiver (mise en place spécifique dans le cadre de ce projet, grâce à la coopération d'un agriculteur) et la seconde avec un couvert féverole (Figure 52). En parallèle, afin d'évaluer l'influence des couverts végétaux sur le recrutement de populations microbiennes d'intérêt pour la santé des plantes, une comparaison de la structure et de la diversité globale des communautés bactériennes et fongiques associées à la rhizosphère des 3 couverts a été réalisée par la technique du métabarcoding. Un focus a été fait sur les genres microbiens connus comme ayant un effet antagoniste envers *A. euteiches*. Le couvert végétal, par la sélection de microorganismes en lien avec leurs exigences spécifiques, pourrait ainsi constituer un levier pour façonner le microbiome et construire ainsi un phénomène de suppressivité envers la maladie ciblée.

Plus précisément, ce travail de doctorat a pour but d'explorer différentes pistes prometteuses, potentiellement complémentaires, de lutte contre la pourriture racinaire du pois :

- Évaluer le potentiel des variétés de pois d'hiver.
- Isoler des souches bactériennes antagonistes issus de sols Normands et au sein des nodules de différentes variétés de pois.
- Étudier le rôle important des espèces végétales dans la modulation des communautés microbiennes au bénéfice de la santé des plantes.

Notre objectif est d'avancer dans la compréhension globale du pathosystème pois / *A. euteiches* en élucidant le rôle important joué par la composante biotique. La plante est alors considérée comme un holobionte complexe, avec son génome propre et son « second génome » constitué de son microbiome associé.





---

## Chapitre 1

---







## 4 Résultats

### 4.1 Le choix variétal : un premier outil de gestion de la pourriture racinaire du pois causée par *Aphanomyces euteiches*

La culture de pois possède de nombreux bénéfices économiques, agronomiques et environnementales et permettrait d'élever la production en protéines végétales de la France. Un des problèmes majeurs est que son rendement peut être très affecté par *Aphanomyces euteiches*, provoquant une pourriture racinaire, sans traitement possible. Les variétés de pois d'hiver, sélectionnées pour leur résistance au froid, paraissent sujets à des attaques moins sévères de ce pathogène. La raison principale évoquée est que les plantes sont suffisamment développées au printemps lorsque les conditions sont favorables aux infections par *A. euteiches*, ce qui les rend moins sensible aux attaques. Dans le but de promouvoir la culture de ces variétés de pois d'hiver au sein des rotations normandes, il nous a paru important de mieux comprendre les patrons de tolérance/sensibilité des variétés de pois d'hiver par leur comparaison avec celles de pois de printemps dans des conditions similaires et printanières de l'expression de la maladie.

Une analyse comparée de la sévérité des symptômes et des modifications phénotypiques induites par le pathogène chez 6 variétés de pois protéagineux, 3 d'hiver et 3 de printemps, a été réalisée. Un système de croissance inerte a été développé afin de mettre en contact la plante avec différentes doses pathogènes. Différents traits architecturaux racinaire et aérien représentatifs de la croissance des plantes ont été mesurés. La sévérité des symptômes est quant à elle évaluée par la notation des atteintes racinaires selon l'indice développé par Wicker *et al.*, (2001) (DI, Disease Index).

Cette étude a permis de mettre en évidence qu'en milieu contrôlé et en conditions printanières, les variétés d'hiver présentent une atteinte racinaire plus importante que les variétés de printemps, à dose faible, avec une absence de modifications induites au niveau de l'architecture aérienne. Cette étude a montré que les modifications architecturales induites par *A. euteiches* varient en fonction de la variété de pois mais aussi en fonction de la dose pathogène, et qu'elles sont corrélées au disease index. L'échappement des variétés d'hiver à la pourriture racinaire est probablement multifactoriel incluant des facteurs génétiques en lien avec l'architecture et les modifications induites comme montré dans l'étude de Desgroux *et al.*, (2018).

L'étude est présentée sous forme d'article.



**Compared analysis of architectural symptoms and disease severity caused by *Aphanomyces euteiches* between winter and spring peas.**

Pauline Lusley, Mélanie Bressan, Isabelle Trinsoutrot-Gattin, Karine Laval, Adrien Gauthier\*  
UniLaSalle - Rouen, AGHYLE research unit UP 2018.C101, 3 rue du Tronquet, CS 40118 – 76134  
Mont-Saint-Aignan

\*corresponding author: adrien.gauthier@unilasalle.fr

**Abstract**

Dry pea (*Pisum sativum*) is an important Fabaceae, particularly in the north of France. In addition to nutritional numerous benefits for human and animals, pea represents a valuable crop in rotation through its ability to fix atmospheric dinitrogen and so, decreasing chemical nitrogen inputs for the subsequent crop. However, pea culture is limited by its susceptibility to a soilborne oomycete, *Aphanomyces euteiches*, a causal agent of pea root rot. No chemical or biological treatment against this pathogen is available up until now. Field observations suggest that winter pea cultivars seem to be more tolerant to *A. euteiches* than spring pea cultivars which might be explained by temporal separation between plant most sensitive stage and *A. euteiches* favorable conditions of development. The aim of this study was to compare three winter and three spring cultivars behaviors towards *A. euteiches*, comparing their phenotypes responses, in control conditions mimicking spring environment. Different plant traits and disease severity were assessed from early seedlings (three spring cultivars and three winter cultivars) after inoculation with increasing doses of *A. euteiches* oospores in sterile inert substrate.

Severity of root symptoms measured by the disease index showed a higher susceptibility of winter cultivars at the lowest pathogen dose, and similar for the highest tested dose, compared to spring cultivars. Modifications induced by the pathogen on plant architecture highlighted a delay on observed impact on aerial part for winter cultivars at the lowest pathogen pressure, as empirically observed in field, despite quite similar root symptoms. Two patterns of tendencies of induced modifications could be notice: LG AURIS, Avenger and Indiana cultivar, two spring and a winter cultivars showed a global and growing reduction of all architectural traits with the growing *A. euteiches* dose whereas Myster, Dexter and Aurelia cultivars, two winter and a spring cultivars, showed a global enhancement of maintenance of architectural traits. These results also suggest importance of architectural traits in pea root rot tolerance. Comprehension of pea cultivar response towards *A. euteiches* root rot, through their physiological and genetic specificities, could give some leads for further exploration in breeding for disease resistance.



**Keywords.** *Aphanomyces euteiches*, *Pisum sativum*, disease severity, architectural trait, winter cultivar

## 1. Introduction

Fabaceae is a plant family of importance with numerous species cultivated worldwide. Fabaceae provides many essential ecosystem services in agriculture, such as (1) reductions of nitrogen mineral inputs because of their proven ability to fix atmospheric N<sub>2</sub> through symbiosis with nitrogen-fixing bacteria (Hardarson and Atkins, 2003) and so (2) reduction of the amount of greenhouse produced gas (Hatch *et al.*, 2004). The main attraction to cultivate Fabaceae stay their outstanding nutritional benefit, namely because of high protein content (Schneider and Huyghe, 2015; Foyer *et al.*, 2016). Among Fabaceae, pea (*Pisum sativum*) represents the most largely cultivated Fabaceae, particularly in France, as an important and valuable source of amino acid and apparent metabolizable energy content for human food and animal feed (Koivunen *et al.*, 2016). Unfortunately, this crop is very susceptible to pathogen infection and especially root rot caused by *Aphanomyces euteiches*, a purely soilborne oomycete which can induce drastic reduction in yield (Gaulin *et al.*, 2007). The pathogen can survive in soil for many years (Pfender and Hagedorn, 1983). Since its discovery in 1925, *A. euteiches* occurrence had been observed and studied in several countries (Gaulin *et al.*, 2007; Chatterton *et al.*, 2015; Gossen *et al.*, 2016). Currently, there is no pesticide to fight efficiently against *A. euteiches*. Indeed, fungicidal treatments have shown no effect or only partial effect, due to oomycete genetic structure being more contiguous to algae than fungi (Wu *et al.*, 2019). Only crop management appears to be a valuable tool to control disease development such as incorporation of green manure (Williams-Woodward *et al.*, 1997) or crop rotation (Moussart *et al.*, 2013). Prophylactic measures could also be deployed to avoid development of pea root rot in field evaluating sanitary state of soil. A biological assay is thus available to evaluate infectious potential and so potential risk of infection. This assay relies on global symptoms evaluation on pea after 14 to 21 days of development on the tested soil (Wicker *et al.*, 2001). This predictive decision-making tool is used by farmer before seedling. Alternative rapid molecular assays based on real-time PCR to detect and quantify *A. euteiches* in soil had been recently developed (Sauvage *et al.*, 2007; Gangneux *et al.*, 2014). These molecular tools rely on a relationship between inoculum density in soil and disease. Notwithstanding, this link could be subject to the influence of environmental factors (Persson and Olsson, 2000). Abiotic factors are well described for their significant role in disease development and severity. Calcium and pH have



been shown to be negatively correlated to root rot symptoms caused by *A. euteiches* (Persson and Olsson, 2000; Heyman *et al.*, 2007). On the contrary soil structure, humidity and aeration have been shown to be positively correlated with root rot severity (Allmaras *et al.*, 2003).

Plant breeding represents one of the well-explored approach to counteract pathogen. To date, no pea cultivars with total genetic resistance towards *A. euteiches* is available, contrary to other Fabaceae such as faba bean or alfalfa cultivars which could present partial resistance (Djéballi *et al.*, 2009). Breeding programs for polygenic resistance are still carried out and allowed to identify only some QTLs for resistance to *A. euteiches* in pea (Hamon *et al.*, 2011; Lavaud *et al.*, 2015; 2016; Desgroux *et al.*, 2016). Recently, Desgroux *et al.* (2018) highlighted a genetic marker, QTL *Ae-Ps7.6*, associated with both *A. euteiches* resistance and constitutive root system architecture. The allele associated with higher resistance root rot was also linked with a larger root system before infection. Plant traits having a role in pathogen management represent promising modifications that breeders consider. For example, breeding program can move towards modification of susceptible organs to infection or through the ability to recover efficiently nutrients from soils or by selecting mechanisms as spatial segregation to limit or escape from pathogen's encounter (Djéballi *et al.*, 2009; Ney *et al.*, 2013; Desgroux *et al.*, 2018). Specific crop management practices are studied in that way to be deployed, such as the adjustment of sowing date to disconnect with period of high pathogen pressure, or conducive conditions for disease occurrence and development (Kharbanda and Tewari, 1996; Mansfield *et al.*, 1997; McDonald and Peck, 2009; Karkanis *et al.*, 2016; Kone *et al.*, 2017). This hypothesis is largely mentioned as the main interest of winter pea cultivars to avoid deleterious impact of *A. euteiches* root rot in fields. As observed by farmers or crop advisors in fields, winter pea cultivars appeared to be less susceptible than spring pea cultivars, with more limited impact on yield. Sowed in early to late autumn, these cultivars present equivalent agronomic benefits than the spring ones, mainly through atmospheric N-fixation, so as low-energy consumer, and low-greenhouse-gas-emissions crop. Moreover, these cultivars can produce higher biomass and higher seed yield (Bourion *et al.*, 2003; McGee *et al.*, 2017). Implementation of winter cultivars could also allow to interrupt weed, insect or pathogen cycles or limits global incidence because of desynchronization between their favorable development periods and plant vulnerability (McGee *et al.*, 2017). These cultivars have been specifically selected for their winter hardiness, mainly because of resistance to frost. Winter hardiness can be linked to a time-delay of the most frost-sensitive stage in plant cycle (Lejeune-Hénaut *et al.*, 1999) or to cold acclimation (Bourion *et al.*, 2003; Kuwabara and Imai, 2009). Cold acclimation is a complex mechanism of plant adaptation, involving various genetic, physiological and





metabolic changes, providing ability to overcome winter conditions, triggered by temperature drop, short photoperiods, and change in the spectral quality of light occurring in autumn (McGee *et al.*, 2017). During this adaptation to cold, overwintering crops could also acquire disease resistance against certain pathogens, as already described for example for wheat (Nakajima and Abe, 1996), barley and meadow fescue (Plazek and Zur, 2003), triticale (Szechyńska-Hebda *et al.*, 2015) or grapevine (Wu *et al.*, 2014). Signal transduction pathways and molecular basis of disease resistance acquisition through cold acclimation are still poorly understood. Some studies suggested an implication of defense-related proteins, secreted during cold acclimation, such as PR proteins or antifreeze proteins with known antifungal activity (Kuwabara and Imai, 2009).

The observed higher tolerance of winter pea cultivars to root rot in fields could be the resultant of these combined phenomena. However, the assessment of the determinism of the purely varietal effect, with their genetic background, in *A. euteiches* possible tolerance could allow to complete this hypothesis. So, the main objectives of this study are to evaluate and compare disease severity and phenotypic modifications induced by *A. euteiches* on different winter pea cultivars, compared to spring pea cultivars. This study aims also to determine the tolerance-sensitivity pattern, linked strictly to genetic with no differential environmental parameters, of each studied cultivar grown in the same conditions.

## **2. Material & Methods**

### **2.1. *Aphanomyces euteiches* strain maintenance and inoculum production**

*Aphanomyces euteiches* (*A. euteiches*) isolate Ae84 was provided by Terres Inovia (Rennes, France). This strain was originally isolated from infected pea and is used as the French reference to evaluate the pathogenicity threshold of other *A. euteiches* isolates (Wicker E., 2001) Ae84 strain was maintained on potato dextrose agar (PDA) plates in darkness at 8°C for long-term storage and regularly re-inoculated in plants to maintain virulence.

Oospores were produced as described by Gangneux *et al.*, (2014) in oat meal broth (OMB, adjusted at pH 6.9), prepared from a heated solution of blended oat flakes (20 g.L<sup>-1</sup>), inoculated with a 7-day old PDA plug of mycelium. Following 3 to 4 weeks of incubation at 24 °C in darkness, mycelia were transferred in a chilled microblender containing 4 mL of sterile water and blended for 2 min. Cell suspension was then concentrated by centrifugation at 1,500 × g for 30 s, discarding 3 mL of supernatant. Oospores suspension was then counted on a Malassez hemocytometer for further processes. Oospore suspension could be kept at 4°C for 2 to 3 days without damage.



## **2.2. Plant material and germination**

Three pea winter (Myster, Dexter, Indiana) and three spring (Aurelia, LG AURIS, Avenger) cultivars were provided by RAGT and Limagrain respectively. Seeds were first surface sterilized under sterile conditions by immersion in absolute ethanol during 10 min, rinsed in sterile water, then immersed in 12 % sodium hypochlorite solution for 10 min, and finally rinsed 3 times in sterile water before sowing. To ensure any bacterial contamination, sterile seedlings were first germinated and grown for 4 days on basal agar medium in sterile boxes.

## **2.3. Pathogen inoculation, disease, and architectural traits assessment**

After 4 days of incubation at 24°C (day/night) with a photoperiod of 16 h light and 8 h dark, seedlings were transferred to individual pot containing sterile vermiculite (40 g, sieved to avoid particles inferior to 2 mm of diameter, Sigma Aldrich, USA, Saint-Louis). Plantlets were inoculated with *A. euteiches* by adding a freshly prepared oospores suspension at 0, 15, 30 oospores.g<sup>-1</sup> of dried vermiculite to the substrate, then supplemented with MS medium at 80% of water retention capacity. After 10 days post inoculation (dpi), disease severity (DS) was evaluated according to Wicker *et al.*, (2001), based on a disease index to quantify symptoms through the observation of brown-yellow lesions proportion on root. Pea root rot frequencies were also notified for each cultivar as the percentage of infected plants. In parallel, aerial (main shoot length, MSL; leaf node number, LNN) and root (primary root length, PRL; lateral root number, LRN) parameters were evaluated through pictures using imageJ software for induced architectural modifications. This experiment was realized 3 times independently, with 2 replicates by modality.

## **2.4. Statistical analysis**

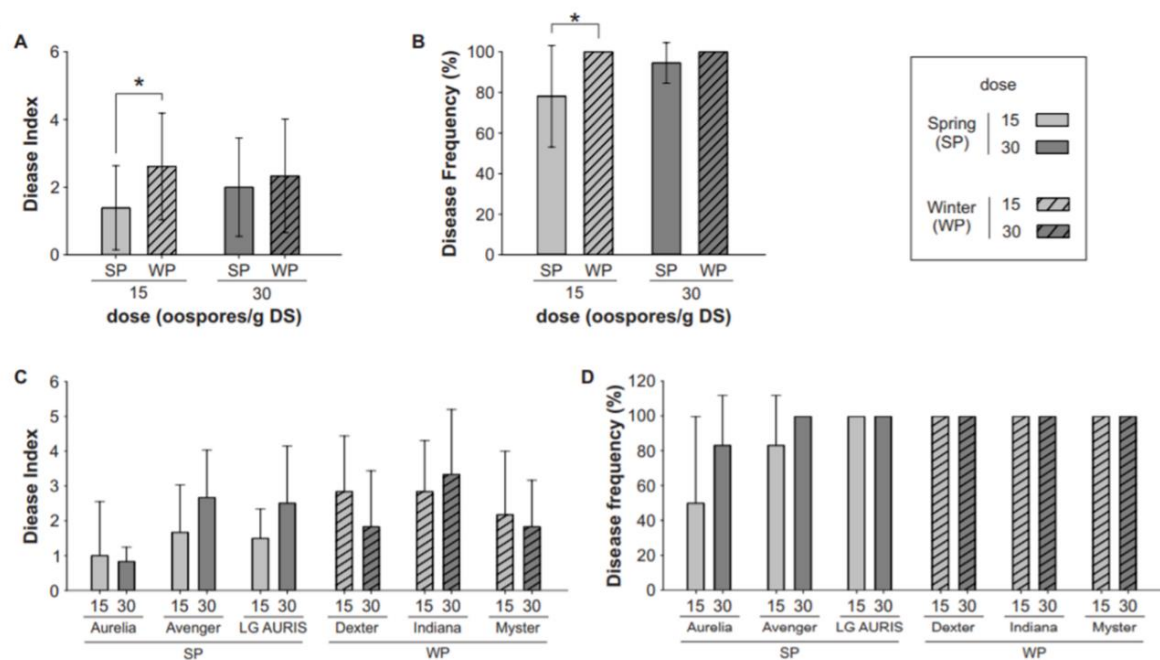
Distribution of each quantitative variable was tested for normality using Shapiro-Wilk test and for variance homoscedasticity using the Levene test. Student or Wilcoxon test was used for mean comparisons between spring and winter cultivars of gaussian and non-gaussian variables, respectively. Comparison of all measured phenotypic variables between all cultivars were performed using a nonparametric Kruskal-Wallis test, with post-hoc test to identify significant differences. Spearman's rho correlation was used to describe association between disease severity and architectural features. All tests were performed with R software 3.4.1 (R Development Core Team, 2004) and statistical significance was set at  $P < 0.05$ .



### 3. Results

#### 3.1. Evaluation of disease severity

Disease severity was evaluated as described by Wicker *et al.* (2003) for each cultivar at each inoculation dose, when cultivated in spring conditions growth. When considering all cultivars pooled according to their cultivar type, winter pea cultivars appeared to be significantly more susceptible than spring pea cultivars at the lowest pathogen dose tested (15 oospores.g<sup>-1</sup> of inert substrate). Indeed winter cultivars presented a higher disease severity (figure 1A) but also a higher disease frequency (figure 1B) at dose 15. At the strongest pathogen dose (30 oospores.g<sup>-1</sup> of inert substrate), no significant difference in disease index and frequency could be observed between spring and winter cultivars. Interestingly, when considering each cultivar individually, two distinct patterns tend to be observed between observed disease severity for each pathogen dose tested, even if no strong statistical difference could be highlighted because of high data variability. As expected, LG AURIS, Avenger and Indiana cultivars showed higher disease index at dose 30 compared to dose 15 (figure 1C). On the contrary, Aurelia, Dexter and Myster cultivars did not showed any noticeable increase in disease index but rather a slightly decrease in observed disease severity with the increase of pathogen dose (figure 1C). Aurelia cultivar showed the lowest disease index at the tested doses compared to all cultivars (figure 1C). Similarly, this cultivar showed the lowest disease frequency at all tested doses (figure 1D). Interestingly, at dose 30, all the other cultivars were all infected, presenting a disease frequency of 100 % (figure 1D).





**Figure 1| Comparison of spring and winter pea cultivars on their susceptibility to *A. euteiches*.** Disease severity index (A) and disease frequency (B) of pea inoculated with 15 and 30 oospores of *A. euteiches* per gram of dry substrate (DS) on spring (SP) and winter (WP) pea cultivars, at 10 days post inoculation (dpi). Disease severity index (C) and disease frequency (D) of pea inoculated with 15 and 30 oospores of *A. euteiches* per gram of dry substrate (DS) on spring cultivars (Aurelia, Avenger and LG AURIS) and on winter cultivars (Dexter, Indiana and Myster), at 10 days post inoculation (dpi). Inoculations were done on 4-day old seedlings and disease index was evaluated according to Wicker et al. (2001), based on a disease index to quantify symptoms via the proportion of typical brown-yellow lesions. Disease frequency represents the percentage of infected plants. Results are means of 3 independent experiments including 2 replicates per modality  $\pm$  SD. Differences between modalities were compared and analyzed using Kruskal-Wallis test (post hoc *kruskalmc*). Asterisks indicate statistical significance at  $*P < 0.05$ . DS: dry substrate, SP: spring pea cultivar, WP: winter pea cultivar.

### **3.2. Phenotypic modifications induced by *A. euteiches* infection**

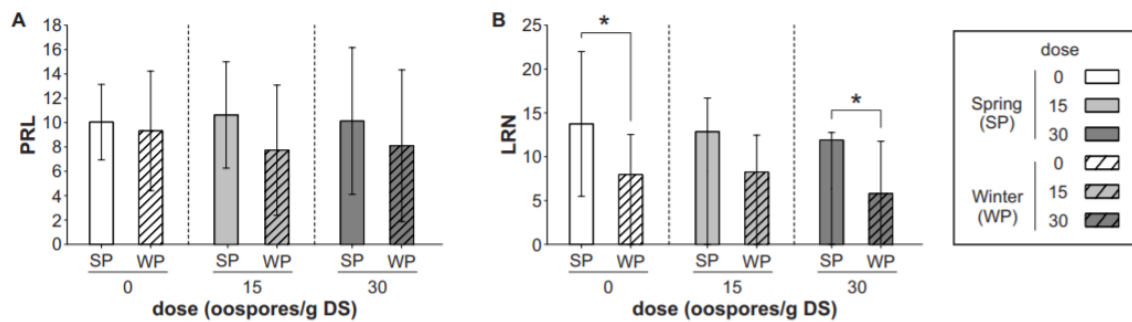
To investigate the influence of cultivar type (spring or winter) and independent cultivar on phenotypic modifications induced by *A. euteiches* infection, architectural traits (root and shoot) were assessed at the different doses (15 and 30) after 10 dpi.

#### **3.2.1. Impact on root measurements**

No significant difference in primary root length (PRL) was observed between winter and spring cultivars in all conditions in response to *A. euteiches* inoculation at 10 dpi (Figure 2A). Spring cultivars tended to present longer primary root compared to winter cultivars. Winter cultivars presented significant lower lateral root number (LRN) compared to spring cultivars at dose 0 (control) and 30 (figure 2B). At dose 15, the number of lateral roots of winter cultivars was slightly increased (+ 0.28 cm) contrary to spring cultivars (- 0.89 cm) by *A. euteiches* compared to dose 0. At dose 30, spring cultivars showed globally a higher lateral root number than winter cultivars (figure 2B) and lateral root numbers in both spring and winter cultivars were negatively impacted compared to dose 0 (-1.83 cm and -2.17 cm, respectively).







**Figure 2| Impact of *A. euteiches* inoculation on root traits of spring and winter pea cultivars.** Impact of *A. euteiches* inoculation (A) on primary root length (PRL) and (B) on lateral root number (LRN) of spring and winter pea cultivars. Measurements were done on peas inoculated with 0, 15 and 30 oospores of *A. euteiches* per gram of dry substrate (DS) on spring (SP) and winter (WP) pea cultivars, at 10 days post inoculation (dpi). Results are means of 3 independent experiments including 2 replicates per modality  $\pm$  SD. Differences between modalities were compared and analyzed using Kruskal-Wallis test (post hoc kruskalmc). Asterisks indicate statistical significance at  $*P < 0.05$ . DS: dry substrate, SP: spring pea cultivar, WP: winter pea cultivar.

When considering spring and winter cultivar groups separately, no clear difference of root measurements (PRL and LRN) could be observed between non inoculated and the 2 tested pathogen doses (figure S1A and S1B), except for a slight but significant reduction of the number of lateral roots for winter cultivars between the dose 15 and 30 (figure S1B). When considering each tested pathogen dose independently, only lateral root number between cultivars was not significantly different at dose 0 (table 1).

Among one of the most striking difference observed, Indiana presented always shorter primary root than the other cultivars consistently at all the tested doses (0, 15 and 30). LG AURIS exhibited more lateral roots than the other cultivars, difference which was particularly observed in response to *A. euteiches* inoculation at dose 15 compared to Aurelia and Dexter and at dose 30 compared to Indiana (table 1). Interestingly, Aurelia tended to present longer primary root in response to *A. euteiches* inoculation (12.2 cm at dose 15 and 13.1 cm at dose 30 contrary to 8.3 cm at dose 0, non-inoculated modality). LG AURIS presented more lateral roots at dose 15 compared to Aurelia and Dexter cultivars, the latter showing the lowest number of lateral roots. Avenger, LG AURIS, Myster and more particularly Indiana presented generally a reduction of lateral root number at the highest doses of pathogen.

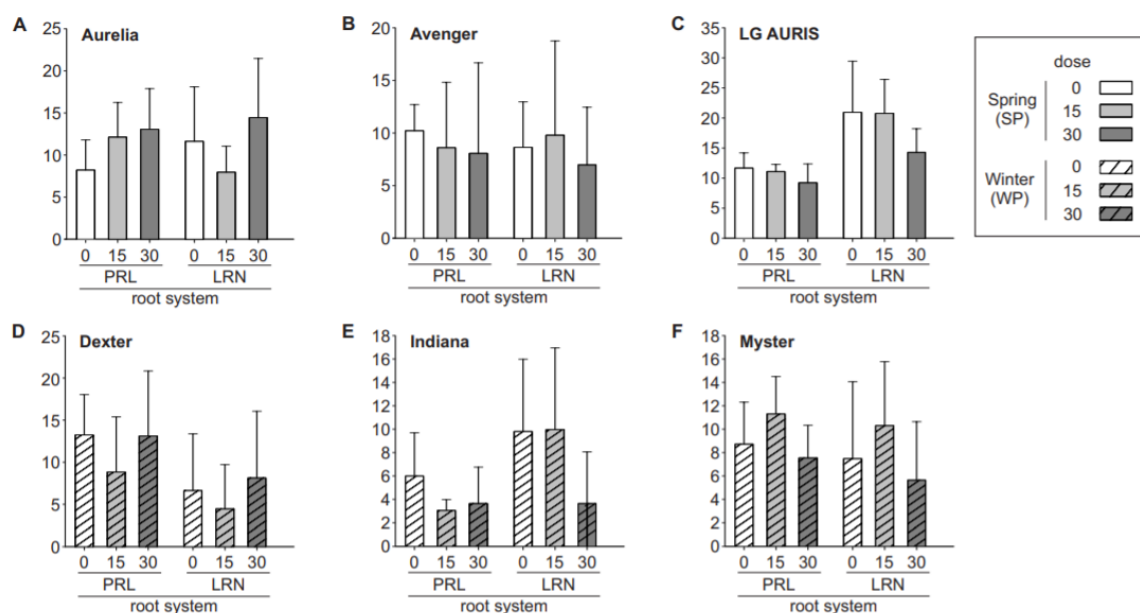


**Table 1| Comparison of aerial and root traits of spring and winter cultivars in response to *A. euteiches* inoculation (0 (D0); 15 (D15); and 30 (D30) oospores per gram of dry substrate). Values are the mean of 2 replicates of 3 independent experiments, ± standard deviation. Differences between cultivar type were compared and analysed using Kruskal-Wallis test (post hoc kruskalmc, letters indicating differences between cultivars.**

		Spring cultivars				Winter Cultivars		
		Aurelia	Avenger	LG AURIS	Dexter	Indiana	Myster	
<b>Root traits</b>	Primary root length (cm)	D0 (control)	8.3 ± 3.6 (ab)	10.3 ± 2.5 (ab)	11.7 ± 2.5 (ab)	<b>13.3 ± 4.8 (a)</b>	<b>5.8 ± 3.8 (b)</b>	8.8 ± 3.6 (ab)
		D15	<b>12.2 ± 4.1 (a)</b>	8.6 ± 6.2 (ab)	<b>11.2 ± 1.2 (a)</b>	8.9 ± 6.6 (ab)	<b>3.1 ± 0.9 (b)</b>	<b>11.3 ± 3.2 (a)</b>
		D30	<b>13.1 ± 4.8 (a)</b>	8.1 ± 8.6 (ab)	9.3 ± 3.1 (ab)	<b>13.2 ± 7.7 (a)</b>	<b>3.7 ± 3.1 (b)</b>	7.6 ± 2.8 (ab)
	Lateral root number	D0 (control)	11.7 ± 6.5 (a)	8.7 ± 4.3 (a)	21.0 ± 8.5 (a)	6.7 ± 6.7 (a)	9.8 ± 6.2 (a)	7.5 ± 6.6 (a)
		D15	<b>8.0 ± 3.1 (b)</b>	9.8 ± 9.0 (ab)	<b>20.8 ± 5.6 (a)</b>	<b>4.5 ± 5.2 (b)</b>	10.0 ± 7.0 (ab)	10.3 ± 5.5 (ab)
		D30	14.5 ± 7.0 (ab)	7.0 ± 5.5 (ab)	<b>14.3 ± 3.9 (a)</b>	8.2 ± 7.9 (ab)	<b>3.7 ± 4.4 (b)</b>	5.7 ± 5.0 (ab)
<b>Aerial traits</b>	Main shoot length (cm)	D0 (control)	5.5 ± 2.4 (a)	5.5 ± 1.4 (a)	8.5 ± 2.7 (a)	5.0 ± 1.7 (a)	4.0 ± 2.6 (a)	4.3 ± 2.5 (a)
		D15	4.6 ± 1.7 (a)	4.8 ± 1.9 (a)	6.4 ± 2.6 (a)	3.1 ± 1.9 (a)	3.8 ± 1.9 (a)	6.0 ± 2.8 (a)
		D30	5.5 ± 1.7 (a)	4.9 ± 3.0 (ab)	3.9 ± 0.9 (ab)	4.0 ± 3.3 (ab)	<b>1.9 ± 1.6 (b)</b>	3.0 ± 1.0 (ab)
	Leaf node number	D0 (control)	3.5 ± 1.4 (a)	3.2 ± 1.2 (a)	3.7 ± 1.2 (a)	3.8 ± 1.2 (a)	2.7 ± 1.4 (a)	2.8 ± 1.8 (a)
		D15	3.0 ± 1.1 (a)	2.8 ± 0.8 (a)	3.2 ± 1.2 (a)	2.2 ± 1.5 (a)	3.2 ± 1.0 (a)	4.7 ± 1.8 (a)
		D30	3.3 ± 1.4 (a)	2.7 ± 0.8 (a)	2.7 ± 0.8 (a)	3.2 ± 2.5 (a)	1.7 ± 1.5 (a)	2.7 ± 1.0 (a)

Concerning architectural modifications induced by growing pathogen inoculation doses in comparison to non-inoculated modality, for each cultivar, two trends seemed to be observed. Taken independently, Aurelia primary root seemed to increase in response to *A. euteiches* inoculation compared to non-inoculated plants (figure 3A). The same trend was observed with higher number of lateral roots at dose 30 compared to non-inoculation condition (figure 3A). As expected, root traits were globally reduced because of pathogen presence for Avenger, LG AURIS and Indiana cultivars (figure 3B, 3C and 3E). On the contrary, in Myster and Dexter cultivars, length of the primary root and number of lateral roots were affected depending on the pathogen dose but not linearly, in response to *A. euteiches* inoculation (figure 3D and 3F). These observations could be linked to disease index. Cultivars with global positive and negative modifications presented respectively the lowest and the strongest DI (figure 1).





**Figure 3| Root trait behaviors in response to *A. euteiches* inoculation in spring cultivars: Aurelia (A), Avenger (B), LG AURIS (C) and winter pea cultivars: Dexter (D), Indiana (E) and Myster (F).** Primary root length (PRL) and on lateral root number (LRN) measurements were done on peas inoculated with 0, 15 and 30 oospores of *A. euteiches* per gram of dry substrate (DS) on spring (SP) and winter (WP) pea cultivars, at 10 days post inoculation (dpi). Results are means of 3 independent experiments including 2 replicates per modality  $\pm$  SD Differences between modalities were compared and analyzed using Kruskal-Wallis test (post hoc kruskalmc). Asterisks indicate statistical significance at  $*P < 0.05$ . DS: dry substrate, SP: spring pea cultivar, WP: winter pea cultivar.

### 3.2.2. Impact on aerial measurements

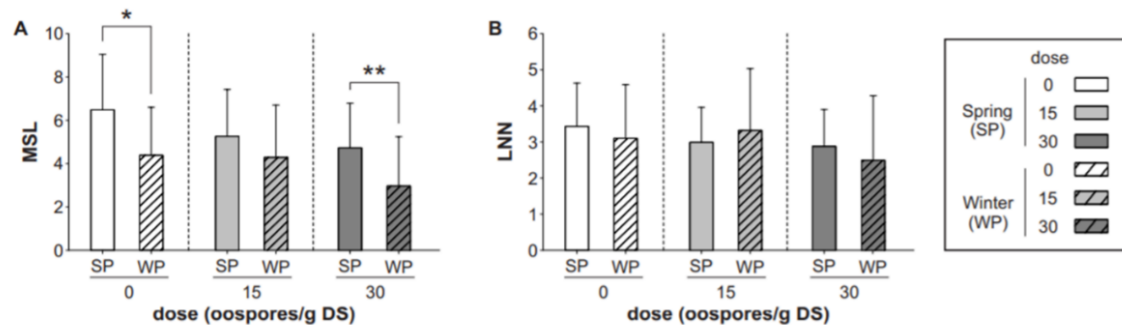
Spring cultivars showed a significant higher shoot main length compared to winter cultivars at dose 0 and 30 (figure 4A). At dose 15, surprisingly, the slight decrease observed in winter cultivars was no significant compared to spring cultivars (figure 4A). Indeed, at dose 15, main shoot length of winter cultivars was less impacted (- 0.10 cm) than spring cultivars (- 1.22 cm). At dose 30, spring and winter cultivars were impacted at equivalent level with reduction of the main shoot length (-1.75 cm and -1.42 cm, respectively). No significant differences between winter and spring cultivars were seen for the leaf node number, at the different doses. However, when considering each group separately, a clear significant reduction of aerial traits (MSL and LNN) could be observed for spring cultivars regardless of the inoculated dose, when comparing



with non-inoculated plants, (figure S2A and S2B). For winter cultivars, length of main shoot was only impacted at the higher inoculated dose (figure S2A and S2B).

When considering each tested pathogen dose, no significant difference of aerial traits was observed between the studied cultivars, except for a shorter main shoot for Indiana cultivar at dose 30 (table 1).

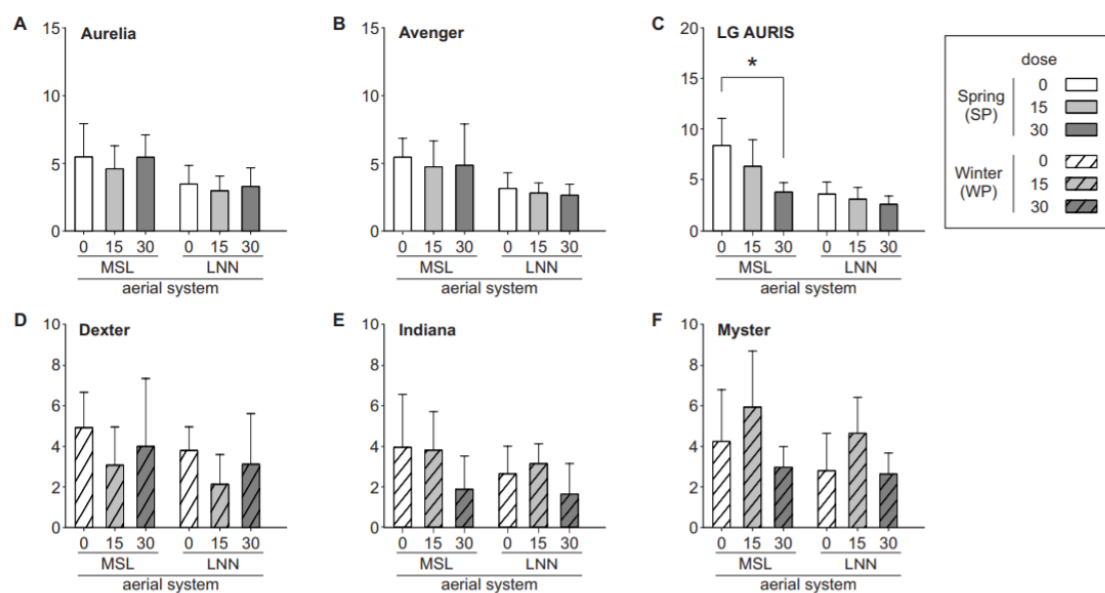
As observed for root traits, concerning aerial system architectural modifications induced by the highest dose in comparison to non-inoculated modality, for each cultivar, two trends seemed to be observed. For Aurelia cultivar, modifications induced by *A. euteiches* inoculation were minimal (figure 5A). Aerial traits were globally reduced because of pathogen presence for Avenger, LG AURIS and Indiana cultivars (figure 5B, 5C and 5E). Instead, Myster and Dexter cultivars showed increased shoot length and leaf node number, respectively at intermediate dose compared to non-inoculated plants, and higher dose compared to the intermediate one (figure 5D and 5F).



**Figure 4 | Impact of *A. euteiches* inoculation on aerial traits of spring and winter pea cultivars.** Impact of *A. euteiches* inoculation (A) on main shoot length (MSL) and (B) on leaf node number (LNN) of spring and winter pea cultivars. Measurements were done on peas inoculated with 0, 15 and 30 oospores of *A. euteiches* per gram of dry substrate (DS) on spring (SP) and winter (WP) pea cultivars, at 10 days post inoculation (dpi). Results are means of 3 independent experiments including 2 replicates per modality  $\pm$  SD. Differences between modalities were compared and analyzed using Kruskal-Wallis test (post hoc kruskalmc). Asterisks indicate statistical significance at  $*P < 0.05$ . DS: dry substrate, SP: spring pea cultivar, WP: winter pea cultivar.







**Figure 5| Aerial trait behaviors in response to *A. euteiches* inoculation in spring cultivars: Aurelia (A), Avenger (B), LG AURIS (C) and in winter pea cultivars: Dexter (D), Indiana (E) and Myster (F).** Main shoot length (MSL) and leaf node number (LNN) measurements were done on peas inoculated with 0, 15 and 30 oospores of *A. euteiches* per gram of dry substrate (DS) on spring (SP) and winter (WP) pea cultivars, at 10 days post inoculation (dpi). Results are means of 3 independent experiments including 2 replicates per modality  $\pm$  SD. Differences between modalities were compared and analyzed using post-hoc kruskalmc. Asterisks indicate statistical significance at \*P < 0.05.

### 3.2.3. Correlations between architectural traits and disease severity

Correlations between disease index and architectural traits for each pathogen dose and each cultivar type were investigated. At the intermediate pathogen dose (dose 15), disease severity was negatively correlated with most of the measured traits and surprisingly with the except of winter cultivars for the primary root length and of the spring cultivars for the lateral root number (table 2). At the highest pathogen dose, negative correlations were observed for all architectural traits of winter cultivars, while only negative correlations were observed for primary root and main shoot lengths of spring cultivars. As previously described, disease severity was negatively correlated with architecture for winter cultivars, for all measured traits. No interesting pattern could be found between disease index and constitutive architecture (table 3).



**Table 2| Spearman correlations between disease index and architectural traits of winter and spring pea cultivars for each pathogen dose.** Asterisks indicate statistical significance at  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.01$ .

	Cultivar type	Root traits		Aerial traits	
		PRL	LRN	MSL	LNN
Disease index (dose 15)	Spring	- 0.49*	ns	- 0.52*	- 0.49*
	Winter	ns	- 0.80**	- 0.79**	- 0.84**
Disease index (dose 30)	Spring	-0.63**	ns	- 0.51*	ns
	Winter	- 0.64**	- 0.51*	- 0.55*	-0.63**

**Table 3| Mean and standard deviation of architectural (root and aerial) traits and disease index for each pea cultivar.**

Cultivar	Architectural traits				Disease index	
	Root traits		Aerial traits		Inoculation dose	
	PRL	LRN	MSL	LNN	15	30
Aurelia (SP)	8.3 ± 3.6	11.7 ± 6.5	5.5 ± 2.4	3.5 ± 1.4	1 ± 1.5	0.8 ± 0.4
Avenger (SP)	10.3 ± 2.5	8.7 ± 4.3	5.5 ± 2.7	3.2 ± 1.2	1.7 ± 1.4	2.7 ± 1.4
LG AURIS (SP)	11.7 ± 2.7	21.0 ± 8.5	8.5 ± 2.7	3.7 ± 1.2	1.5 ± 0.8	2.5 ± 1.6
Dexter (WP)	13.3 ± 9.7	6.7 ± 6.7	13.3 ± 9.7	3.8 ± 7.7	2.8 ± 1.6	1.8 ± 1.6
Indiana (WP)	6 ± 4.8	6.7 ± 9.8	4 ± 1.7	2.7 ± 1.2	2.8 ± 1.5	3.3 ± 1.9
Myster (WP)	8.8 ± 3.6	7.5 ± 6.6	4.3 ± 2.5	2.8 ± 1.8	2.2 ± 1.8	1.8 ± 1.3

#### 4. Discussion

Root rot caused by *A. euteiches* is an extremely harmful disease which can strongly impact pea culture, resulting in important yield losses (Wu *et al.*, 2019). Unfortunately, there is no efficient treatment to fight against this soilborne pathogen. A considerable effort is being made on varietal selection and knowledge about the opportunity of genetic resistance (Pilet-Nayel *et al.*, 2005; Desgroux *et al.*, 2018). Development of pea varieties presenting complete resistance to *A. euteiches* is a far-reaching mission supported by numerous researches to understand molecular and genetic bases for resistance, particularly through mark-assisted selection targeting QTL of interest (Pilet-Nayel *et al.*, 2002; Pilet-Nayel *et al.*, 2005; Desgroux *et al.*, 2016; Desgroux *et al.*, 2018). Several studies focused thus not only on the comparison of pea breeding lines' tolerance/resistance to *A. euteiches* (Pilet-Nayel *et al.*, 2002; Wicker *et al.*, 2003; Pilet-Nayel *et al.*, 2005; Hamon *et al.*, 2011; Desgroux *et al.*, 2016; Desgroux *et al.*, 2018) but also the evaluation of the susceptibility of pea cultivars (Engqvist and Ahvenniemi, 1997; Wicker *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2019). Generally, evaluation of pea lines and cultivars tolerance are performed with artificial inoculation at one pathogen density, using *A. euteiches* zoospores or oospores. Here, two level of oospore density - low (15 oospores g<sup>-1</sup> dry matrix) and medium (30 oospores g<sup>-1</sup> dry matrix) were used for comparison of disease severity and



induced architectural modifications in winter and spring pea cultivars. The aim was to maximize the observation of potential differential impact and to compare architectural modifications induced in response to *A. euteiches* inoculation within two different cultivar types. These two inoculum densities were chosen to mimic levels of pathogen pressure which will not lead to a high disease index and so rapid and general plant death, impairing fine observations of differences between cultivars responses. The aim was to confirm tolerance to *A. euteiches* of winter pea cultivars, observed in fields, when grown in same conditions compared to spring cultivars.

Disease severity was determined through classical disease index (Wicker *et al.*, 2003), in assigning a score according to observed severity and extent of root lesions, and by considering occurrence frequency. Here, in same growth conditions, the winter cultivar group appeared to be similarly impacted for the highest tested inoculum dose and even strongly at low pathogen pressure when compared to the spring group. As already described by McGee *et al.* (2017), winter pea is actually known to be threatened by the same pathogens than spring pea. But winter pea cultivars are also well known to be able to escape *A. euteiches* root rot in field (Bénézit *et al.*, 2017). Classically, disease escape is considered to rely on several phenomena: a possible different spatial repartition between plant roots and pathogen localization, temporal dissociation between pathogen development and the most sensitive growth stage of plant or non-advantageous microclimatic conditions for the pathogen (Mansfield *et al.*, 1997; McDonald and Peck, 2009; Karkanis *et al.*, 2016; Desgroux *et al.*, 2018). The major hypothesis concerning winter pea escape from *Aphanomyces* root rot is the non-concordance between the sensitive first step of plant development, following sowing, and favorable conditions for pathogen infection, rather in spring. In parallel, a possible enhanced tolerance could result from the activation of various mechanisms of defense during cold acclimation (Kuwabara and Imai, 2009). The induced or constitutive cultivar defense mechanisms (Kakaei *et al.*, 2010) or/and the pathogen pressure (Walters *et al.*, 2008) which induced variation in expression of disease could explain the difference seen at the lowest but not at the strongest pathogen dose, between spring and winter pea cultivars. Moreover, here, two tendencies seemed to be observed when considering cultivars independently, and so possible different triggered mechanisms: one group constituted with cultivars, Aurelia, Dexter and Myster showing less symptoms when exposed to high pathogen pressure; and another group with LG AURIS, Avenger and Indiana cultivars showing classically more symptoms severity with higher pathogen dose. Aurelia, spring cultivar, presented comparatively the highest tolerance to *A. euteiches*. These results could be the indication of cultivar's genetic influence on the sensitivity/tolerance pattern. Indiana



appeared to be the most susceptible to *A. euteiches*, with the highest observed disease index and frequency. Aurélia could represent a case of interest to study specific mechanisms of defense for further analyses, for breeding consideration.

Disease severity was also assessed by comparing induced architectural modifications for both root and aerial traits. Pea is known to present a wide level of natural genetic variability in architectural traits (McPhee, 2005; Desgroux *et al.*, 2018). Evaluating modifications of pea root and aerial architecture due to *A. euteiches* infection is of major importance because of direct link to culture yield. This study attempts to inform about the overall impact of *A. euteiches* infection and not only on root architecture or observed lesions. It seems to be essential to consider multiple disease symptoms to describe its severity and its global impact on plant development more accurately. Wicker *et al.* (2003) evaluated thus the pathogenicity of several *A. euteiches* strains on various pea cultivars through assessment of architectural traits. Indeed, plant architecture plays an important role in disease management. Root and aerial architectural organization might favor or not pathogen infection, its development, and its dissemination (Tivoli *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2017; Desgroux *et al.*, 2018). For example, dense aerial architecture, principally because of leaf proximity, in pea and wheat cultures were shown to favor spread disease by amplifying wind effect or by enhanced transmission because of closed splashing of aerial pathogen from plant to plant (Richard *et al.*, 2012; Calonnet *et al.*, 2013; Tivoli *et al.*, 2013). When considering here the consequence of the infection on plant development, and so the result on root and aerial traits, the observations showed different responses according to cultivar and interestingly to pathogen pressure strength. At low pathogen dose, surprisingly, *A. euteiches* infection seemed to have globally less impact on winter pea root system, showing an increased development compared to non-infected plants, contrary to the spring pea group with more negatively impacted root systems. Better tolerance to diseases due to soilborne pathogens has already been described as joined with enhancement of root system. Kraft and Boge (2001) described a higher root production by some pea genotypes when infected by *Fusarium solani*. Infection by *A. euteiches* leads to increase lateral root growth in several resistant *Medicago truncatula* accessions, when compared with healthy plants (Djébali *et al.*, 2009; Bonhomme *et al.*, 2014).

Difference in defense responses, particularly the setting up of possible mechanisms of escape by root growth to avoid pathogen contact, could be hypothesized. Root growth could also be triggered as a strategy to produce enough healthy tissue to overcome the consequence of lesions, preserve root vigor and plant nutrition under stressed conditions, and so maintain the entire system. Cultivars could be grouped according to two typical strategies. Thus, LG AURIS,





Indiana and Avenger cultivars showed global decreased of root traits because of infection, whereas Myster, Dexter and Aurelia cultivars presented more developed root systems. The increase of root system in presence of pathogen is related with lower disease index and the decrease of root system is related with higher disease index. Disease tolerance appeared to be clearly linked to the modifications induced on root architecture and so to the strategy deployed, in connection with some specific genetic determinism. However, these fine differential strategies appeared to be also conditioned by the importance of pathogen pressure. It could be interesting also to study hormonal balances in cultivars, particularly IAA production, particularly linked to root growth enhancement induced by infection, according also to the importance of pathogen pressure.

Besides induced modifications and their implication for pathogen resistance, the relation with the constitutive architecture of healthy plant could also be explored. A positive relation was highlighted between lateral root number but also root diameter of the common bean and its resistance to *Fusarium solani* root rot (Snapp *et al.*, 2003). Similarly, a higher number of secondary lateral roots and more globally a higher biomass of the entire root system was showed to be related to increased resistance of the common bean to *F. solani* (Román-Avilés *et al.*, 2004). For the same crop, Hagerty *et al.* (2015) showed a negative correlation between root diameter and resistance to *A. euteiches*. Melon resistance to *Monosporascus cannonbalus* is higher with a well-branched root system (Dias *et al.*, 2004). Desgroux *et al.* (2018) showed a clear link between important root architecture features in pea lines before infection and resistance to *A. euteiches*. Here, no such clear pattern between constitutive architecture of the tested cultivar and tolerance to the pathogen could be highlighted. Maybe this could be link to the pathogen pressure strength, potentially higher in Desgroux *et al.* (2018), and the age of seedling when inoculated (seven-day old *versus* four-day old here). Induced modifications appeared to be well correlated with disease index and so symptoms severity for the winter cultivar group, whatever the pathogen dose. As expected, an advanced infection with marked symptoms lead to a global reduction of plant traits. On the contrary, no such link could be observed for the spring cultivar group, with more aleatory modifications. This difference highlights again cultivar differences in mechanisms triggered after infection.

Assessment of aerial modifications induced by *A. euteiches* had shown an interesting delay in aerial symptoms for winter pea cultivars at the lowest pathogen pressure compared to spring pea cultivars. This observation converges with the assertion that *A. euteiches* presents a lower impact on winter pea in field, when only aerial parts could be observed. When pathogen pressure is not too important, aerial system could be maintained. Reduced impact on plant



architecture, because of intrinsic resistance of cultivars, could be a way to preserve yield in infested fields. Same pattern, as previously described, appeared to show global reduction of aerial traits in infected plants for LG AURIS, Indiana and Avenger cultivars, maintenance for Aurelia and even enhancement for Myster and Dexter cultivars. For the first three cultivars, reduction of aerial traits could be related to the reduced root system, impairing sufficient supply of water and nutrient to plants. On the contrary, maintenance of aerial parts could be directly linked to global enhancement or at least absence of prejudicial impact on root system, allowing plant nutrition despite the infection. This delay can be also due to more efficient defense mechanisms to contain the infection, under the dependence of pathogen density. Such difference was observed for example in *Brassica napus*, with similar root penetration and colonization of the hypocotyl by *Verticillium dahliae* in resistant and susceptible genotypes, while invasion of shoot part was only recorded for the susceptible ones (Eynck *et al.*, 2009). Hypocotyl tissue analyses revealed a higher intensity in the establishment of cellular barrier mechanisms and accumulation of soluble phenolics in resistant compared to susceptible genotypes. Ramírez-Suero *et al.* (2010) showed differences in the defense gene expression profiles between *Medicago truncatula* cultivars colonized by *Fusarium oxysporum*. However, the precise mechanisms involved in pea - *A. euteiches* pattern of tolerance/susceptibility still need to be elucidated. For example, our results could be completed by a comparison of mechanical barrier formation and accumulation of soluble and wall-bound phenolics between spring and winter pea cultivars, specifically in hypocotyl tissue. It would also be interesting to analyze more precisely gene expression in response to *A. euteiches* infection, as the genome of pea is now available (Kreplak *et al.*, 2019).

Although some significant differences about disease tolerance and architectural modifications had been discussed between cultivars clustered in winter and spring group, it should be noticed that the two interesting global patterns observed with global enhancement *versus* reduction of plant traits did not strictly distinguish these two groups. The spring cultivar Aurelia showed more similar response to disease with the two winter cultivars Myster and Dexter, with possibly shared triggered mechanisms. The response of the winter cultivar Indiana was quite close to the spring cultivars LG AURIS and Avenger. This observation corroborated the importance of the cultivar genetic effect on disease response, depending on the amplitude of pathogen pressure. However, these results should be taken with caution, because of high variability of all measurements, inherent to biological material, which could have masked some differences. Moreover, our study was based only on the French *A. euteiches* isolate RB84, classically deployed to mimic the most probable strain reencountered in French soil. However, it would be



interesting to compare cultivars tolerance and defense strategy in front of different pathogen pressure with other strains, showing various virulence. The six cultivars studied here were chosen, in collaboration with agricultural consultants, to be closed to a possible use in field. The patterns observed here probably may not be generalized to all spring and winter cultivars, because of each effect of their own genetic. Maybe some other cultivars could be studied to evaluate their specific performance in response to *A. euteiches* inoculation.

## 5. Conclusion

Interesting results were obtained here concerning the specificity of cultivars response to *A. euteiches*. Particularly, a postponement of winter cultivar aerial symptoms was revealed at low pathogen pressure, as empirically observed in field. Some difference in tolerance to *A. euteiches* could also be highlighted between cultivars. Two distinct patterns of response of the studied cultivars were observed with an enhancement - for Myster (WP), Dexter (WP) and Aurelia (SP) - or a reduction - for LG AURIS (SP), Avenger (SP) and Indiana (WP) - of root growth, which probably conditioned the final respectively same observed impact on aerial parts. These two distinct strategies are clearly linked to the observed disease index, lower in case of root trait increase. The delay of impact on aerial parts linked to reduced symptoms on root system would probably rely on a strategy to maintain root function towards nutrition, to conserve plant global vigor. The architectural modifications and disease severity appeared to be under the dependence of the amplitude of the pathogen dose, with clear difference in plant compartment between low and intermediate pressure. The classical assertion that winter pea escapes towards *A. euteiches* root rot only because of a separation between plant sensitive stage and favorable conditions for pathogen infection in spring could be also completed by an effective cultivar effect because of their own genetic arsenal, represented a substantial factor of determinism in disease tolerance/susceptibility. These results opened prospects for other studies and probably for genetic and cultivar solutions to fight pea root rot, focused on specific defense mechanisms induced after root colonization.



## References

- Allmaras, R. R., Fritz, V. A., Pflieger, F. L., & Copeland, S. M. (2003). Impaired internal drainage and *Aphanomyces euteiches* root rot of pea caused by soil compaction in a fine-textured soil. *Soil and Tillage Research*, 70(1), 41-52.
- Bénézit, M., Biarnès, V., & Jeuffroy, M. H. (2017). Impact of climate and diseases on pea yields: what perspectives with climate change? *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 24(1), np.
- Bonhomme, M., André, O., Badis, Y., Ronfort, J., Burgarella, C., Chantret, N., ... & Navier, H. (2014). High-density genome-wide association mapping implicates an F-box encoding gene in *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches*. *New Phytologist*, 201(4), 1328-1342.
- Bourion, V., Lejeune-Hénaut, I., Munier-Jolain, N., & Salon, C. (2003). Cold acclimation of winter and spring peas: carbon partitioning as affected by light intensity. *European journal of agronomy*, 19(4), 535-548.
- Calonnec, A., Burie, J. B., Langlais, M., Guyader, S., Saint-Jean, S., Sache, I., & Tivoli, B. (2013). Impacts of plant growth and architecture on pathogen processes and their consequences for epidemic behaviour. *European Journal of Plant Pathology*, 135(3), 479-497.
- Chatterton, S., Bowness, R., & Harding, M. W. (2015). First report of root rot of field pea caused by *Aphanomyces euteiches* in Alberta, Canada. *Plant Disease*, 99(2), 288-288.
- Desgroux, A., Baudais, V. N., Aubert, V., Le Roy, G., de Larambergue, H., Miteul, H., ... & Burstin, J. (2018). Comparative genome-wide-association mapping identifies common loci controlling root system architecture and resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea. *Frontiers in plant science*, 8, 2195.
- Desgroux, A., L'anthoëne, V., Roux-Duparque, M., Rivière, J. P., Aubert, G., Tayeh, N., ... & McGee, R. J. (2016). Genome-wide association mapping of partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea. *BMC genomics*, 17(1), 124.
- Dias, R. D. C., Pico, B., Espinos, A., & Nuez, F. (2004). Resistance to melon vine decline derived from *Cucumis melo* ssp. *agrestis*: genetic analysis of root structure and root response. *Plant Breeding*, 123(1), 66-72.
- Djébali, N., Jauneau, A., Ameline-Torregrosa, C., Chardon, F., Jaulneau, V., Mathé, C., ... & Aouani, M. E. (2009). Partial resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* is associated with protection of the root stele and is controlled by a major QTL rich in proteasome-related genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(9), 1043-1055.
- Engqvist, L. G., & Ahvenniemi, P. (1997). Interactions between common root rot (*Aphanomyces euteiches*) and peas (*Pisum sativum*) in Finland. *Acta Agriculturae Scandinavica B—Plant Soil Sciences*, 47(4), 242-247.
- Eynck, C., Koopmann, B., Karlovsky, P., & Von Tiedemann, A. (2009). Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Phytopathology*, 99(7), 802-811.
- Foyer, C. H., Lam, H. M., Nguyen, H. T., Siddique, K. H., Varshney, R. K., Colmer, T. D., ... & Cooper, J. W. (2016). Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature plants*, 2(8), 1-10.
- Gangneux, C., Cannesan, M. A., Bressan, M., Castel, L., Moussart, A., Vicré-Gibouin, M., ... & Laval, K. (2014). A sensitive assay for rapid detection and quantification of *Aphanomyces euteiches* in soil. *Phytopathology*, 104(10), 1138-1147.





- Gaulin, E., Jacquet, C., Bottin, A., & Dumas, B. (2007). Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 539-548.
- Gossen, B. D., Conner, R. L., Chang, K. F., Pasche, J. S., McLaren, D. L., Henriquez, M. A., ... & Hwang, S. F. (2016). Identifying and managing root rot of pulses on the northern great plains. *Plant Disease*, 100(10), 1965-1978.
- Hagerty, C. H., Cuesta-Marcos, A., Cregan, P. B., Song, Q., McClean, P., Noffsinger, S., & Myers, J. R. (2015). Mapping *Fusarium solani* and *Aphanomyces euteiches* root rot resistance and root architecture quantitative trait loci in common bean. *Crop science*, 55(5), 1969-1977.
- Hatch, D. J., Chadwick, D. R., Jarvis, S. C., & Roker, J. A. (Eds.). (2004). *Controlling nitrogen flows and losses*. Wageningen Academic Publishers.
- Hamon, C., Baranger, A., Coyne, C. J., McGee, R. J., Le Goff, I., L'Anthoëne, V., ... & McPhee, K. E. (2011). New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple French and American environments. *Theoretical and applied genetics*, 123(2), 261-281.
- Hardarson, G., & Atkins, C. (2003). Optimising biological N<sub>2</sub> fixation by legumes in farming systems. *Plant and soil*, 252(1), 41-54.
- Heyman, F., Lindahl, B., Persson, L., Wikström, M., & Stenlid, J. (2007). Calcium concentrations of soil affect suppressiveness against *Aphanomyces* root rot of pea. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(9), 2222-2229.
- Kakaei, M., Kahrizi, D., & Mostafaie, A. (2010). Study on powdery mildew disease related proteins expression in winter wheat cultivars via SDS-PAGE. *Biharean Biologist*, 4(2), 169-171.
- Karkanis, A., Ntatsi, G., Kontopoulou, C. K., Pristeri, A., Bilalis, D., & Savvas, D. (2016). Field pea in European cropping systems: adaptability, biological nitrogen fixation and cultivation practices. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(2), 325-336.
- Kharbanda, P. D., & Tewari, J. P. (1996). Integrated management of canola diseases using cultural methods. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18(2), 168-175.
- Koivunen, E., Partanen, K., Perttilä, S., Palander, S., Tuunainen, P., & Valaja, J. (2016). Digestibility and energy value of pea (*Pisum sativum* L.), faba bean (*Vicia faba* L.) and blue lupin (narrow leaf) (*Lupinus angustifolius*) seeds in broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 218, 120-127.
- Kone, N., Asare-Bediako, E., Silue, S., Kone, D., Koita, O., Menzel, W., & Winter, S. (2017). Influence of planting date on incidence and severity of viral disease on cucurbits under field condition. *Annals of Agricultural Sciences*, 62(1), 99-104.
- Kraft, J. M., & Boge, W. (2001). Root characteristics in pea in relation to compaction and *Fusarium* root rot. *Plant disease*, 85(9), 936-940.
- Kreplak, J., Madoui, M. A., Cápál, P., Novák, P., Labadie, K., Aubert, G., ... & Klein, A. (2019). A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution. *Nature genetics*, 51(9), 1411-1422.
- Kuwabara, C., & Imai, R. (2009). Molecular basis of disease resistance acquired through cold acclimation in overwintering plants. *Journal of Plant Biology*, 52(1), 19-26.
- Lavaud, C., Baviere, M., Le Roy, G., Hervé, M. R., Moussart, A., Delourme, R., & Pilet-Nayel, M. L. (2016). Single and multiple resistance QTL delay symptom appearance and slow down root colonization by *Aphanomyces euteiches* in pea near isogenic lines. *BMC plant biology*, 16(1), 166.
- Lavaud, C., Lesne, A., Piriou, C., Le Roy, G., Boutet, G., Moussart, A., ... & Pilet-Nayel, M. L. (2015). Validation of QTL for resistance to *Aphanomyces euteiches* in different pea genetic backgrounds using near-isogenic lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(11), 2273-2288..



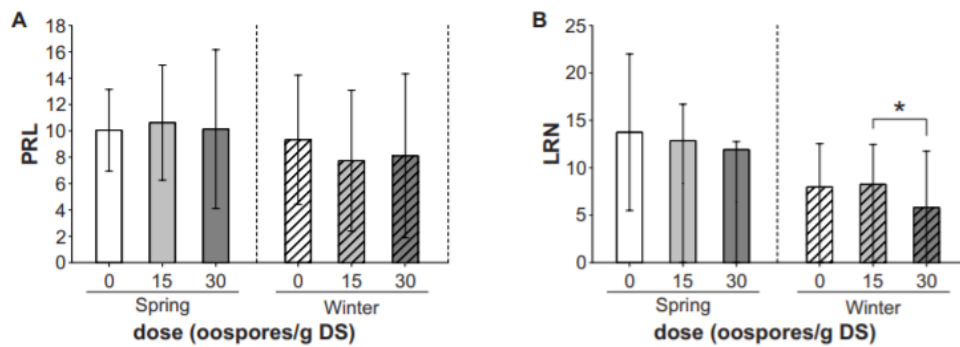
- Lejeune-Hénaut, I., Bourion, V., Etévé, G., Cunot, E., Delhayé, K., & Desmyter, C. (1999). Floral initiation in field-grown forage peas is delayed to a greater extent by short photoperiods, than in other types of European varieties. *Euphytica*, 109(3), 201-211.
- Mansfield, P. J., Wilson, D. W., Heath, M. C., & Saunders, P. J. (1997). Development of pea bacterial blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. pisi in winter and spring cultivars of combining peas (*Pisum sativum*) with different sowing dates. *Annals of applied biology*, 131(2), 245-258.
- McDonald, G. K., & Peck, D. (2009). Effects of crop rotation, residue retention and sowing time on the incidence and survival of ascochyta blight and its effect on grain yield of field peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research*, 111(1-2), 11-21.
- McGee, R. J., Eigenbrode, S., Nelson, H., & Schillinger, W. (2017). Re-inventing Austrian winter pea towards developing food quality winter peas. *Crops & Soils*, 50(4), 4-46.
- Moussart, A., Even, M. N., Lesne, A., & Tivoli, B. (2013). Successive legumes tested in a greenhouse crop rotation experiment modify the inoculum potential of soils naturally infested by *Aphanomyces euteiches*. *Plant pathology*, 62(3), 545-551.
- Nakajima, T., & Abe, J. (1996). Environmental factors affecting expression of resistance to pink snow mold caused by *Microdochium nivale* in winter wheat. *Canadian journal of botany*, 74(11), 1783-1788.
- Ney, B., Bancal, M. O., Bancal, P., Bingham, I. J., Foulkes, J., Gouache, D., ... & Smith, J. (2013). Crop architecture and crop tolerance to fungal diseases and insect herbivory. Mechanisms to limit crop losses. *European Journal of Plant Pathology*, 135(3), 561-580.
- Persson, L., & Olsson, S. (2000). Abiotic characteristics of soils suppressive to *Aphanomyces* root rot. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8-9), 1141-1150.
- Pfender, W. F., & Hagedorn, D. J. (1983). Disease progress and yield loss in *Aphanomyces* root rot of peas. *Phytopathology*, 73(8), 1109-1113.
- Pilet-Nayel, M., Muehlbauer, F., McGee, R., Kraft, J., Baranger, A., & Coyne, C. (2002). Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(1), 28-39.
- Pilet-Nayel, M. L., Muehlbauer, F. J., McGee, R. J., Kraft, J. M., Baranger, A., & Coyne, C. J. (2005). Consistent quantitative trait loci in pea for partial resistance to *Aphanomyces euteiches* isolates from the United States and France. *Phytopathology*, 95(11), 1287-1293.
- Plazek, A., & Zur, I. (2003). Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. *Plant Science*, 164(6), 1019-1028.
- Ramírez-Suero, M., Khanshour, A., Martínez, Y., & Rickauer, M. (2010). A study on the susceptibility of the model legume plant *Medicago truncatula* to the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Plant Pathology*, 126(4), 517-530.
- Richard, B., Jumel, S., Rouault, F., & Tivoli, B. (2012). Influence of plant stage and organ age on the receptivity of *Pisum sativum* to *Mycosphaerella pinodes*. *European Journal of Plant Pathology*, 132(3), 367-379.
- Román-Avilés, B., Snapp, S. S., & Kelly, J. D. (2004). Assessing root traits associated with root rot resistance in common bean. *Field crops research*, 86(2-3), 147-156.
- Sauvage, H., Moussart, A., Bois, F., Tivoli, B., Barray, S., & Laval, K. (2007). Development of a molecular method to detect and quantify *Aphanomyces euteiches* in soil. *FEMS microbiology letters*, 273(1), 64-69.
- Schneider, A., & Huyghe, C. (2015). *Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables* (p. 512). Editions Quae.



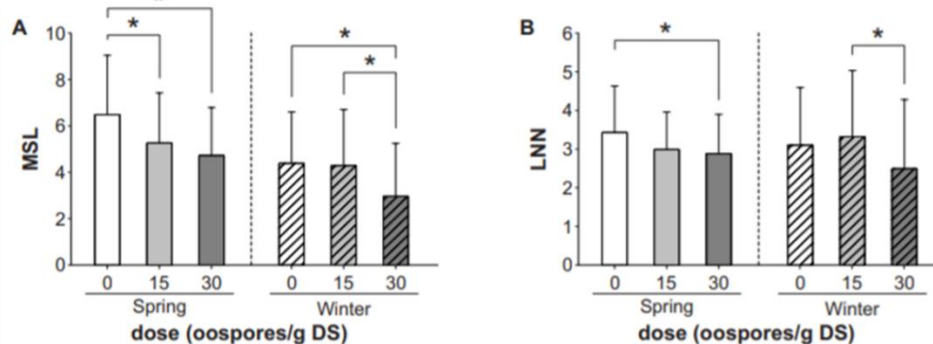
- Snapp, S., Kirk, W., Román-Avilés, B., & Kelly, J. (2003). Root traits play a role in integrated management of Fusarium root rot in snap beans. *HortScience*, 38(2), 187-191.
- Szechyńska-Hebda, M., Budiak, P., Gawroński, P., Górecka, M., Kulasek, M., & Karpiński, S. (2015). Plant physiomics: photoelectrochemical and molecular retrograde signalling in plant acclimatory and defence responses. In *PlantOmics: The Omics of Plant Science* (pp. 439-457). Springer, New Delhi.
- Tivoli, B., Calonnec, A., Richard, B., Ney, B., & Andrivon, D. (2013). Current knowledge on plant/canopy architectural traits that reduce the expression and development of epidemics. *European Journal of Plant Pathology*, 135(3), 471-478.
- Vidal, T., Lusley, P., Leconte, M., de Vallavieille-Pope, C., Huber, L., & Saint-Jean, S. (2017). Cultivar architecture modulates spore dispersal by rain splash: A new perspective to reduce disease progression in cultivar mixtures. *PloS one*, 12(11), e0187788.
- Walters, D. R., Paterson, L., Walsh, D. J., & Havis, N. D. (2008). Priming for plant defense in barley provides benefits only under high disease pressure. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 73(4-5), 95-100.
- Wicker, E., Hullé, M., & Rouxel, F. (2001). Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology*, 50(4), 433-442.
- Wicker, E., Moussart, A., Duparque, M., & Rouxel, F. (2003). Further contributions to the development of a differential set of pea cultivars (*Pisum sativum*) to investigate the virulence of isolates of *Aphanomyces euteiches*. *European Journal of Plant Pathology*, 109(1), 47-60.
- Williams-Woodward, J. L., Pflieger, F. L., Fritz, V. A., & Allmaras, R. R. (1997). Green manures of oat, rape and sweet corn for reducing common root rot in pea (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Plant and soil*, 188(1), 43-48.
- Wu, J., Zhang, Y., Yin, L., Qu, J., & Lu, J. (2014). Linkage of cold acclimation and disease resistance through plant-pathogen interaction pathway in *Vitis amurensis* grapevine. *Functional & integrative genomics*, 14(4), 741-755.
- Wu, L., Chang, K. F., Hwang, S. F., Conner, R., Fredua-Agyeman, R., Feindel, D., & Strelkov, S. E. (2019). Evaluation of host resistance and fungicide application as tools for the management of root rot of field pea caused by *Aphanomyces euteiches*. *The Crop Journal*, 7(1), 38-48.



## Supplemental data



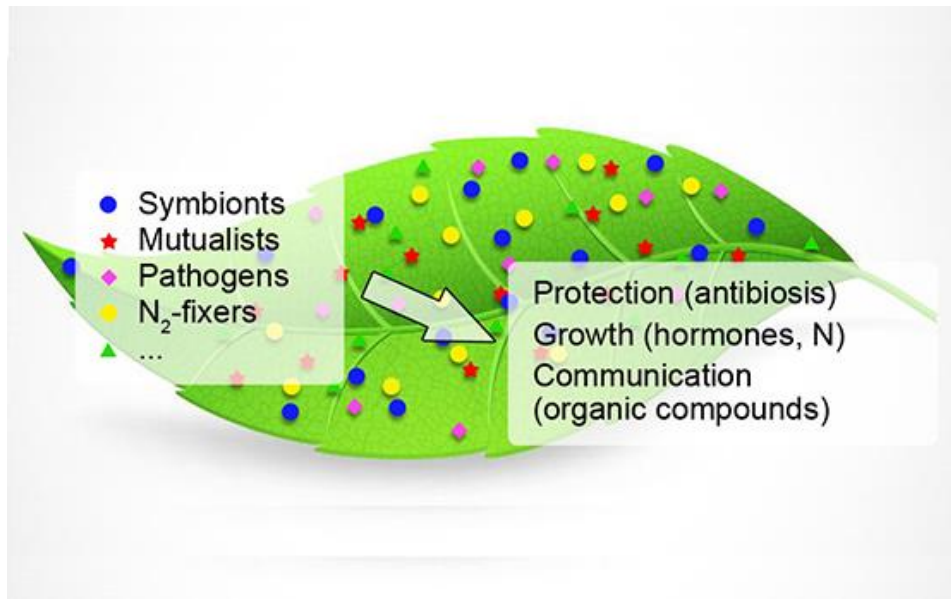
**Figure S1| Impact of *A. euteiches* inoculation on root traits of spring and winter pea cultivars.** Impact of *A. euteiches* inoculation (A) on primary root length (PRL) and (B) on lateral root number (LRN) of spring and winter pea cultivars. Measurements were done on peas inoculated with 0, 15 and 30 oospores of *A. euteiches* per gram of dry substrate (DS) on spring (SP) and winter (WP) pea cultivars, at 10 days post inoculation (dpi). Results are means of 3 independent experiments including 2 replicates per modality  $\pm$  SD. Differences between modalities were compared and analysed using Kruskal-Wallis test (post hoc kruskalmc). Asterisks indicate statistical significance at  $*P < 0.05$ . DS: dry substrate, SP: spring pea cultivar, WP: winter pea cultivar.



**Figure S2| Impact of *A. euteiches* inoculation on aerial traits of spring and winter pea cultivars.** Impact of *A. euteiches* inoculation (A) on main shoot length (MSL) and (B) on leaf node number (LNN) of spring and winter pea cultivars. Measurements were done on peas inoculated with 0, 15 and 30 oospores of *A. euteiches* per gram of dry substrate (DS) on spring (SP) and winter (WP) pea cultivars, at 10 days post inoculation (dpi). Results are means of 3 independent experiments including 2 replicates per modality  $\pm$  SD. Differences between modalities were compared and analysed using Kruskal-Wallis test (post hoc kruskalmc). Asterisks indicate statistical significance at  $*P < 0.05$ . DS: dry substrate, SP: spring pea cultivar, WP: winter pea cultivar.







---

## Chapitre 2

---



## **4.2 Le rôle du microbiome associé à la plante dans la résistance à la pourriture racinaire du pois causée par *Aphanomyces euteiches***

### **4.2.1 Diversité intra-nodules de six variétés de pois : influence des variétés**

Les légumineuses se distinguent par leur capacité à réaliser une symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote. Outre sa fonction première en lien avec la nutrition, cette association peut contribuer à la résistance des plantes aux pathogènes (Elbadry *et al.*, 2006; Siddiqui *et al.*, 2007; Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Les nodules des légumineuses abritent de nombreux autres microorganismes endophytes (Ding *et al.*, 2005 ; Lu *et al.*, 2017) qui peuvent présenter des propriétés de type PGPR et améliorer la résistance des plantes à des maladies (Dudeja *et al.*, 2012; Narula *et al.*, 2013 ; De Meyer *et al.*, 2015). Le microbiome endophyte des nodules de pois apparaît donc comme une composante importante à prendre en considération.

Le but de cette étude est de comparer la diversité et la structure des communautés bactériennes au sein des nodules de 6 cultivars de pois protéagineux, et de rechercher des agents de biocontrôle envers *A. euteiches*. Trois cultivars de pois de printemps et trois d'hiver ont été cultivés en serre sur sol exporté d'une parcelle normande. Les nodules des plantes ont été échantillonnés après un mois de croissance. Un isolement bactérien sur milieu spécifique suivi d'une confrontation à *A. euteiches* a permis d'évaluer le pouvoir biocontrôle *in vitro* des souches endophytes. En parallèle, une analyse métabarcoding a permis d'étudier la diversité et la structure de la communauté bactérienne endophyte globale, mais aussi en ciblant les genres reconnus comme biocontrôle.

Dix-sept souches bactériennes présentant un effet antagoniste *in vitro* envers *A. euteiches* ont pu être isolées, identifiées comme appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus*. En parallèle, les analyses métabarcoding ont permis de mettre en évidence la prédominance chez tous les cultivars de *Rhizobium lusitanum* suivie par *Rhizobium leguminosarum*. Une riche communauté d'endophytes bactériens minoritaire a pu aussi être décrite au sein des nodules, plus abondante chez deux cultivars d'hiver, Dexter et Myster. Un assemblage distinct des genres bactériens à potentiel biocontrôle est observé entre les cultivars. À nouveau, les cultivars Dexter et Myster présentent des abondances relatives plus élevées pour ces genres. L'ensemble de ces résultats soulignent la forte implication du génotype de la plante hôte dans la sélection des microorganismes colonisant les nodules, particulièrement dans l'objectif de façonner les microbiomes au bénéfice de la santé des plantes.

Ce travail est présenté sous forme d'article.



**Co-existence of Rhizobia and non-rhizobial bacteria in the nodules of *Pisum sativum* L. depending on cultivars and influencing mycelium growth of *Aphanomyces euteiches*.**

Lusley P., Gauthier A., Trinsoutrot-Gattin I., Laval K., Bressan M.

AGHYLE unit, UniLaSalle, 3 rue du Tronquet 76130 Mont Saint Aignan

**Aims:** The most reported rhizobacteria species from nodules of *Pisum sativum* is *Rhizobium Leguminosarum* sv. *viciae*, with various possible strains depending on cultivar and environment according to competitiveness. *Rhizobium* strains and nodulation could play an important role in plant resistance to pathogen. Moreover, several other bacterial endophytes have already been described in legume nodules, with possible PGPR abilities. Studying and describing the endophytic microbiome associated with pea nodules of different cultivars appeared necessary for a better comprehension of the entire plant holobiont, that will face to *A. euteiches*, in the context of disease management.

**Method:** Six pea cultivars were grown in greenhouse for thirty days on soil exported from a faba bean field until obtaining active root nodules. Roots were then harvested from those six cultivars. After sterilisation, ten nodules per plant were crushed and sprayed on nitrogen free medium with agar. Isolated strains, selected to reach the highest observed phenotypic diversity, were then confronted to *Aphanomyces euteiches* to evaluate their antagonistic potential. In parallel, total DNA was extracted from other sterilised nodules, for each tested cultivar. A high-throughput sequencing analysis of bacterial 16S rRNA genes was used to examine pea root nodules diversity and structure of the global bacterial community, with a focus on known biocontrol genera.

**Results:** Confrontation tests revealed an *in vitro* biocontrol effect of 17 strains towards *A. euteiches* from *Pseudomonas* and *Bacillus* genera. No antagonistic bacterial isolate could be found from one spring cultivar (LG AURIS). Through high throughput sequencing, The massively predominant species encountered in nodules of all studied pea cultivars was identified as *Rhizobium lusitanum*. As expected, *Rhizobium leguminosarum* was also observed in all cultivars, but to a lesser extent. A small tendency to a higher diversity of other endophytes was observed for the two studied winter cultivars (Myster and Dexter), characterized by stronger cold resistance compared to others. The observed microbiome of the winter cultivar Indiana appeared to be closer to those of spring cultivars. Bacterial genera known as potentially antagonist to *A. euteiches* were shown to be more abundant in winter compared to spring pea



cultivars. The winter cultivar Indiana seemed to present an intermediate assemblage of these biocontrol genera.

**Significance and Impact of the Study:** To our knowledge, this work represents the first case of study of nodule-inhabiting endophytic microbiome from several pea cultivars, with global perspective but also focused on potential biocontrol genera. Some endophytic bacterial isolates showed efficient potentiality to counteract and protect pea against *Aphanomyces euteiches*. Use of these antagonists, through artificial inoculation, could be an interesting clue to limit pathogen incidence. Moreover, selection and recruitment of endophytes by cultivar could represent a promising and complementary tool for pathogen management. The role of endophytic microbiome could also be explored in terms of their implication in the resistance to frost. Again, this work highlighted the importance of considering the plant as an holobiont, with its associated microbiome.

**Keywords:** endophytic microbiome, nodules, pea, *A. euteiches*, biocontrol.

## 1. Introduction

Pea is a valuable crop from Fabaceae family, with numerous food, economic and environmental advantages (Calles, 2016; 2019). Indeed, with their capacity to enter in symbiosis with specific nitrogen-fixing microorganisms (Phillips, 1980; Schulze *et al.*, 1999; Trainer and Charles, 2006; Voisin *et al.*, 2007), Fabaceae crops contribute to the global decrease of input needs and to the reduction of N<sub>2</sub> atmospheric pollution (Maroti and Kondorosi, 2014; Schneider and Huyghe, 2015; Calles, 2016; Stagnari *et al.*, 2017). Plants can coexist with diversified communities of microbial endophytes in all their tissue (Wilson 1995), particularly in roots. Plants provide substrate for their growth but also protection from the competitive high-stressful environment that soil represents (Rosenblueth and Martinez-Romero, 2006). In legume nodules, the best-known inhabitants are constituted by nitrogen-fixing alpha-rhizobia (Alphaproteobacteria, e.g., *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*) and beta-rhizobia (Betaproteobacteria, e.g., *Cupriavidus* and *Burkholderia*) (Gyaneshwar *et al.*, 2011). However, numerous other bacterial species can be found, not only those capable of nodulation but also other free-living nitrogen fixers, or even microorganisms not implicated in nitrogen fixation (Martinez-Hidalgo and Hirsch, 2017). For example, a high diversity of endophytic bacteria was contained in *Dalbergia odorifera* nodules, with 9 major phyla (Firmicutes, Proteobacteria,





Cyanobacteria, etc.) (Lu *et al.*, 2017). Similarly, the presence of 71 bacterial genera was described in *Lespedeza thunbergii* nodules (Busby *et al.*, 2016) and 8 in *Vigna radiata* (Pandya *et al.*, 2013). In pea nodules, the main classically described nitrogen-fixing bacterial partners is *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* (Rlv), with different host range between Rlv strains within the *Viciae* tribe (Laguerre *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2015; Peix *et al.*, 2015). The pea capacity to host different Rlv strains was shown to be dependent on the sampled area (Lie, 1978; Young and Matthews, 1982) and of considered cultivar (Bourion *et al.*, 2018). Besides symbiosis with nitrogen-fixing bacteria, a rich diversity of other endophytes can coexist in pea nodules.

Pea is the most susceptible legume to a soilborne pathogen, *Aphanomyces euteiches*, leading to the prejudicial root rot, with no efficient treatment available. A promising clue relies on the development of biological control, based on natural mechanisms. Besides its capacity to provide nitrogen, nodule microbiome can play other roles, and be especially implicated in plant protection against some soilborne pathogens. A possible interconnexion between nodulation and disease resistance had already been highlighted in *Medicago truncatula*. Indeed, a Lys-M receptor protein involved in symbiont perception can also play a role in defence against pathogens, as *A. euteiches* (Rey *et al.*, 2013). Moreover, numerous endophytes found in plant roots and nodules were known to present interesting PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) abilities, supporting plant growth and nutrition, but also beneficial to plant health. Some endophytic species contribute to enhanced protection against pathogens, for example through plant defence induction, antibiotics production or niche colonization competition (Berg and Hallmann, 2006; Kloepper and Ryu, 2006; Chung *et al.*, 2011; Dudeja *et al.*, 2012).

So, the aim of this study was to investigate the potential contribution of the nodule microbiome in pea resistance to *A. euteiches*. The diversity and structure of the nodule microbiome were explored through two complementary approaches : 1) isolation of bacterial strains from nodules and characterization of their antagonistic potential towards *A. euteiches* and 2) a metabarcoding approach through high throughput sequencing of the bacterial endophytic community associated with nodules to explore the global assemblage with a particular interest on known bacterial biocontrol genera. Nodule microbiome of several pea cultivars were indeed compared to assess the role of cultivar to the recruitment of endophytic beneficial populations.



## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental Design

Rhizospheric soil was exported from a field localized in Normandy (Marques, Seine-Maritime) (49.78131,1.68031), cultivated with faba bean, in May 2018. Sixty pots (9\*9\*9 cm) were filled with 400 g of 5 mm-sieved homogenized soil. Water was poured in soil to reach 80% of water retention capacity. Six pea cultivars, 3 from spring pea group (SP1 = Aurélia, SP2 = Avenger, SP3 = LG AURIS) and 3 from winter pea group (WP1 = Dexter, WP2 = Myster, WP3 = Indiana) were transplanted in pots after 4 days of germination in controlled conditions (24°C, 16 h light and 8 h dark) in sterile microboxes (OV80 - OVD80, SacO<sub>2</sub>). Ten repetitions of each cultivars were processed: each pot receiving one seedling. Pea plants were grown in greenhouses for one month (from May to June 2018) at 24°C, with 60% hygrometry. Roots with nodules of each cultivar were cut, rinsed with an ethanol solution 96% during few seconds and stocked in a 20% glycerol solution at - 80°C until use (Rangin *et al.*, 2008).

### 2.2. Endophytes extraction

#### 2.2.1. Nodule sterilization

Ten nodules per plant of each cultivar were cut and rinsed in a 70% ethanol during 1 min following by incubation with 30% hydrogen peroxide during 3 min and were rinsed five times with sterile water (Borges *et al.*, 2016).

#### 2.2.2. Isolation of bacteria from nodules

For each pea cultivar, ten sterilized nodules, harvested from one plant, were pooled, and crushed in 1 ml of yeast mannitol broth (YMB). This step was repeated on 3 different plants per cultivar. For each repetition, 150 µL were spread on 3 different petri dishes with YMB agar. After 48 hours at 30°C, selected isolates (based on the most important visual phenotypical diversity) were purified and stocked at -80°C in a 20% glycerol solution added with YMB (Rangin *et al.*, 2008).

### 2.3. Screening of antagonistic bacterial isolates against *Aphanomyces euteiches*

#### 2.3.1. Culture of *Aphanomyces euteiches*

*Aphanomyces euteiches* isolate Ae84, provided by Terres Inovia (Rennes, France), strain originally isolated from infected pea, was used as the French reference of *A. euteiches* isolates (Wicker, 2001). Ae84 strain was maintained on potato dextrose agar (PDA) plates in darkness



at 8 °C for long-term storage and regularly re-inoculated in plants after each 3<sup>rd</sup> sub-culture to maintain virulence. Screening of potential biocontrol were realized with a 2<sup>nd</sup> sub-culture of *A. euteiches*.

### 2.3.2. Screening test

All strains purified and stocked from nodules were tested for their ability to reduce mycelium growth of *A. euteiches*. Four droplets (1 µL) of 48 h bacterial culture (LB medium) were poured at 2.5 cm to frame an *Aphanomyces euteiches* plug (5mm diameter, placed at the centre of the Petri dish) on PDA medium. All strains able of halting mycelium growth after 10 days were further classed as potential biocontrol bacterial isolates.

### 2.3.3. Identification of bacterial isolates with antagonistic effect towards *A. euteiches*

All isolates were grown in liquid YMB medium during 48 hours at 30°C with an agitation at 130 rpm. Liquid bacterial cultures were then stocked at -20°C for 24 hours and extemporaneously heated at 60°C for cell lysis. Isolates were identified based on nucleotide sequence data from 16S rDNA. PCR amplifications for all isolates were carried out with 2 µL of each bacteria culture, 1 µM of each primer [63f 5'- CAGGCCTAACA CATGCAAGTC -3' (Marchesi *et al.*, 1998) and BU16S4 5'CTGCTGCCTCCCGTAGG-3'] derived from 341F (Muyzer *et al.*, 1993), 25 µL of GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) in the GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). Amplification protocol was 2 min at 94°C, followed by 35 cycles 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 1 min at 72°C. A final extension step was carried out at 72 °C for 7 min. All PCR products were visualized by electrophoresis on agarose gel stained with ethidium bromide. PCR products were then sequenced by Genoscreen (Lille, France).

### 2.4. Metabarcoding analysis through high throughput sequencing

Total DNA was extracted from 0.250 g of nodules for each cultivar and each repetition (3 repetition per cultivar) using Fast DNA spin Kit for Soil (MP-Biomedicals, , USA) according to manufacturer's procedure. Nodule DNA concentration was assessed by fluorimetry using the Fluorescent DNA quantitation Kit Hoechst 33258 (Biorad, Hercules, USA), following the manufacturer's instructions. The DNA solutions were stored at -20°C until use. Three repetitions of nodule DNA extractions were extracted for all studied cultivar. Bacterial 16S rDNA amplifications, made in duplicate for each cultivar samples and pooled for further analysis, amplicons library, Illumina MiSeq sequencing (2 × 300-bp paired-end reads) and



bioinformatics analyses were also performed by Biofidal (Vaulx-en-Velin, France - <http://www.biofidal-lab.com>). Negative controls were included during the library preparation. Briefly, paired-end sequence reads were collapsed into so-called pseudoreads using sequence overlap with USEARCH version 9.2 (Edgar, 2010). A total of 2 342 875 pseudoreads for bacteria, were obtained from 18 samples. Classification of these pseudoreads was performed based on the results of alignment with SNAP version 1.0.23 (Zaharia *et al.*, 2011) against the RDP database (Cole *et al.*, 2014) for bacterial organisms.

### 2.5. Statistical analysis

All tests were performed with R software version 3.4.1 (R Development Core Team 2004) and statistical significance was set at  $P < 0.05$ . For microbiome analysis, Shannon (function “Shannon”), Pielou evenness (calculated as Shannon index / log (Richness index)) and Richness (representing the total number of OTUs) indices were calculated with the R package Vegan. Comparisons of microbial diversity and richness indices, relative abundance of each microbial phylum and relative abundance of known antagonistic microbial genera were performed using a non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by post-hoc test with `kruskalmc` function, using the R package “`pgirmess`”. PCA analysis was used to compare total nodule microbiomes associated with the 6 cultivars and genera known for their potential biocontrol activity against *A. euteiches* with the R package “`ade4`”. The heatmap concerning the abundance of known biocontrol genera was generated with the `heatmap` function.

## 3. Results

### 3.1. Biocontrol bacterial isolates

The screening test revealed 17 strains with effective *in vitro* antagonistic activity against *A. euteiches*. Within 95 strains isolated from nodules of all cultivars, 5 (45%) antagonistic bacterial isolates were found from Dexter nodules (WP1), 4 (25%) antagonistic bacteria were found from Aurelia nodules (SP1), 3 (21%) antagonistic bacteria were found from Myster nodules (WP2), 3 (16%) from Avenger nodules (SP2) and 2 (12%) antagonistic bacteria were found from Indiana nodules (WP3) (Table 1). No antagonistic bacteria were found from LG AURIS nodules (SP3). The molecular 16S identification revealed that all these bacterial antagonists belonged to the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera. Antagonists isolated were two *Bacillus* sp., one *Bacillus licheniformis*, two *Pseudomonas* sp. from Dexter; one *Bacillus* sp., one *B. licheniformis* and one *Bacillus pumilus* from Myster; one *Bacillus* sp from Indiana; four





*Bacillus* sp. from Aurélia; two *Bacillus* sp., and one *B. pumilus* from Avenger.

Table 1: Classification of bacterial strains, isolated from 10 pooled nodules from one plant, repeated 3 times for each cultivar, according to their biocontrol abilities toward *A. euteiches*. The biocontrol potential was evaluated after 10 days of culture by confrontation test by 4 deposits at 2.5 cm from the 5-mm *A. euteiches* plug at the centre of the plate and. Biocontrol abilities were classified into 3 categories: no effect (overlapping of bacterial colony by the mycelium), repulsive effect (circumvent of bacterial colony by the mycelium) and antagonist (inhibition of mycelial growth).

Group	Cultivar	Effect of bacteria on <i>A. euteiches</i>		
		Antagonist	Repulsive	No effect
Spring Pea	Aurélia	4	3	9
	Avenger	3	1	15
	LG AURIS	0	0	18
Winter Pea	Dexter	5	0	6
	Myster	3	0	11
	Indiana	2	1	14

### 3.2. Comparison of nodule microbiomes of the six tested pea cultivars

#### 3.2.1. Diversity and evenness indices

All OTUs sequences were assigned at different taxonomic levels (phylum, class, order, family, genus, and species). Bacterial communities were evaluated using richness and diversity indices (Table 2). No significant differences were found among cultivar for all calculated indices of structure and diversity (OTUs richness, diversity using Shannon index and evenness using Pielou index). As expected, nodule microbiome was characterized by poor evenness, because of the dominance of one species. However, Myster (WP1) and Dexter (WP2) tended to host a richer and more diversified bacterial endophytic community, with the highest values for Shannon indices and OTUs richness (respectively 311 and 321 OTUs on average).

Table 2: Bacterial diversity and richness indices for the 6 pea cultivars. Means were calculated from three replicates per cultivar. Standard deviations are indicated in parentheses. Significant differences among cultivars are indicated by different letters at  $P < 0.05$ , using kruskalmc test (package pgimess, R).



Group	Cultivar	Shannon	Richness		Pielou	
		Mean ( $\pm$ sd)		Mean ( $\pm$ sd)	Mean ( $\pm$ sd)	
Spring Pea	Aurélia	0.36 ( $\pm$ 0.06)	<i>a</i>	213 ( $\pm$ 33)	<i>a</i>	0.067 ( $\pm$ 0.009) <i>a</i>
	Avenger	0.41 ( $\pm$ 0.01)	<i>a</i>	258 ( $\pm$ 9)	<i>a</i>	0.074 ( $\pm$ 0.002) <i>a</i>
	LG AURIS	0.39 ( $\pm$ 0.10)	<i>a</i>	205 ( $\pm$ 72)	<i>a</i>	0.073 ( $\pm$ 0.015) <i>a</i>
Winter Pea	Dexter	0.54 ( $\pm$ 0.30)	<i>a</i>	311 ( $\pm$ 144)	<i>a</i>	0.093 ( $\pm$ 0.045) <i>a</i>
	Myster	0.51 ( $\pm$ 0.04)	<i>a</i>	321 ( $\pm$ 42)	<i>a</i>	0.088 ( $\pm$ 0.006) <i>a</i>
	Indiana	0.35 ( $\pm$ 0.03)	<i>a</i>	213 ( $\pm$ 30)	<i>a</i>	0.064 ( $\pm$ 0.006) <i>a</i>

### 3.2.2. OTUs from *Rhizobium* genera

As expected, all cultivar nodules harboured two majority *Rhizobium* species: *Rhizobium lusitanum*, with a relative abundance of 96.2 %, 95.6 %, 96 %, 93.6 %, 94.2 % and 96.1 % and *Rhizobium leguminosarum*, with a relative abundance of 1.6 %, 1.5 %, 1.6 %, 2.4 %, 1.8 %, respectively for Aurélia (SP1), Avenger (SP2), LG AURIS (SP3), Dexter (WP1), Myster (WP2) and Indiana (WP3). The abundance of other minority *Rhizobium* species (except the 2 predominant species) was comprised from 1.06 % (LG AURIS, SP3) to 2.02 % (Dexter, WP1), with 25 to 29 different *Rhizobium* OTUs (Table 3). OTUs from the *Rhizobium* genus represented only about 12% (from 9 to 14%) of all detected OTUs (data not shown) but constituted 98.5 % (from 97.5 % to 99.5 %) of the nodule microbiome in terms of bacterial abundance.

Table 3: Relative abundance levels of *Rhizobium* species and bacterial phyla for each pea cultivar. Means were calculated from three replicates per cultivar. Standard deviation is indicated in parentheses. Significant differences among cultivars are indicated by different letters at  $P < 0.05$ , using a kruskalmc test (package pgirmess, R).

Group	Cultivar	Number of total OTUs	Relative abundance (%) of major <i>Rhizobium</i> species (> 1%)		Relative abundance (%) of minor <i>Rhizobium</i> species (<1%)	Relative abundance (%) of Proteobacteria except <i>Rhizobium</i> genus	Relative abundance (%) of 19 other phyla	
			<i>Rhizobium lusitanum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>				
Spring Pea	Aurélia	212 ( $\pm$ 33)	<i>a</i>	96.2 ( $\pm$ 0.7) <i>a</i>	1.6 ( $\pm$ 0.1) <i>a</i>	1.07 ( $\pm$ 0.14) <i>a</i>	1.11 ( $\pm$ 0.47) <i>a</i>	0.10 ( $\pm$ 0.05) <i>a</i>
	Avenger	257 ( $\pm$ 9)	<i>a</i>	95.6 ( $\pm$ 0.2) <i>a</i>	1.5 ( $\pm$ 0.1) <i>a</i>	1.09 ( $\pm$ 0.05) <i>a</i>	1.64 ( $\pm$ 0.27) <i>a</i>	0.13 ( $\pm$ 0.04) <i>a</i>
	LG AURIS	204 ( $\pm$ 72)	<i>a</i>	96.0 ( $\pm$ 0.9) <i>a</i>	1.6 ( $\pm$ 0.1) <i>a</i>	1.06 ( $\pm$ 0.04) <i>a</i>	1.25 ( $\pm$ 0.78) <i>a</i>	0.09 ( $\pm$ 0.06) <i>a</i>
Winter Pea	Dexter	310 ( $\pm$ 144)	<i>a</i>	93.6 ( $\pm$ 4.8) <i>a</i>	2.4 ( $\pm$ 1.6) <i>a</i>	2.02 ( $\pm$ 1.49) <i>a</i>	1.67 ( $\pm$ 1.45) <i>a</i>	0.29 ( $\pm$ 0.28) <i>a</i>
	Myster	320 ( $\pm$ 42)	<i>a</i>	94.2 ( $\pm$ 0.8) <i>a</i>	1.8 ( $\pm$ 0.5) <i>a</i>	1.50 ( $\pm$ 0.52) <i>a</i>	2.35 ( $\pm$ 0.83) <i>a</i>	0.22 ( $\pm$ 0.10) <i>a</i>
	Indiana	212 ( $\pm$ 30)	<i>a</i>	96.1 ( $\pm$ 0.6) <i>a</i>	1.7 ( $\pm$ 0.3) <i>a</i>	1.18 ( $\pm$ 0.23) <i>a</i>	0.94 ( $\pm$ 0.34) <i>a</i>	0.09 ( $\pm$ 0.02) <i>a</i>



### 3.2.3. Minor phyla

The cumulative relative abundance of OTUs from *Proteobacteria* phylum except *Rhizobium* genus were 1.11 %, 1.64 %, 1.25 %, 1.67 %, 2.35 %, 0.94 % respectively for Aurélia (SP1), Avenger (SP2), LG AURIS (SP3), Dexter (WP1), Myster (WP2) and Indiana (WP3). The highest value was observed for Myster (WP2) and the lowest for Indiana (WP3) (Table 3). *Proteobacteria* phylum (except *Rhizobium* genus) was mainly composed of *Betaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria* with the highest cumulative relative abundance for Myster (WP2) (Figure 1).

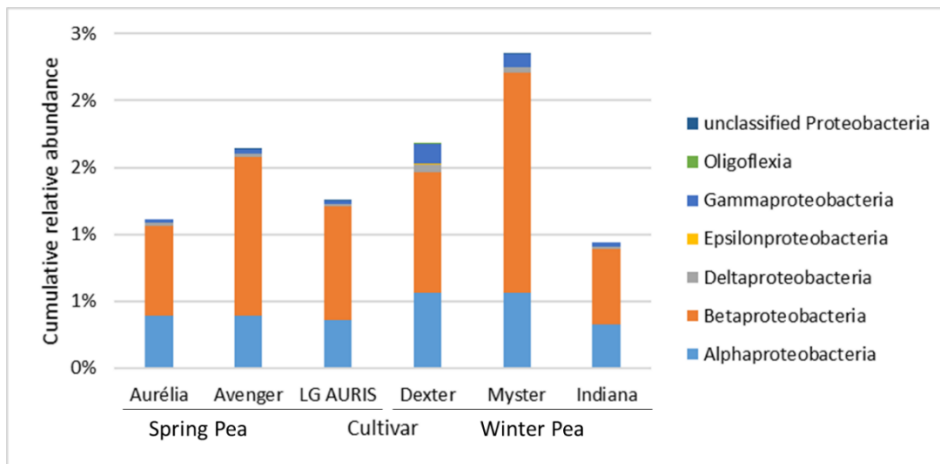


Figure 1: Relative abundance levels of each class in *Proteobacteria* phylum (except *Rhizobium* genus) for each cultivar, WP: Winter Pea; SP: Spring Pea.

Nineteen other bacterial phyla were observed, with a cumulative relative abundance from 0.09% (LG AURIS, SP3) to 0.28% (Dexter, WP1) (Table 3). In those 19 phyla, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia and Firmcutes showed a relative abundance superior to 0.1 % (Figure 2). For those very minority phyla, the two winter cultivars Dexter (WP1) and Myster (WP2) presented a higher cumulative relative abundance than other cultivars. The PCA analysis of the global nodule microbiome showed that all 6 cultivars constituted a global unique group on the PCA plot (Figure 3). However, Dexter (WP1) and Myster (WP2) tend to be more apart, with a higher observed variability between replicates.



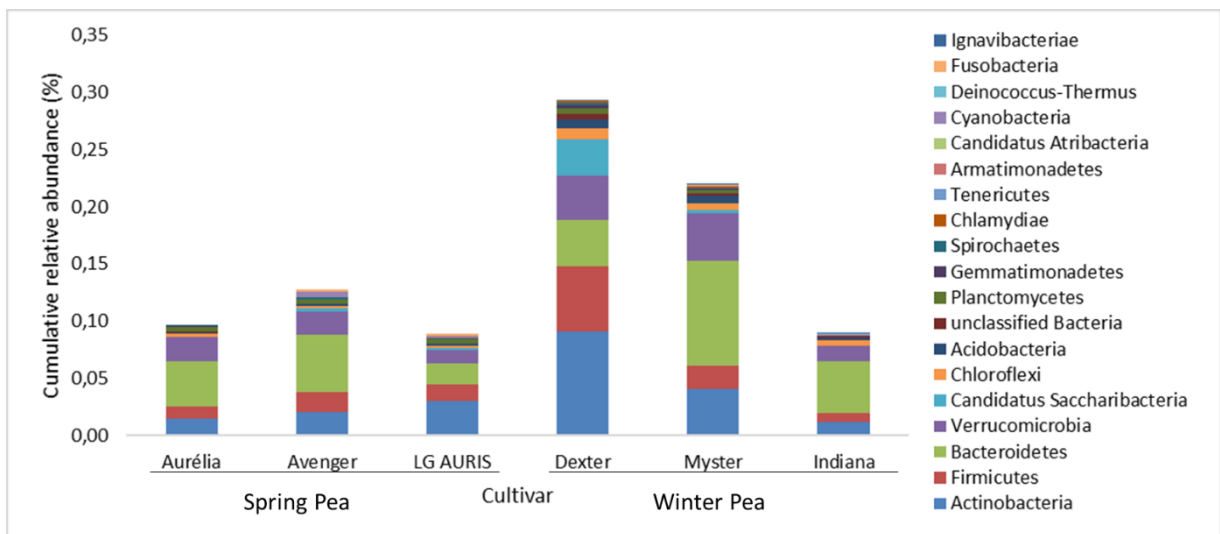


Figure 2: Relative abundance levels of each phylum (except Proteobacteria) for each cultivar.

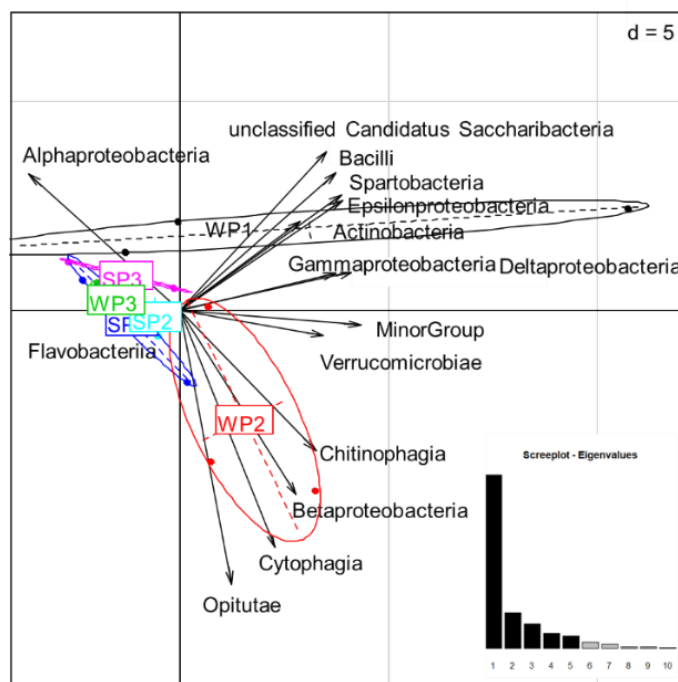


Figure 3: Principal component analysis of six pea cultivars, three winter pea cultivars called WP1, WP2 and WP3 (WP1 = Dexter, WP2 = Myster, and WP3 = Indiana) and three spring cultivars (SP1 = Aurélia, SP2 = Avenger, SP3 = LG AURIS) generated from bacterial class matrix of 16S RNA relative abundance levels. Percentage of explained variance: axis 1 = 56.8 %, axis 2 = 18.8 %.





Several bacterial genera have already been described as antagonistic towards *A. euteiches* (Table 4). From the described biocontrol genera focus, a heatmap analysis showed contrasted relative abundance of bacterial biocontrol genera with higher relative abundance observed for Dexter (WP1) and Myster (WP2) compared to the other cultivars (Figure 4). The third winter cultivar, Indiana, showed an intermediate pattern. The springs cultivars (SP1, SP2 and SP3) presented smaller relative abundance of biocontrol genera (Figure 4).

Table 4: Relative abundance levels of bacterial genus known as biocontrol. Means were calculated from three replicates per cultivar. Standard deviation is indicated in parentheses. No significant difference was seen among cultivars for each genus. Kruskalmc test was used (package pgirmess, R).

Antagonistic bacteria (genus)	Spring Pea			Winter Pea			References
	Aurélia	Avenger	LG AURIS	Dexter	Myster	Indiana	
Acinetobacter	4.72e-06 (±8.17e-06)	2.29e-06 (±3.96e-06)	6.56e-06 (±1.14e-05)	3.08e-05 (±5.34e-05)	1.48e-05 (±2.56e-05)	nd	Lusley <i>et al.</i> , (in preparation)
Achromobacter	nd	nd	nd	6.16e-06 (±1.07e-05)	nd	2.87e-06 (±4.97e-06)	Godebo <i>et al.</i> (2020)
Arthrobacter	nd	nd	nd	nd	nd	2.98e-06 (±5.16e-06)	Godebo <i>et al.</i> (2020)
Bacillus	4.72e-06 (±8.17e-06)	4.33e-05 (±1.41e-05)	6.84e-05 (±6.46e-05)	2.48e-04 (±1.88e-04)	5.03e-05 (±2.82e-05)	2.66e-05 (±2.35e-05)	Godebo <i>et al.</i> (2020) & Wakelin <i>et al.</i> (2002)
Bacterium	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Godebo <i>et al.</i> (2020)
Brevibacillus	nd	nd	nd	nd	9.86e-06 (±1.71e-05)	nd	Godebo <i>et al.</i> (2020)
Burkholderia	nd	nd	2.84e-06 (±4.91e-06)	6.20e-06 (±5.51e-06)	3.04e-06 (±5.27e-06)	nd	Heungens & Parke (2000)
Flavobacterium	9.09e-05 (±5.96e-05)	9.19e-05 (±1.64e-05)	3.68e-05 (±2.71e-05)	6.00e-05 (±7.78e-05)	1.82e-04 (±1.38e-05)	1.90e-04 (±4.65e-05)	Godebo <i>et al.</i> (2020)
Lysobacter	1.37e-05 (±2.37e-05)	3.15e-05 (±2.07e-05)	6.56e-06 (±1.14e-05)	3.00e-05 (±3.89e-05)	9.59e-05 (±9.38e-05)	1.76e-05 (±1.79e-05)	Godebo <i>et al.</i> (2020)
Microbacterium	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Godebo <i>et al.</i> (2020)
Paenibacillus	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Godebo <i>et al.</i> (2020) & Wakelin <i>et al.</i> (2002)
Pantoea	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Godebo <i>et al.</i> (2020)
Pedobacterium	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Godebo <i>et al.</i> (2020)
Pseudomonas	3.42e-06 (±5.93e-06)	4.57e-06 (±7.92e-06)	1.07e-05 (±9.32e-06)	7.75e-05 (±1.09e-04)	8.66e-05 (±6.51e-05)	3.71e-05 (±3.63e-05)	Godebo <i>et al.</i> (2020)
Rhizobium	0.9879 (±0.0049)	0.9823 (±0.0025)	0.9865 (±0.0081)	0.9803 (±0.0171)	0.9743 (±0.0087)	0.9896 (±0.0034)	Godebo <i>et al.</i> (2020)
Serratia				2.46e-05 (±2.28e-05)			Godebo <i>et al.</i> (2020)
Stenotrophomonas	2.36e-06 (±4.08e-06)	2.29e-06 (±3.96e-06)	nd	2.20e-05 (±3.94e-05)	1.41e-05 (±1.37e-05)	2.87e-06 (±4.97e-06)	Godebo <i>et al.</i> (2020)
Streptomyces	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Godebo <i>et al.</i> 2020
Variovorax	7.59e-05 (±3.80e-05)	7.88e-05 (±2.93e-05)	1.13e-04 (±9.67e-05)	1.19e-04 (±8.08e-05)	1.59e-04 (±6.21e-05)	4.18e-05 (±2.45e-05)	Godebo <i>et al.</i> 2020



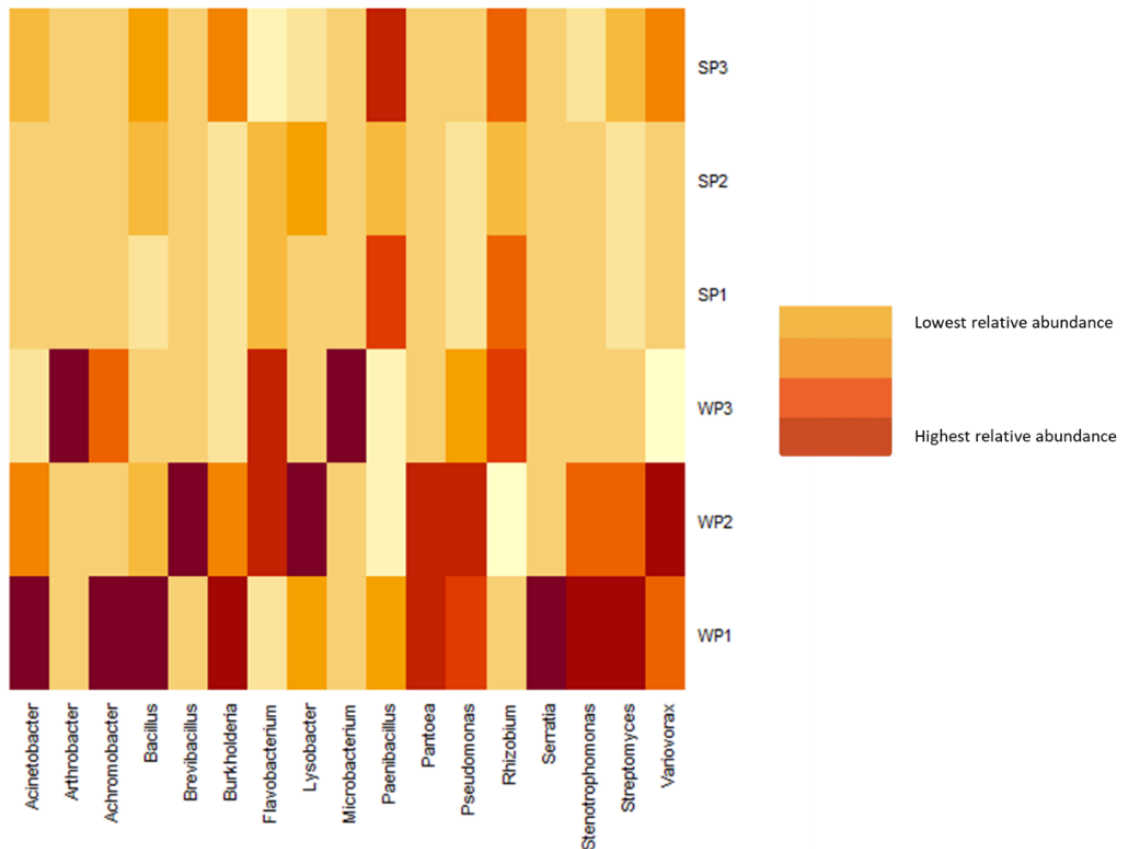


Figure 4: Heatmap comparison of the relative abundance levels of known biocontrol bacterial genera recovered in the OTUs database. The six pea cultivars were classified based on the UPGMA dendrogram obtained using the heatmap function in R. Each column is a variable and each observation is a row. The closer to dark color the square is, the higher the relative abundance level is. SP: Spring Pea (SP1 = Aurélie; SP2 = Avenger; SP3 = LG AURIS) Winter Pea (WP1 = Dexter; WP2 = Myster; WP3 = Indiana).

#### 4. Discussion

The interest of finding biocontrol agents based on biological mechanisms is determinant to control diseases with strong impasse of treatments, such as pea root rot. The aim of this study was to evaluate the contribution of nodule microbiome as a possible important weaponry against *A. euteiches* and as a rich source of microbial antagonists. Moreover, the comparison of nodule microbiome hosted by several pea cultivar nodules, cultivated on the same initial soil, allowed to assess the power of recruitment of beneficial endophytes linked to varietal specificity, as another way for disease management.



#### 4.1. Identification of potential biocontrol agents against *A. euteiches* isolated from pea nodules

Numerous microbial strains were already described in the literature for their *in vitro* and/or *in vivo* antagonistic action against *A. euteiches*, generally with an observed decrease of mycelium growth and/or an impact on oospores production or germination (Bowers and Parke 1993; Heungens and Parke 2001; Wakelin *et al.*, 2002; Xue 2002; 2003; Thygesen *et al.*, 2004; Prashar and Vandenberg 2017). For several pathosystems, the use of nitrogen-fixing *Rhizobium* species as biocontrol agents appeared to be pertinent for disease management (Özkoç and Deliveli 2001; Chandra *et al.*, 2007; Siddiqui *et al.*, 2007). Bardin *et al.* (2004) showed that strains of *R. leguminosarum* bv. *viciae*, besides classical interest as biofertilizer linked to nitrogen fixation presented a clear potential to control *Pythium* damping-off of pea in fields. Isolation of rhizobial strains from pea nodules and evaluation of their antagonistic potential can represent a new solution for pea protection. The aim of the study was to obtain a panel of bacterial agents, locally adapted to the soil-climate context of Normandy and to each tested cultivar. Indeed, the efficiency of biocontrol solution based on microbial agents rely most of the time on the effective colonization of rhizosphere or plant by the microorganisms (Pliego *et al.*, 2011). In these competitive niches, the successful implementation of microbial agent could be facilitated by a strong local adaptation to the target ecosystem. Among all bacterial isolates from nodule, 17 bacterial strains showed an antagonistic effect towards *A. euteiches* from 5 pea cultivars out of 6. Surprisingly, none of the *Rhizobium* strains isolated here from pea nodules were able to impact *A. euteiches* development. Interestingly, antagonistic isolates were identified as belonging to *Pseudomonas* and *Bacillus* genera. Pea nodules harbored not only nitrogen-fixing symbiont but also a rich community of bacterial endophytes (Narula *et al.*, 2013). The emphasis was so finally extended to the global microbiome retrieved in this specific niche. These endophytes can carry out interesting abilities towards legume health (Dudeja *et al.*, 2012). Strains of several genera, already described within nodule microbiome, are indeed known to be antagonist to *A. euteiches* (Heungens & Parke 2000; Wakelin *et al.*, 2002; Godebo *et al.*, 2020), particularly *Pseudomonas* and *Bacillus* (Santoyo *et al.*, 2012). Moreover, these two bacterial genera are known for their high ability to colonize plant internal tissues (Sturz *et al.*, 2000). This work represents the first isolation of potential biocontrol microbial agent against *A. euteiches* from nodules and demonstrated the importance of cultivar to influence microorganisms' recruitment in pea nodules. In fact, nodule microbiome appeared to be a non-negligible component of plant defensive shield. However, the principal resultant of a severe attack by *A. euteiches* is deep damages of the pea root system, embedded nodule formation.



By extension, the associated helpful microbiome would be also seriously destabilized. This consequence contributes even to more severe symptoms due to plant nitrogen input deprivation. Boosting nodule formation and so interaction with beneficial endophytes, with inoculation of *Rhizobium* strains or other antagonist, could be a promising tool for protection towards soilborne pathogens at the early pea growth stages. Indeed, addition of a *Rhizobium* strain on chickpea field promotes a significative nodule formation, with both advantages for growth and final yield but also an observed limitation of symptoms severity caused by the pathogenic consortium between the nematode *Meloidogyne incognita* and the fungus *Macrophomina phaseolina* (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Similarly, Siddiqui and Mahmood (1995) showed that a *Bradyrhizobium japonicum* treatment, alone or combined with PGPR, on *Cajanus cajan* increased the global biomass of plant and the number of nodules, as well as reduced the multiplication of the pathogenic nematode *Heterodera cajani* and incidence of the fungi *Fusarium udum*, both causing problematic wilt.

Several mechanisms of action could be supposed here to support antagonisms of the screened nodule endophytes towards *A. euteiches*. Numerous *Pseudomonas* strains can produce a wide variety of well-known secondary metabolites, with antimicrobial properties on soilborne plant pathogens (Weller, 2007). Similarly, *Bacillus* strains can also produce such bioactive metabolites (Fira *et al.*, 2018). Moreover, among the different action mechanisms suggested, particularly in the case of endophytic partners, a higher competitive ability to colonize plant tissues and use nutrients could also be determining (Sturz *et al.*, 2000). Deeper analyses will be now necessary to elucidate the action mode of these strains as well as to evaluate the actual potential to protect pea.

#### 4.2. Diversity of nodule microbiome and varietal determinism

In this study, bacterial communities from root nodules of six pea cultivars were assessed using a metabarcoding approach. Plant genotypes are known to shape and strictly select endophytic microbial community closed associated in their tissues, principally in relation to differences in root architecture and types of exudates (Berendsen *et al.*, 2012; Philippot *et al.*, 2013). Microorganisms capacity and competitiveness to enter and colonize inner plant tissues constitute also an important factor conditioning composition of this specific microbial community (Rossmann *et al.*, 2017). Most studies on microbe inhabiting nodules of pea focused on the nitrogen-fixing symbiont. However, some works described the diversity of all existing endophytic bacteria. Narula *et al.*, (2013) reported 17 different bacterial genotypes co-existing in pea nodules harvested from fields. Presence of firmicutes, such as members of *Bacillus*





genus, were found in pea nodules as it was shown in nodules of other plant species (Xu *et al.*, 2014, Zhao *et al.*, 2011) such as Actinobacteria, Micromonospora and Streptomyces (Martinez-Hidalgo *et al.*, 2014; Sreevidya *et al.*, 2016).

To our knowledge, this is the first time that total bacterial endophytic community in nodules of different pea cultivar were characterised through this method. As expected, the most represented phylum in nodules was Proteobacteria and particularly Alphaproteobacteria. The predominant species was *Rhizobium lusitanum*, followed in a lesser extent by *Rhizobium leguminosarum*, both known as nitrogen-fixing partners of legumes. *R. leguminosarum* is the most famous and studied nitrogen-fixing bacteria, generally described as the specific partners of pea (Meade *et al.*, 1985; Jensen, 1987; Laguerre *et al.*, 2003). However, other species from the *Rhizobium* genus had already been shown to nodulate with *Pisum sativum* as *R. laguerreae* or *R. trifolii* (Johnston and Beringer, 1976; Martínez-Molina *et al.*, 2016). This work constitutes the first description of a symbiotic association between pea and *R. lusitanum*, generally described as rather nodulating with bean (*Phaseolus vulgaris*) (Valverde *et al.*, 2011). This bacterial species is nevertheless not so far genetically from *R. leguminosarum* (Riah, 2014). Several assumptions could be assumed for the massive colonization of *R. lusitanum* in pea nodules here. The first hypothesis is that *R. lusitanum* was initially more abundant in the soil used for the experiment. Competitiveness and success of establishment in nodules begin with achievement of soil colonization (Laguerre *et al.*, 2003). In our context, *R. lusitanum* could be more competitive to form and colonize nodules of the studied pea cultivars compared to other *Rhizobium* species or strains. Variation in competitiveness to colonize nodules had already be described for strains of *Rhizobium leguminosarum* *sv viciae* in pea (Bourion *et al.*, 2018). Moreover, nitrogen-fixing bacterial strains associated with nodules of legumes have been shown to be dependent on various factors such as sampling region or legume varieties (Kneen and Larue, 1984; Vásquez-Arroyo *et al.* 1998; Krasova-Wade *et al.* 2003; Guimarães *et al.* 2012; Bourion *et al.*, 2018). Assessment of the total bacterial community of initial soil to compare the relative abundance of these two *Rhizobium* species could be interesting. Another possible explanation is that *R. leguminosarum* contribution in pea nodules could be overestimated due to a higher ability to be isolated on artificial medium through culturable approach. The advent of high throughput sequencing is revolutionary to explore nodule microbiome. Two winter pea cultivars (Dexter and Myster) tended to present slight lower relative abundance of *R. lusitanum*, balanced with a slightly higher abundance of *R. leguminosarum*. These two cultivars seemed to favor *R. leguminosarum* compared to other



cultivars. Deeper exploration of the competitive forces between *Rhizobium* strains according to pea cultivars could be interesting to conduct.

Following Alphaproteobacteria, non-nodulating Betaproteobacteria appeared to be quite well present in pea nodules. Out of Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes and Verrucomicrobia were the most represented bacteria among minor phyla, with varying abundance according to cultivars. Some studies describing bacterial communities found in nodules reported similar presence of these groups (Leite *et al.*, 2017, Lu *et al.*, 2017 ; Martínez-Hidalgo and Hirsch 2017). Although bacterial endophytes are generally considered as a subset of the microbial pool found in the rhizospheric soils or in the rhizoplanes (Germida *et al.*, 1998; Marquez-Santacruz *et al.*, 2010), disentangling the origin of the rich endophytic community in nodules of legumes still requires in-depth investigation (Compant *et al.*, 2016).

While three spring and one winter cultivars presented similar bacterial endophytic communities, those associated with Dexter and Myster tended to be tenuously distinct. Interestingly, these two winter cultivars seemed to host a slightly higher cumulated abundance of non-*Rhizobium* endophytes. Similarly, Sharaf *et al.* (2019) described an unprecedented diversity of non-rhizobia endophytes in soybean nodules, with observed variation across cultivars. The patterns observed in this study seemed to be only linked to host genotype. Dexter and Myster, with a higher proportion of these endophytes, were also characterized by a higher resistance to cold, contrary to the winter cultivar Indiana, with low cold resistance, closed to spring pea cultivars. This specificity could also be due to difference in rhizodeposition or root architecture. Understanding the driving forces conditioning the recruitment and the assemblage of endophytes, as well as deciphering their functional role in nodules constitute an important challenge for holistic comprehension of legumes and possible valuation of plant-microorganisms interactions at plant benefits (Compant *et al.*, 2016). Particularly, the implication of nodule microbiome to sustain plant health, interlinked with cultivar choice could be a relevant tool for disease management.

#### 4.3. Cultivar incidence on beneficial bacterial assemblage

The global role of non-rhizobia populations in legume nodules is not fully understood (Sharma *et al.*, 2005; Martínez-Hidalgo and Hirsch 2017), although some benefits conferred by these internal microorganisms could be highlighted. Indeed, some microbial endophytes could present interesting PGPR functions towards plants (Compant *et al.*, 2016). Some of them can promote plant growth directly but also through biocontrol abilities to reduce pathogen incidence



(Sturz *et al.*, 2000; Dudeja *et al.*, 2012; Compant *et al.*, 2016). These beneficial assemblages are probably under the influence of several factors. As described previously, host genotype appeared to be a strong driving force of the diversity and global organization of nodule microbiome, and so on the recruitment of beneficial partners.

Seventeen bacterial antagonists were isolated from the nodules of 5 cultivars out of 6. No biocontrol agent could be recovered from LG AURIS. Two winter cultivars, Dexter and Myster, presented higher observed diversity of different antagonistic species isolated from their nodules (with 4 different species). So, cultivar genotype appeared to be clearly strong determinant on the recruitment of beneficial partners in nodules. However, we could not exclude that an extended screening on different other media could allow to find more exhaustive bacterial agents of interest, in all cultivars.

Though focusing on known biocontrol bacterial genera towards *A. euteiches* on OTUs database, distinct patterns of assemblage could be highlighted between all cultivars. These results emphasized again the strong influence of host genotype, not only on the entire nodule microbiome but also concerning target biocontrol modulation. Spring cultivars presented globally lower relative abundance of these genera, in comparison to the two winter cultivars Dexter and Myster. This difference was echoed with the culturable approach, except for Aurélia, a spring cultivar, which had a high number of extracted antagonistic bacteria. Indiana cultivar seemed to present an intermediate pattern between winter and spring cultivars. Winter pea, for the two approaches used, appeared to be more able to recruit biocontrol bacterial isolates compared to spring cultivars. Because spring cultivars are more exposed to *A. euteiches*, higher requirement to select beneficial partners could have been more pronounced. But infection by this pathogen generally seriously damaged root system and nodule formation. This defense arsenal had no possibility to be helpfully deployed. In a vision of coevolutionary process, this need of specific microbial recruitment would so be missing (Baltrus, 2017). In the contrary, winter cultivars, historically exposed to *A. euteiches* pressure in native agrosystems but less impacted, could have developed the ability of actively attract abundant populations of antagonist endophyte as supplemental protection towards this pathogen. This mechanism could be one part of the pathogen avoidance of winter cultivar in field. However, these results had to be considered carefully. Winter cultivars could apparently recruit more abundant potential antagonistic endophytes in their nodules but in the end less efficient, because of lower requirement linked to less detrimental exposure to *A. euteiches* in field. Finally, this observed higher abundance of biocontrol genera could be linked to the globally more abundant minor populations in nodules of winter peas. Interestingly, as previously observed considering the



global community, the distinct assemblage of biocontrol populations seemed also to coincide with level of cold resistance. However, all these assumptions could be further explored, mostly because these analyses are only based on *in silico* estimated potential.

## 5. Conclusion

Comprehension of the plant holobiont, especially all interactions establishing with associated microbiome, is essential to elucidate the functioning of the entire system in front of pathogen. The development of efficient treatments for disease management implies to investigate all possible clues. The research of alternatives based on the implementation of biocontrol microbial agents assumed to explore different niches where they could be hosted. Several interesting bacterial strains with promising *in vitro* antagonistic potential towards *A. euteiches* were here successfully isolated from nodules of the studied cultivars. These strains could be a promising foundation for the development of novel biocontrol solutions to protect pea. Furthermore, metabarcoding analyses showed that pea nodules harbored in fact a wide variety of bacterial endophytes in their nodules, from the classical nitrogen-fixing *Rhizobium* symbiont to numerous non-rhizobia species. Some tenuously differences could be highlighted between spring and winter pea cultivars. Host genotypes appeared to be one important driving force modulating the assemblage of nodule bacterial endophytes. Particularly, cultivar influence could be extended to specificity in terms of selection and recruitment of known biocontrol agents, helpful against pea root rot. These results opened several perspectives for pea root rot management and widely for crop protection. Cultivars could also constitute a precious tool against *A. euteiches* through the inclusion of their power to recruit beneficial partners as a recognized mechanism of action. Moreover, identifying and promoting genes or key characteristics supporting beneficial community engineering of endophytic microbiome could be a target to reach for plant breeding.

## References

- Baltrus, D. A. (2017). Adaptation, specialization, and coevolution within phytobiomes. *Current opinion in plant biology*, 38, 109-116.
- Bardin, S. D., Huang, H. C., Pinto, J., Amundsen, E. J., & Erickson, R. S. (2004). Biological control of *Pythium* damping-off of pea and sugar beet by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. *Canadian journal of botany*, 82(3), 291-296.
- Berendsen, R. L., & Pieterse, C. M. J, Bakker PAHM. (2012). *The rhizosphere microbiome and plant health. Trends Plant Sci*, 17, 478-48610.





- Berg, G., & Hallmann, J. (2006). Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In *Microbial root endophytes* (pp. 53-69). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Borges, W. L., Prin, Y., Ducouso, M., Le Roux, C., & De Faria, S. M. (2016). Rhizobial characterization in revegetated areas after bauxite mining. *Brazilian journal of microbiology*, 47(2), 314-321.
- Bourion, V., Heulin-Gotty, K., Aubert, V., Tisseyre, P., Chabert-Martinello, M., Pervent, M., ... & Brunel, B. (2018). Co-inoculation of a pea core-collection with diverse rhizobial strains shows competitiveness for nodulation and efficiency of nitrogen fixation are distinct traits in the interaction. *Frontiers in plant science*, 8, 2249.
- Bowers, J. H., & Parke, J. L. (1993). Epidemiology of Pythium damping-off and Aphanomyces root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. *Phytopathology*, 83(12), 1466-1473.
- Busby, R. R., Rodriguez, G., Gebhart, D. L., & Yannarell, A. C. (2016). Native Lespedeza species harbor greater non-rhizobial bacterial diversity in root nodules compared to the coexisting invader, *L. cuneata*. *Plant and soil*, 401(1-2), 427-436.
- Calles, T., Xipsiti, M., & del Castillo, R. (2019). Legacy of the international year of pulses. *Environmental Earth Sciences*, 78(5), 1-8.
- Calles, T. (2016). The international year of pulses: what are they and why are they important. *Agriculture for Development*, 26, 40-42.
- Chandra, S., Choure, K., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2007). Rhizosphere competent Mesorhizobium loti MP6 induces root hair curling, inhibits Sclerotinia sclerotiorum and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 124-130.
- Chung, S. H., & Felton, G. W. (2011). Specificity of induced resistance in tomato against specialist lepidopteran and coleopteran species. *Journal of chemical ecology*, 37(4), 378.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., ... & Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 42(D1), D633-D642.
- Compant, S., Saikkonen, K., Mitter, B., Campisano, A., & Mercado-Blanco, J. (2016). Editorial special issue: soil, plants and endophytes.
- Dudeja, S. S., Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P., & Kothe, E. (2012). Interaction of endophytic microbes with legumes. *Journal of Basic Microbiology*, 52(3), 248-260.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*, 285, 44-55.
- Germida, J. J., Siciliano, S. D., Renato de Freitas, J., & Seib, A. M. (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 26(1), 43-50.
- Godebo, A. T., Germida, J. J., & Walley, F. L. (2020). Isolation, identification, and assessment of soil bacteria as biocontrol agents of pea root rot caused by *Aphanomyces euteiches*. *Canadian Journal of Soil Science*, (0), 1-11.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., & Gowda, C. L. L., and Krishnamurthy, L. (2015). *Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities*, 3, 355-377.



- Guimarães, A. A., Jaramillo, P. M. D., Nóbrega, R. S. A., Florentino, L. A., Silva, K. B., & de Souza Moreira, F. M. (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(18), 6726-6733.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W. M., Elliott, G. N., Bontemps, C., ... & Young, J. P. W. (2011). Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(11), 1276-1288.
- Heungens, K., & Parke, J. L. (2001). Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. *Phytopathology*, 91(4), 383-391.
- Heungens, K., & Parke, J. L. (2000). Zoospore homing and infection events: effects of the biocontrol bacterium *Burkholderia cepacia* AMMDR1 on two oomycete pathogens of pea (*Pisum sativum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5192-5200.
- Jensen, E. and Sørensen, L. (1987). Survival of *Rhizobium leguminosarum* in soil after addition as inoculant. *FEMS Microbiology Letters*, 45: 221-226.
- Johnston, A. W. B. & Beringer, J. E. (1975). Identification of the *Rhizobium* Strains in Pea Root Nodules Using Genetic Markers. *Journal of General Microbiology* (1975), 87, 343-350.
- Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2006). Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. In *Microbial root endophytes* (pp. 33-52). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kneen B.E., LaRue T.A. (1984) EMS Derived Mutant of *Pisum Sativum* Resistant to Nodulation. In: Veeger C., Newton W.E. (eds) *Advances in Nitrogen Fixation Research*. *Advances in Agricultural Biotechnology*, vol 4. Springer, Dordrecht.
- Krasova-Wade, T., Ndoeye, I., Braconnier, S., Sarr, B., De Lajudie, P., & Neyra, M. (2003). Diversity of indigenous 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(1), 13-22.
- Kumar, N., Lad, G., Giuntini, E., Kaye, M. E., Udomwong, P., Shamsani, N. J., ... & Bailly, X. (2015). Bacterial genospecies that are not ecologically coherent: population genomics of *Rhizobium leguminosarum*. *Open biology*, 5(1), 140133.
- Laguerre, G., Louvrier, P., Allard, M. R., & Amarger, N. (2003). Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2276-2283.
- Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N. (2001). Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*. 147(Pt 4):981-993.
- Leite, J., Fischer, D., Rouws, L. F., Fernandes-Júnior, P. I., Hofmann, A., Kublik, S., ... & Radl, V. (2017). Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2064.
- Lie, T. A. (1978). Symbiotic specialisation in pea plants: the requirement of specific *Rhizobium* strains for peas from Afghanistan. *Annals of Applied Biology*, 88(3), 462-465.
- Lu, J., Yang, F., Wang, S., Ma, H., Liang, J., & Chen, Y. (2017). Co-existence of rhizobia and diverse non-rhizobial bacteria in the rhizosphere and Nodules of *Dalbergia odorifera* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium multihospitium*-like and *Burkholderia pyrrocinia*-like strains. *Frontiers in microbiology*, 8, 2255.



- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., & Wade, W. G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 64(2), 795-799.
- Maróti, G., & Kondorosi, É. (2014). Nitrogen-fixing Rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Frontiers in Microbiology*, 5, 326.
- Marquez-Santacruz, H. A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Velazquez-Sepulveda, I., & Santoyo, G. (2010). Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*, 9(4), 2372-2380.
- Martínez-Hidalgo, P., Galindo-Villardón, P., Trujillo, M. E., Igual, J. M., & Martínez-Molina, E. (2014). Micromonospora from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A new promising Plant Probiotic Bacteria. *Scientific reports*, 4(1), 1-11.
- Martínez-Hidalgo, P., & Hirsch, A. M. (2017). The nodule microbiome: N<sub>2</sub>-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes*, 1(2), 70-82.
- Martínez-Molina, E., Juanes, F. S., Carro, L., Flores-Félix, J. D., Martínez-Hidalgo, P., Castillo, E. C., ... & Velázquez, E. (2016). Identification of rhizobial strains nodulating *Pisum sativum* in northern Spain soils by MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) analysis. In *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction* (pp. 37-44). Springer, Cham.
- Meade, J., Higgins, P. and O'Gara, F. (1985), Production and storage of *Rhizobium leguminosarum* cell concentrates for use as inoculants. *Journal of Applied Bacteriology*, 58: 517-524.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.
- Narula, S., Anand, R. C., Dudeja, S. S., & Pathak, D. V. (2013). Molecular diversity of root and nodule endophytic bacteria from field pea (*Pisum sativum* L.). *Legume Research-An International Journal*, 36(4), 344-350.
- Özkoç, İ., & Deliveli, M. H. (2001). In vitro inhibition of the mycelial growth of some root rot fungi by *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli isolates. *Turkish Journal of Biology*, 25(4), 435-445.
- Pandya, M., Naresh Kumar, G., & Rajkumar, S. (2013). Invasion of rhizobial infection thread by non-rhizobia for colonization of *Vigna radiata* root nodules. *FEMS microbiology letters*, 348(1), 58-65.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Flores-Félix, J. D., de la Vega, P. A., Rivas, R., Mateos, P. F., ... & Velázquez, E. (2015). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium lupini* and reclassification as *Bradyrhizobium lupini* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(4), 1213-1219.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789-799.
- Phillips, D. A. (1980). Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31(1), 29-49.
- Pliego, C., Ramos, C., de Vicente, A., & Cazorla, F. M. (2011). Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant and soil*, 340(1-2), 505-520.
- Prashar, P., & Vandenberg, A. (2017). Genotype-specific responses to the effects of commercial *Trichoderma* formulations in lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*) in the presence and absence of the oomycete pathogen *Aphanomyces euteiches*. *Biocontrol Science and Technology*, 27(10), 1123-1144.



- Rangin, C., Brunel, B., Cleyet-Marel, J. C., Perrineau, M. M., & Béna, G. (2008). Effects of *Medicago truncatula* genetic diversity, rhizobial competition, and strain effectiveness on the diversity of a natural Sinorhizobium species community. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5653-5661.
- Rey, T., Nars, A., Bonhomme, M., Bottin, A., Huguet, S., Balzergue, S., ... & Gough, C. (2013). NFP, a Lys M protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. *New Phytologist*, 198(3), 875-886.
- Riah, N., Béna, G., Djekoun, A., Heulin, K., de Lajudie, P., & Laguerre, G. (2014). Genotypic and symbiotic diversity of Rhizobium populations associated with cultivated lentil and pea in sub-humid and semi-arid regions of Eastern Algeria. *Systematic and applied microbiology*, 37(5), 368-375.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8), 827-837.
- Rossmann, M., Sarango-Flores, S. W., Chiamonte, J. B., Kmit, M. C. P., & Mendes, R. (2017). Plant microbiome: composition and functions in plant compartments. In *The Brazilian Microbiome* (pp. 7-20). Springer, Cham.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855-872.
- Schneider, A., & Huyghe, C. (2015). *Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables* (p. 512). Editions Quae.
- Schulze, J., Beschow, H., & Merbach, W. (1999). The effect of an 15NH<sub>4</sub> 15NO<sub>3</sub> fertilization at flowering on growth and nitrogen fixation of white and blue lupins. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 35(1-2), 85-95.
- Sharaf, H., Rodrigues, R. R., Moon, J., Zhang, B., Mills, K., & Williams, M. A. (2019). Unprecedented bacterial community richness in soybean nodules vary with cultivar and water status. *Microbiome*, 7(1), 1-18.
- Sharma, S., Aneja, M. K., Mayer, J., Munch, J. C., & Schloter, M. (2005). Characterization of bacterial community structure in rhizosphere soil of grain legumes. *Microbial Ecology*, 49(3), 407-415.
- Siddiqui, Z. A., Baghel, G., & Akhtar, M. S. (2007). Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by Rhizobium and plant growth-promoting rhizobacteria on lentil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(3), 435-441.
- Siddiqui, Z. A., & Mahmood, I. (1995). Role of plant symbionts in nematode management: a review. *Bioresource Technology*, 54(3), 217-226.
- Sreevidya, M., Gopalakrishnan, S., Kudapa, H., & Varshney, R. K. (2016). Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. *Brazilian journal of microbiology*, 47(1), 85-95.
- 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(1), 2.
- Stagnari, F., Jan, S., Galieni, A., & Pisante, M. (2016). Sustainable agricultural practices for water quality protection. *Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach; Ahmad, P., Ed*, 75-85.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., & Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical reviews in plant sciences*, 19(1), 1-30.
- Thygesen, K., Larsen, J. & Bødker, L. (2004). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Reduce Development of Pea Root-rot caused by *Aphanomyces euteiches* using Oospores as Pathogen Inoculum. *European Journal of Plant Pathology* 110, 411-419.





- Trainer, M. A., & Charles, T. C. (2006). The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(4), 377-386.
- Valverde, A., Velázquez, E., Cervantes, E., Igual, J. M., & van Berkum, P. (2011). Evidence of an American origin for symbiosis-related genes in *Rhizobium lusitanum*. *Applied and environmental microbiology*, 77(16), 5665-5670.
- Vásquez-Arroyo, J., Sessitsch, A., Martínez, E., & Peña-Cabriales, J. J. (1998). Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* on different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and soil*, 204(1), 147-154.
- Voisin, A. S., Bourion, V., Duc, G., & Salon, C. (2007). Using an ecophysiological analysis to dissect genetic variability and to propose an ideotype for nitrogen nutrition in pea. *Annals of Botany*, 100(7), 1525-1536.
- Wakelin, S. A., Walter, M., Jaspers, M., & Stewart, A. (2002). Biological control of *Aphanomyces euteiches* root-rot of pea with spore-forming bacteria. *Australasian Plant Pathology*, 31(4), 401-407.
- Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2), 250-256.
- Wicker, E., Hullé, M., & Rouxel, F. (2001). Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology*, 50(4), 433-442.
- Wilson, D. (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 274-276.
- Xu, L., Zhang, Y., Wang, L., Chen, W., & Wei, G. (2014). Diversity of endophytic bacteria associated with nodules of two indigenous legumes at different altitudes of the Qilian Mountains in China. *Systematic and applied microbiology*, 37(6), 457-465.
- Xue, A. G. (2003). Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology*, 93(3), 329-335.
- Xue, A. G. (2002). *U.S. Patent No. 6,495,133*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Young, J. P. W., & Matthews, P. (1982). A distinct class of peas (*Pisum sativum* L.) from Afghanistan that show strain specificity for symbiotic *Rhizobium*. *Heredity*, 48(2), 203-210.
- Zaharia, M., Bolosky, W. J., Curtis, K., Fox, A., Patterson, D., Shenker, S., *et al.*, (2011). Faster and more accurate sequence alignment with SNAP. arXiv preprint arXiv:1111.5572.
- Zhao, L., Xu, Y., Sun, R., Deng, Z., Yang, W., & Wei, G. (2011). Identification and characterization of the endophytic plant growth promoter *Bacillus cereus* strain MQ23 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 567-575.





---

## Chapitre 3

---



#### 4.2.2 Rôle de l'espèce végétale dans la sélection du microbiome de sa rhizosphère

La recherche de moyens de lutte efficaces contre la pourriture racinaire du pois est particulièrement intense dans l'objectif de revaloriser cette culture. Le recours à la lutte biologique représente une piste prometteuse, avec le développement de solutions biocontrôles s'appuyant sur des agents microbiens. Au vu de la richesse rencontrée dans la rhizosphère, des nombreuses interactions plantes-microorganismes dont elle est le siège, cet habitat constitue une source privilégiée pour isoler des agents antagonistes d'intérêt. La forte influence des couverts végétaux sur la structure et la diversité des communautés microbiennes associées pose la question de leur effet sur le recrutement d'agents de biocontrôle. Outre l'utilisation d'agents isolés par inoculation, une autre approche consiste à s'appuyer sur le caractère suppressif des sols envers les pathologies. Il convient alors de s'interroger sur l'influence des couverts végétaux sur l'assemblage des communautés microbiennes bénéfiques à la santé des plantes.

Le but ici est donc d'évaluer et de comparer le potentiel de plusieurs espèces végétales à favoriser la présence des populations biocontrôles dans leur rhizosphère au travers (1) d'une approche classique par isolement d'agents antagonistes cultivables, prometteurs dans un objectif de développement de solution de biocontrôle et (2) d'une approche plus globale, basée sur une analyse métabarcoding par un séquençage haut débit, considérant l'ensemble des microorganismes associés dans la rhizosphère.

Plusieurs souches bactériennes avec effet antagoniste *in vitro* envers *A. euteiches* ont été isolées de la rhizosphère du colza et de la féverole mais pas de celle du pois. Une distinction claire de la diversité et de la structure des communautés bactériennes a été observée entre les trois couverts végétaux. La communauté fongique semble quant à elle influencée principalement par le type de sol et secondairement par le couvert végétal. Un focus sur les genres microbiens décrits comme ayant un effet antagoniste envers *A. euteiches* a montré de la même façon des différences significatives en fonction du couvert végétal. Le choix de l'espèce végétale cultivée apparaît comme un déterminant clé pour le recrutement de populations bénéfiques, potentiellement utiles pour la culture suivante. Le choix des cultures au sein de la rotation pourrait ainsi constituer un moyen de lutte pertinent, en sélectionnant naturellement des associations bénéfiques d'agents de biocontrôle, pour une approche durable de la gestion des maladies.

L'étude est présentée sous forme d'article qui a été soumis dans le journal *Agronomy*.



# The microbial cavalry: how crop could be determinant to beneficially shape soil microbiome in the battlefield against *Aphanomyces euteiches*

Pauline LUSLEY, Adrien GAUTHIER, Isabelle TRINSOUTROT-GATTIN, Karine LAVAL, Mélanie BRESSAN\*

AGHYLE research unit UP 2018. C101, UniLaSalle, 3 rue du Tronquet, CS 40118, 76130 Mont Saint Aignan, France

\* Melanie Bressan: melanie.bressan@unilasalle.fr

## Abstract:

Pea root rot caused by *Aphanomyces euteiches* leads to considerable loss of income. Management of this disease is currently based mainly on preventive diagnosis using a specific biological assay. Intensive researches are deployed to find accurate solutions to fight this pathogen. Multiple abiotic factors are also determinant for soil suppressiveness to pea root rot but relatively less is known about the role of microbiome. An alternative could be the development of biocontrol solutions relying on microbial antagonism. Different microorganisms are known for their interesting biocontrol potential against *A. euteiches*. The aim was here to evaluate and compare the potential of several crop species to favor recruitments of beneficial biocontrol populations in their rhizosphere through (1) a classical cultivable approach to isolate antagonistic bacteria and (2) global consideration of the whole associated microbiome in the rhizosphere. Several bacterial strains with *in vitro* antagonistic effect on *A. euteiches* mycelium growth were successively isolated from rapeseed and faba bean rhizospheres, but not from pea. A clear distinction in the diversity and structure of the microbial community was observed between the 3 crops. A focus was then realized on microbial genera already described for their biocontrol potential towards *A. euteiches*. The 3 crops presented differential assembly of these biocontrol genera. These results confirmed the great influence of crop, mainly through root exudation, on the structure and diversity of microbial communities, intertwined with soil parameters. Crops appeared to be a key determinant to recruit beneficial populations, potentially useful for subsequent culture. Purposeful crop rotation could be a relevant tool, deployed to shape soil biocontrol potential as a sustainable approach for disease management.

**Keywords:** Soil microbiome, Biocontrol agents, *Aphanomyces euteiches*, Crop

## 1. Introduction

Legumes, celebrated in 2016 by the FAO, are very valuable in terms of nutrient richness for human and animals' food supply, particularly with their high protein content in grains [1,2]. These crops are promoted by the common agricultural policy also because of their benefits for ecosystem biodiversity and input reduction [1]. However, their culture is compromised by their susceptibility to numerous pathogens and pests, massively destroying aerial or root parts and causing major yield losses [3]. The soil-borne pathogen *Aphanomyces euteiches* is responsible of detrimental and highly destructive phytopathology affecting several legumes, including the pea root rot [4,5], with pathogenic oospores, the infectious and resistant form, staying in soil for more than 10 years [6]. Pea root rot is considered as the most damaging disease affecting pea (*Pisum sativum*) [5]. Unfortunately, only few strategies of disease management could be deployed, with limited efficiency due to the lack of efficient protection methods. Development of resistant cultivar through plant breeding is generally considered as the most reliable solution against pests [7]. Current pea varieties present only partial tolerance to pea root rot [8–





12], restricting their use, in a more global strategy, due to the rapid resistance circumvention by the pathogen [13].

Preventive diagnosis for pathogen avoidance remains generally the most recommended strategy to manage *A. euteiches* [5,14,15]. Additionally, crop rotation constitutes an important tool to slow down pathogen infection by increasing the delay between pea cultures and limiting the culture of other sensitive hosts [16,17]. Other studies have also shown the positive effect of introducing crops such as members of Poaceae or Brassicaceae genera, because of their production of antimicrobial compounds with antagonist effects on *A. euteiches* development [18,19]. The long lifespan of *A. euteiches* oospores in soils and the broad spectrum of host species represent the major barriers that could impact negatively the efficiency of crop rotation [5,20]. Biological control is another widely studied alternative to pesticides, based on the use of predators, antagonists, natural parasites or bioactive natural compounds to control harmful organisms [21,22]. Notably, the value of native microbial agents retrieves a resurgence of interest in view of their multiple benefits for disease management [23–26]. Exploiting and valuing the diversity of microbial community as a source of valuable soil-borne biocontrol microorganisms represents a great challenge for efficient crop disease management. Various soils are indeed described for their suppressive potential towards different plant diseases, with biological elements representing the principal contributors to this characteristic [27–31]. In this context, numerous studies try to shed light on microbial determinism of suppressiveness, particularly to identify involved taxa, and even isolate strains with biocontrol potential [32]. Isolation, screening, and identification of soil strains with biocontrol activity towards *A. euteiches* could represent an important part of integrated protection against pea root rot [5,33–35].

The rhizosphere appears to be a favored reservoir for beneficial microbial agent, essential to plant nutrition and health [24,36]. This heavily populated environment is the location of complex interactions between plant and microbial populations but also strong competition between microorganisms [37]. Because rhizosphere microbiome constitutes the first battle line of plants in soil against abiotic and biotic stresses, this environment could be particularly richer with biocontrol isolates. Another approach could be to manipulate native soil microbiome in this habitat as a sustainable alternative to promote plant growth and manage plant disease [38,39]. The objective is to shape the composition of microbiome to enhance beneficial interaction [40], and more specifically to enrich soil and associated microbiome with biocontrol taxa [32,41,42]. Microbial communities are highly influenced by plant root secretions which constitute important molecules for growth and signaling [29,36]. Composition of root exudates has been demonstrated to depend on plant species, genotype, developmental stage or root part [43–46]. Crop, additionally to direct impact on pathogen density [17] could also promote beneficial association with microbial antagonists to support *A. euteiches* control.

The aim of this study was to 1) to isolate and identify bacterial strains with biocontrol potential against *A. euteiches* in the rhizosphere of 3 different crops (pea, sensitive host; rapeseed, non-host and faba bean, resistant host), 2) demonstrate the role of crop species on general fungal and bacterial composition of the microbiome associated to their rhizosphere and 3) to evaluate the power of recruitment of biocontrol taxa of these 3 crops as a strategy for pea root rot management.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Soil sampling and physicochemical analyses

Soil samples were collected in May 2018 from the rhizosphere of 3 different crops, from two fields in Normandy, France: a 9-month old culture of winter rapeseed and a 7-month old culture of winter pea, not mixed but adjacent on the same plot (49°47'11.364''N, 01°27'5.076''E); a 4-month old culture of spring faba bean in another closed plot (49°46'52.716''N, 01°40'49.116''E). Soils were sampled with a shovel at a maximum depth of 20 cm, as closed as possible to plant roots. Those 3 rhizospheric soil samples were sieved at 2 mm to remove plant residues. For bacterial isolation and DNA extraction, three sub-samples were collected and short-term stored respectively at 4 °C and - 80 °C for further



analyses. Standard soil analyzes were performed using the standard methods. Soil texture was determined using a laser granulometer Malvern Mastersizer (Malvern Instruments, Malvern, UK). Soil pH was determined according the ISO standard NF ISO 10390. Soil total and organic carbon was measured using a TOC analyzer Shimadzu SSM-5000A/TOC-VCSH Carbone (Shimadzu, Kyoto, Japan). Soil total nitrogen was determined with the Kjeldahl method [47]. Calcium content determination was performed following the international standard NF X31-108 (2002). Soil labile carbon was determined through classical simplified measure of permanganate-oxidizable carbon [48]. Soil P status were determined using two methods allowing to estimate directly available and exchangeable-assimilable P, respectively with the international standard NF ISO 11263 standard (1995) for P Olsen and NF X31-161 for P Joret-Hébert.

### 2.1. Bacterial isolation from soil

Isolation of potential antagonistic bacteria was conducted using traditional plate assay technique. Five grams of each soil sub-sample were diluted in 45 ml of NaCl 0.9% solution and shaken for 5 minutes. After 10-fold serial dilution, 100 µL of two appropriate dilutions were sprayed on Petri dishes containing Luria broth (LB) agar medium and R2A medium. Assay plates were incubated for 48 h in the dark at ambient temperature. Isolates were then selected on all the Petri dishes, considering the largest possible diversity of phenotype. Fifty-two strains for rapeseed rhizosphere, 49 strains for pea rhizosphere and 50 strains for faba bean rhizosphere were isolated and stored at – 80 °C in 15 % glycerol after purification by repeating streaking.

### 2.1. Culture of *Aphanomyces euteiches*

*Aphanomyces euteiches* (*A. euteiches*) isolate Ae84 was provided by Terres Inovia (Rennes, France). This strain, originally isolated from infected pea, is used as the French reference of *A. euteiches* isolates [49]. Ae84 strain was maintained on potato dextrose agar (PDA) plates in darkness at 8 °C for long-term storage and regularly re-inoculated in plants after each third sub-culture to maintain virulence. Screening of biocontrol potential and confrontation tests were realized with a second sub-culture of *A. euteiches*.

### 2.2. Biocontrol screening and confrontation tests

Isolated strains were tested for their ability to inhibit mycelium growth of *A. euteiches*. A first screening step to detect antagonistic activity relied on a plate assay consisted of 4 droplets of 1 µL each of a 24 h-old liquid LB culture of each tested bacterial strains poured at 2.5 cm around an *A. euteiches* plug (5mm diameter, placed at plate's center). Strains capable of limiting *A. euteiches* growth after 10 days were selected for following confrontation test using a classical dual plate assay technique. Three hundred microliters of a 24 h-old liquid LB culture of each chosen strains were sprayed into LB Agar plate and incubated 48 h in the dark at ambient temperature. A 5 mm bacterial plug of this solid culture was placed in front of a 7 days-old *A. euteiches* plug (from a second sub-culture) (d0), and then incubated in the dark at ambient temperature. From d4 to d10, Petri dishes were photographed to determine biocontrol impact on *A. euteiches* mycelium growth by measuring the length (radius) of mycelium growth, using imageJ software. *A. euteiches* culture alone was used as a negative control for both screening techniques.

### 2.3. Enzymatic activities

Bacterial isolates showing antagonistic activity were characterized by their production of 3 enzymes of interest: chitinase, protease and cellulase. Chitinase activity was detected by growth on agar plate constituted of nutrient broth and 0.2 % colloidal chitin, incubated for 2 days at 30 °C [50]. An orange-yellow colored halo surrounded the bacterial colony indicated the production of chitinase by



the screened strain. Proteolytic activity was detected by growth on agar plates containing LB medium and 5 g.L<sup>-1</sup> skim milk, incubated for 2 days at 30 °C [51]. A clear halo surrounded the bacterial colony indicating the production of protease. Cellulase activity was detected by growth on carboxymethyl cellulose (CMC) agar plates (10 g.L<sup>-1</sup> CMC; 1 g.L<sup>-1</sup> yeast extract; 2.5 g.L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.25 g.L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O; 0.1 g.L<sup>-1</sup>, NaCl; 0.125 g.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0.0025 g.L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O; 0.025 g.L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O; 10 g.L<sup>-1</sup> agar) supplemented with trypan blue. The plates were incubated at 30 °C for 2 days. Cellulolytic isolates were distinguished by a clear halo around colony [52].

#### 2.4. Isolates identification

All isolates were grown in liquid LB medium during 48 hours at 30°C with an agitation at 130 rpm. Liquid bacterial cultures were then stored at -20°C for 24 hours and extemporaneously heated at 60°C for cell lysis. Isolates were identified based on nucleotide sequence data from 16S rDNA. PCR amplifications for all isolates were carried out with 2 µL of each bacteria culture, 1 µM of each primer 63f [5'- CAGGCCTAACA CATGCAAGTC -3'] [53] and BU16S4 [5'CTGCTGCCTCCCGTAGG-3'] derived from 341F [54], 25 µL of GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA) in the GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).. The amplification protocol was 2 min at 94 °C, followed by 35 cycles 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, 1 min at 72 °C. A final extension step was carried out at 72 °C for 7 min. All PCR products were visualized by electrophoresis on agarose gel stained with ethidium bromide. PCR products were then sequenced by Genoscreen (Lille, France).

#### 2.7. DNA extraction and metabarcoding analysis

Total soil DNA was extracted from 0.5 g of moist rhizospheric soil using Fast DNA spin Kit for Soil (MP-Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) according to manufacturer's procedure. Soil DNA concentrations was assessed by fluorimetry using the Fluorescent DNA quantitation Kit Hoechst 33258 (Biorad, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's instructions. The DNA solutions were stored at - 20 °C until use. Total DNA from three soil samples were extracted for all studied rhizosphere. All PCR amplifications, made in duplicate for each soil sample and pooled for further analysis, were realized by Biofidal, Vaulx-en-Velin, France - <http://www.biofidal-lab.com> - according to their own procedures. A 16S rRNA gene fragment targeting the V3-V4 region was amplified for bacterial identification using primers 16S-341F (5' - CCTACGGGNGGCWGCAG - 3') and 16S-805R (5' - GACTACHVGGGTATCTAATCC - 3') with specific forward and reverse Illumina primer overhang adapters. The variable internal transcribed spacer 2 (ITS2) region was amplified for fungal identification using specific fungal primers gITS7 (5' - GTGAATCATCGARTCTTTG - 3') and ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') with specific forward and reverse Illumina primer overhang adapters. A second round of PCR amplification were then performed on 16S and ITS2 amplicons to attach indices and Illumina sequencing adapters using the Nextera® XT index kit as recommended. Following normalization, building of amplicons library, Illumina MiSeq sequencing (2 × 300-bp paired-end reads) and bioinformatics analyzes were also performed by Biofidal, according to their own procedures. Negative controls were included during the library preparation. Briefly, paired-end sequence reads were collapsed into so-called pseudoreads using sequence overlap with USEARCH version 9.2 [55]. A total of 1 131 609 and 2 100 951 pseudoreads for bacteria and fungi, respectively, were obtained from 9 soil samples. Classification of these pseudoreads was performed based on the results of alignment with SNAP version 1.0.23 [56] against the RDP database [57] for bacterial organisms, while fungal organisms are classified using the UNITE ITS gene data base [58]. Low abundance sequences were filtered at 0,005 % [59]. All OTUs present in negative controls were excluded from the dataset.

#### 2.8. Statistical analysis

All tests were performed with Rx64 software version 3.4.1 [60] and statistical significance was set at  $p < 0.05$ . For bacterial screening, comparison of *A. euteiches* mycelium growth in confrontation tests



between screened strains were performed using a non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by post-hoc test with `kruskalmc` function, using the R package “`pgirmess`”. For microbiome analyzes, the numbers of unique and shared OTUs between the 3 rhizospheric soils were compared in Venn Diagrams using the R package “`vegan`”. Shannon (function “`Shannon`”), Pielou (calculated as Shannon indice / log (Richness indice)) and Richness (representing the total number of OTUs) indices were calculated with the R package `Vegan`. Comparisons of microbial diversity and richness indices, relative abundance of each microbial phylum and relative abundance of known antagonistic microbial genus were performed using a non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by post-hoc test with `kruskalmc` function, using the R package “`pgirmess`”. PCA analysis was used to compare total microbiomes associated with the 3 plants’ rhizosphere and genera known for their potential biocontrol activity against *A. euteiches* with the R package “`ade4`”.

### 3. Results

#### 3.1. Isolation of potential antagonistic bacteria against *A. euteiches*

##### 3.1.1. Screening and confrontation tests

Faba bean rhizospheric soil presented distinct physicochemical characteristics from those of pea and rapeseed (Figure 1). Higher value of pH and available P were observed in faba bean rhizosphere, and lower values for all other measured parameters, compared to pea and rapeseed rhizospheres (Table S1).

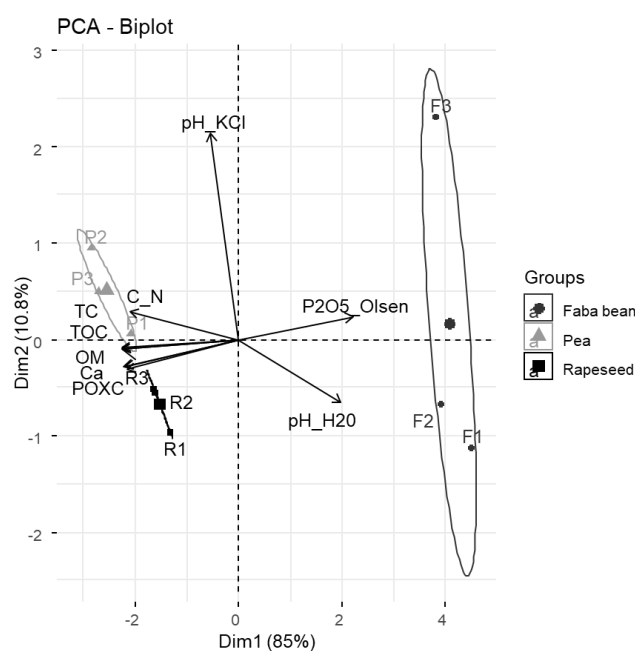


Figure 1: Principal component analysis of physicochemical characteristics for the three studied rhizospheres (F: faba bean; P: pea and R: rapeseed) and their respective three replicates. Ca: Calcium, N: Nitrogen, TC: Total Carbon, TOC: Total Organic Carbon, C\_N: ratio Carbon/Nitrogen, OM: Organic matter, POXC: permanganate-oxidizable carbon, P2O5 Olsen: directly available soil phosphorus, P2OH\_JH: Exchangeable-assimilable soil phosphorus, pH\_H2O: Water hydric potential, pH\_KCl: KCl hydric potential.

Based on the first screening test, a total of 17 bacterial isolates with antagonistic activity, with complete interruption of *A. euteiches* mycelium growth (Figure 2), out of 150 isolated bacteria were recovered, including 9 from rapeseed rhizospheric soil (so 17 % of all rapeseed isolates) and 8 from faba bean rhizospheric soil (so 16 % of all faba bean isolates). Although rapeseed and pea were adjacent on the same plot, no antagonistic bacteria could be brought out of all isolates isolated from pea rhizospheric soil. On the contrary, a higher proportion of bacterial isolates with repellent effect (20 %) were found in





the cultivated pool of bacterial obtained from pea rhizospheric soil (Figure 2), compared to rapeseed (17 %) and faba bean (14 %). For all studied rhizospheric soil, most of bacterial isolates showed no effect on *A. euteiches* growth.

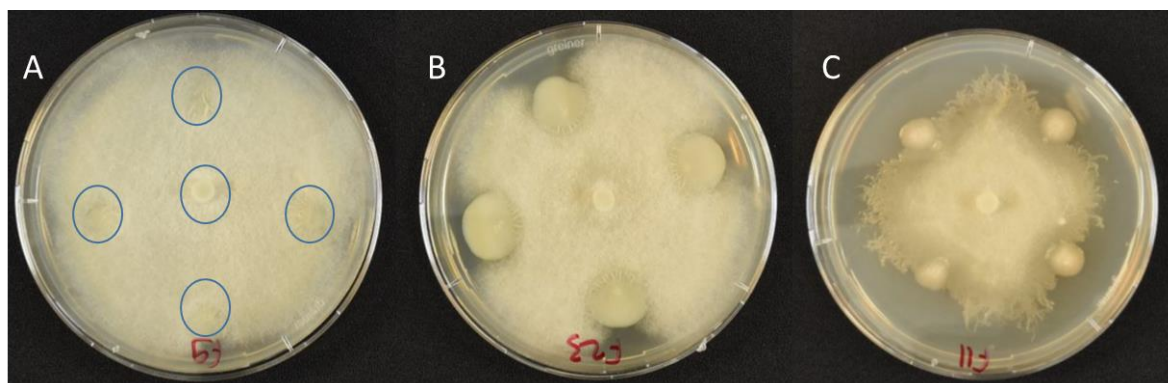


Figure 2: Screening of bacterial isolates as biological control agents against *A. euteiches*. The potential biocontrol of each isolate was assessed, after 10 days of culture on PDA Petri dishes, by 4 deposits at 2.5 cm from the unique *A. euteiches* 5 mm plug at the center of the plate. The biocontrol potential has been classified into 3 different categories: A) Isolate presenting no effect on *A. euteiches* growth – overgrowth of *A. euteiches* covering the 4 isolate deposits; B) isolate showing a repulsif effect - weak inhibition of *A. euteiches* on the Petri dish edges; and C) isolate with an antagonistic effect – strong inhibition of *A. euteiches* mycelial growth.

Classical dual plate confrontation tests were applied on the 17 potential antagonist isolates. A significant decrease of *A. euteiches* mycelium growth were observed when confronted to 8 bacterial isolates out of 17, only 1 bacterial isolate (I1-SRS) out of 9 from rapeseed and 7 out of 8 from faba bean rhizospheric soil samples (I1-RSF to I7-RSF). Inhibition of *A. euteiches* mycelium growth varied from 14% to 41% according to tested bacterial isolates (Figure 3). The most efficient antagonistic activity was observed for I1-RSR and I4-RSF isolates, from respectively rapeseed and faba bean rhizospheres.

### 3.1.2. Enzymatic characterization and identification of selected bacterial isolates

A total of 17 bacterial isolates, from the first screening step, were identified based on 16S rDNA sequences compared to GenBank databank. All isolates of interest were classified into 3 bacterial genera: *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. In rapeseed rhizospheric soil, all interesting isolates belonged to the genus *Bacillus*, except one isolate from the genus *Pseudomonas* (Table 1). In faba bean rhizospheric soil samples, 4 isolates belonged to the genus *Bacillus*, 3 to the genus *Pseudomonas* and one to the genus *Acinetobacter*. The 2 most efficient antagonist bacterial isolates, I1-RSR and I4-RSF, were identified both as *Pseudomonas*. Enzymatic characterization revealed that all *Bacillus* isolates presented a common profile with only protease activity. On the contrary, each of the 4 bacterial isolates from the *Pseudomonas* genus presented a unique enzymatic profile: I1-RSR with cellulase and protease activities, I4-RSF with protease and chitinase activities, I6-SRF with no detected activity for the 3 tested enzymes and I7-SRF with the 3 enzymatic activities. The *Acinetobacter* isolate presented none of tested enzymatic activity. The 8 bacterial isolates with antagonistic activity, when confronted with *A. euteiches* in dual plate assay, were identified as a *Pseudomonas* isolate from rapeseed rhizosphere (I1-RSR), and the 7 others from faba bean rhizosphere: 3 *Bacillus* isolates (I1-RSF, I3-RSF, I5-RSF), 3 *Pseudomonas* isolates and the *Acinetobacter* isolate (Figure 3). These bacterial isolates showed different enzymatic profiles, and even for two of them no detected enzymatic activities (I2-RSF and I6-RSF) (Table 1).

Table 1: 16S rDNA identification of bacterial isolates showing antagonist activity against *A. euteiches* and characterization of cellulase, protease and chitinase activities. Id: Strain name, +: Positive enzymatic



activity, -: Negative enzymatic activity. Cellulase test was measured according to Kim *et al.*, 2012, protease test was measured according to Kumari *et al.*, 2014 and chitinase test was measured according to Okay *et al.*, 2008. Enzymatic activities were detected with a halo surrounded the bacterial colony on an agar Petri dishes containing each specific medium.

Id	Genus	Cellulase	Protease	Chitinase
I1_RSR	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	+	-
I2_RSR	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-
I3_RSR	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-
I4_RSR	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-
I5_RSR	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-
I6_RSR	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-
I7_RSR	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-
I8_RSR	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-
I9_RSR	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-
I1_RSF	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-
I2_RSF	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	-	-
I3_RSF	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-
I4_RSF	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	+
I5_RSF	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-
I6_RSF	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-
I7_RSF	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	+	+
I8_RSF	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	-

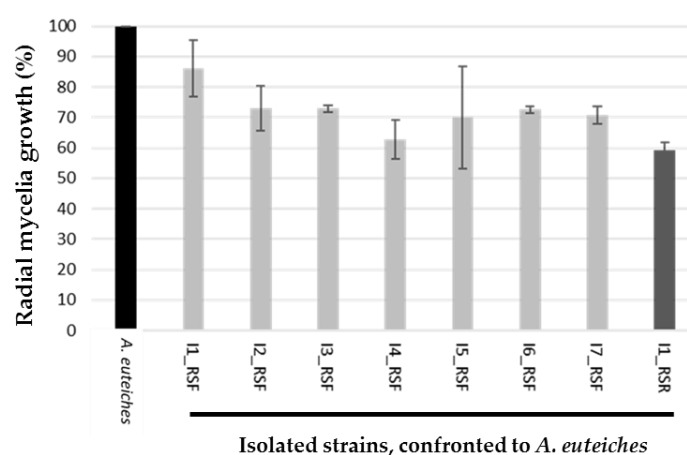


Figure 3: Inhibition of *A. euteiches* radial mycelial growth observed after 10 days of dual culture with bacterial isolates from faba bean rhizosphere (RSF, light grey) and from rapeseed rhizosphere (RSR, dark grey) compared to control *A. euteiches* (black histogram) Inhibition was measured by the impact of bacterial isolate on mycelial growth radius compared to the control, *A. euteiches* (alone). Results are the mean of *A. euteiches* radial mycelial growth expressed in percentages from 5 replicates with standard deviation.

### 3.2. Rhizospheric microbiome comparison

#### 3.2.1. Diversity and richness indices

Fungal and bacterial communities were successfully analyzed by high throughput sequencing. After bioinformatics filtration to remove sequencing errors or putative chimeric sequences (realized



by Biofidal) and low abundance sequence filtration, the number of high-quality sequences retained, respectively in rapeseed, pea and faba bean rhizospheres, was 62 061 ( $\pm$  8 658), 63 121 ( $\pm$  3719) and 53 702 ( $\pm$  6455) sequences for bacterial datasets, and 32 795 ( $\pm$  10 144), 49 574 ( $\pm$  944) and 80 569 ( $\pm$  16 789) sequences for fungal datasets. These sequences were then clustered into 2307 ( $\pm$ 66), 2351 ( $\pm$  43) and 2278 ( $\pm$  93) bacterial OTUs; 396 ( $\pm$  10), 383 ( $\pm$  8) and 566 ( $\pm$  14) fungal OTUs, respectively for rapeseed, pea and faba bean rhizospheres. Rarefaction curves for bacterial and fungal datasets were drawn based on the number of sequences retrieved for all OTUs (data not showed). Fungal curves revealed that the number of OTUs increases with the number of reads and reached a plateau for all samples. Similarly, bacterial curves were very closed to reach a plateau for all samples, and so that reads were sufficient to allow representative description of microbiomes (data not showed).

Fungal and bacterial communities were evaluated using richness and diversity indices (Table 2). No significant difference could be observed between bacterial richness (as number of different OTUs) for the 3 studied crops whereas a higher fungal richness was detected for faba bean compared to the 2 others. For bacterial community, Shannon and Pielou evenness indices were higher for rapeseed and lower for faba bean. For fungal community, conversely, the highest Shannon index was observed for faba bean and the lowest for pea, but no difference for Pielou evenness index. No clear significant difference was observed for all indices between rapeseed and pea.

Table 2: Microbial diversity and richness indices for rapeseed, pea and faba bean rhizospheres. Means were calculated from three replicates per each rhizospheric soil. Standard deviations are indicated in parentheses. Significant differences among rhizospheric soils are indicated by different letters at  $P < 0.05$ , differences observed with a kruskalmc test (package pgirmess, R).

Community	Soil	Crop Rhizosphere	Shannon's index	Richness index	Pielou's index
Bacteria	1	Rapeseed	6.31 ( $\pm$ 0.02) <i>b</i>	2307 ( $\pm$ 66) <i>a</i>	0.815 ( $\pm$ 0.004) <i>b</i>
		Pea	6.29 ( $\pm$ 0.03) <i>a,b</i>	2351 ( $\pm$ 43) <i>a</i>	0.810 ( $\pm$ 0.002) <i>a,b</i>
	2	Faba bean	6.19 ( $\pm$ 0.05) <i>a</i>	2278 ( $\pm$ 93) <i>a</i>	0.801 ( $\pm$ 0.003) <i>a</i>
Fungi	1	Rapeseed	4.05 ( $\pm$ 0.25) <i>a,b</i>	396 ( $\pm$ 10) <i>a</i>	0.677 ( $\pm$ 0.042) <i>a</i>
		Pea	3.47 ( $\pm$ 0.34) <i>a</i>	383 ( $\pm$ 8) <i>a,b</i>	0.583 ( $\pm$ 0.058) <i>a</i>
	2	Faba bean	4.26 ( $\pm$ 0.16) <i>b</i>	566 ( $\pm$ 14) <i>b</i>	0.671 ( $\pm$ 0.023) <i>a</i>

### 3.2.2. Microbiome composition

All sequences were assigned at taxonomic levels (from phylum to species). The 3 rhizospheric soils presented the same overall bacterial and fungal composition. Regarding fungal community (Figure 4), Ascomycota was predominant in all 3 rhizospheres (respectively 82.2 %, 81.33 %, 70.97 % for rapeseed, pea and faba bean), and significantly higher in rapeseed rhizosphere than in faba bean rhizosphere (Table S2). Zygomycota (respectively 11.03 %, 8.78 %, 16.9 % for rapeseed, pea and faba bean) was significantly higher in faba bean rhizosphere than in pea rhizosphere (Table S2). Abundance of Basidiomycota (respectively 6.15 %, 9.44 %, 11.24 % for rapeseed, pea and faba bean) was not significantly different between rapeseed, pea and faba bean rhizospheres (Table S2). The 4 other phyla were under 1% of relative abundance and did not differ significantly between each rhizosphere (Table S2). Regarding bacterial community (Figure 5), Proteobacteria and Actinobacteria were the 2 predominant phyla in the 3 rhizospheres (respectively 34.38 %, 35.86 %, 29.50 % and 29.71 %, 26.07 %, 35.16 % for rapeseed, pea and faba bean). Proteobacteria was the major phylum in pea (with the highest relative abundance) and rapeseed rhizosphere whereas Actinobacteria was the predominant one in faba bean rhizosphere. Significant differences of relative abundance were observed for these 2 phyla between pea and faba bean, while rapeseed presented intermediate values (Table S2). Nine other bacterial phyla presented a relative abundance ranging between 1 to 7 % (Chloroflexi, Firmicutes, Acidobacteria, Bacteroidetes, Candidatus Saccharibacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Nitrospirae,



Gemmatimonadetes). Some differences in relative abundance of these phyla were highlighted depending on crop rhizosphere (Table S2). Chloroflexi was significantly more abundant in rapeseed rhizosphere than in faba bean rhizosphere. Acidobacteria and Nitrospirae were more abundant in pea rhizosphere than in faba bean rhizosphere. Candidatus Saccharibacteria and Verrumicrobia were more abundant in faba bean rhizosphere than in pea rhizosphere. Twenty minor bacterial phyla were also identified, accounted for less than 4 % of relative abundance (Table S3).

The structure of the bacterial and fungal communities was analyzed by PCA to compare the three rhizospheres based on global OTU composition (Figure 6). A discrimination of bacterial communities based on soil was observed on the first axis of PCA (Figure 5). The bacterial community observed in faba bean rhizosphere (from one field) is clearly opposed on the first axis to those associated with rapeseed and pea rhizospheres (from the other field). But a discrimination was also observed on 2<sup>nd</sup> axis concerning rapeseed and pea rhizospheres with separated bacterial community. Concerning fungal communities, the same discrimination was observed between faba bean rhizosphere (from one field) and the 2 others (from the second field). But the distinction between rapeseed and pea was more tenuous. The observed variability into each rhizospheric soil sample was higher than for bacterial community. Concerning OTU composition, Venn diagrams permitted to observe the shared and unique bacterial and fungal OTUs between studied rhizospheric soils (Figure 7A and 7B). In the bacterial community (Figure 4A), 2420 OTUs were shared by all rhizospheres, 159 shared by rapeseed and pea (localized in the same field), 151 shared by pea and faba bean (on two different fields), 122 shared by rapeseed and faba bean (on two different fields). In rapeseed, pea and faba bean rhizosphere, respectively 17, 32 and 59 OTUs were unique. In the fungal community (Figure 7B), 336 OTUs were shared by all rhizospheres, 58 shared by the rapeseed and pea rhizospheres, 71 shared by pea and faba bean and 93 shared by rapeseed and faba bean. In rapeseed, pea and faba bean rhizospheres, respectively 76, 53 and 234 OTUs were unique.





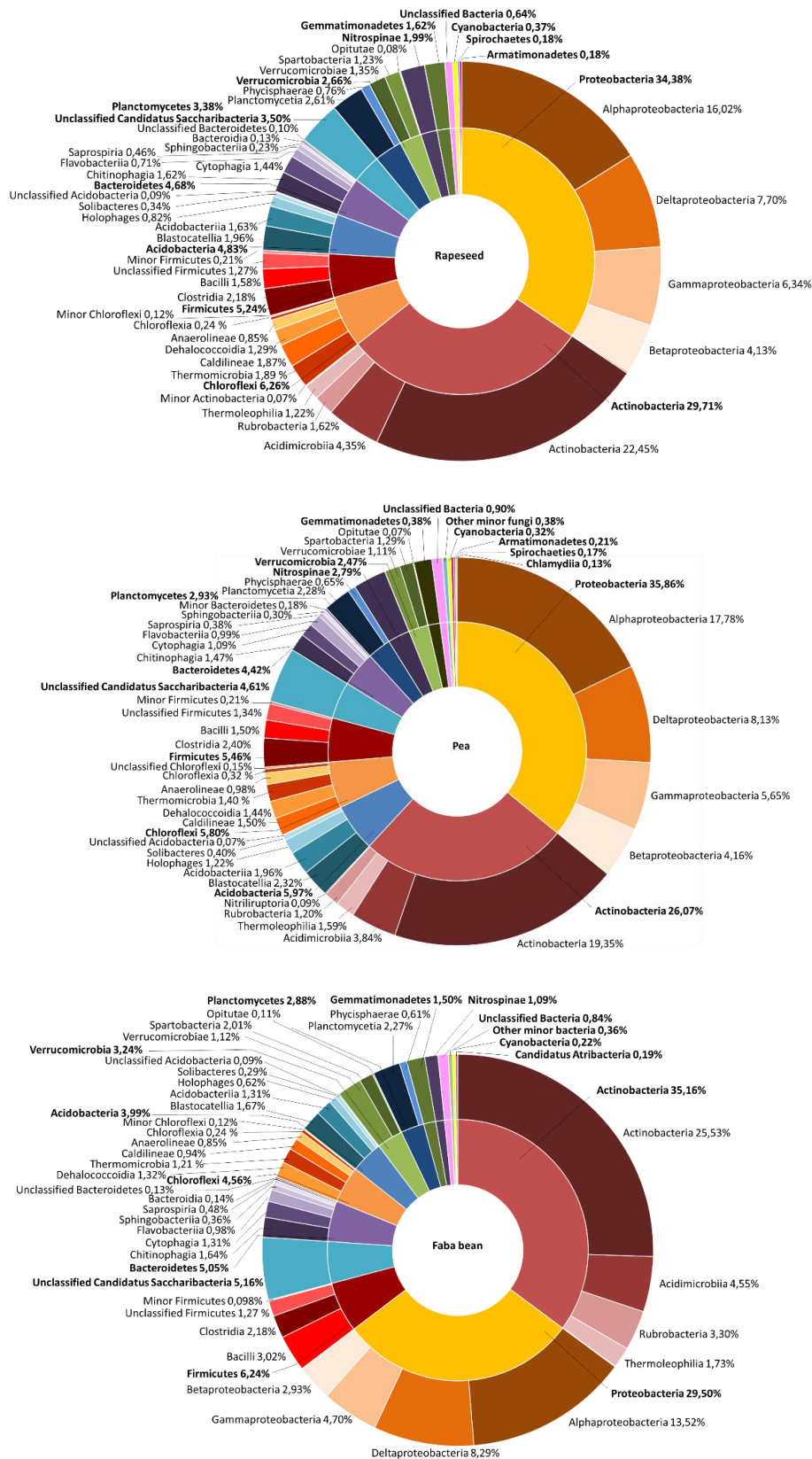


Figure 4: Relative abundance levels of bacterial phyla, expressed as percentages of all sequences, detected in pea, rapeseed and faba bean rhizospheres.



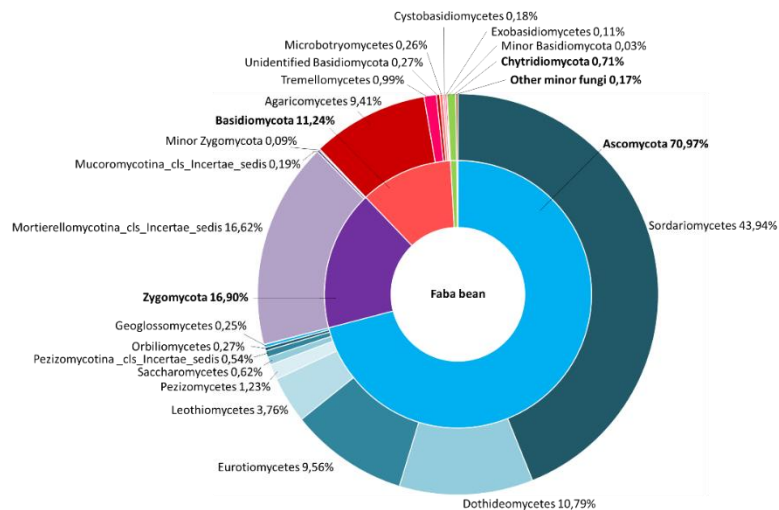
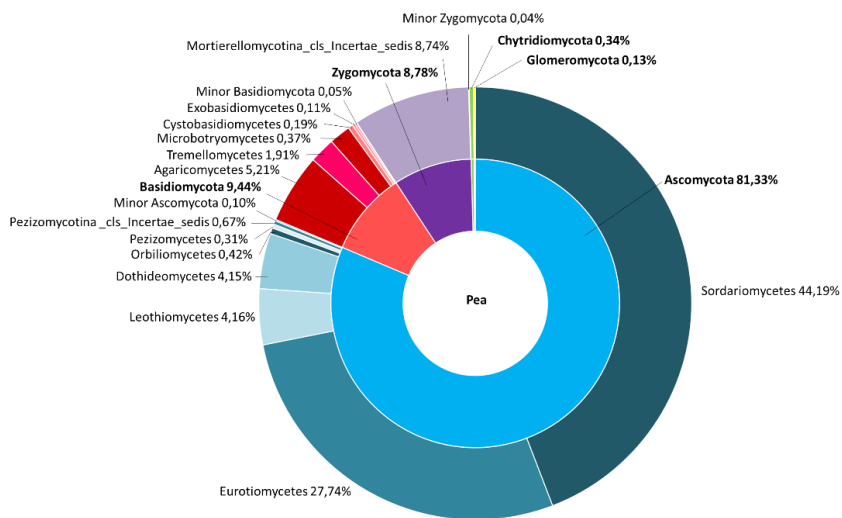
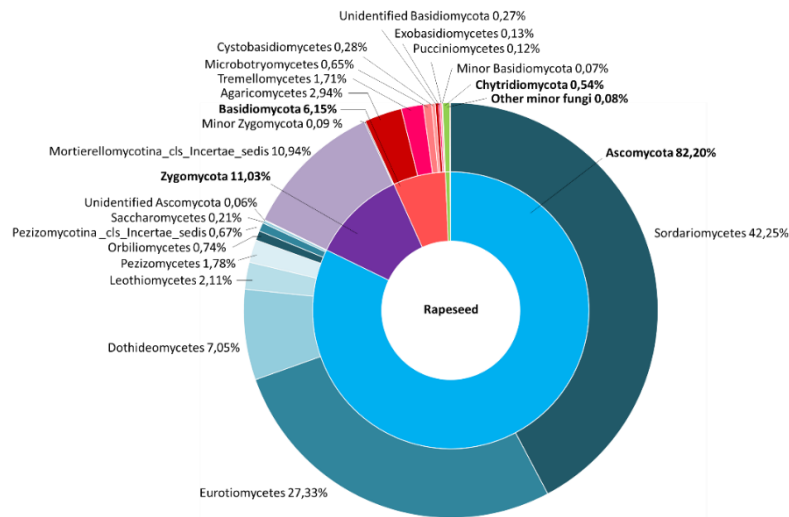


Figure 5: Relative abundance levels of fungal phyla, expressed as percentages of all sequences, detected in pea, rapeseed and faba bean rhizospheres.



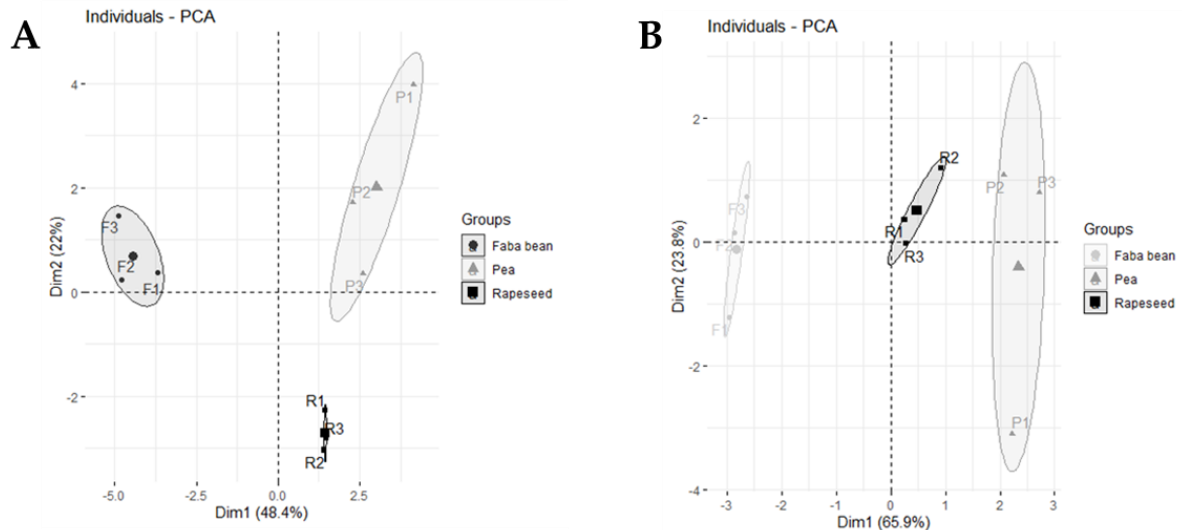


Figure 6: Principal component analysis of the three studied rhizospheres (F: faba bean; P: pea and R: rapeseed) and their respective three replicates (1 to 3) generated from bacterial (A) and fungal (B) OTUs matrices of relative abundance.

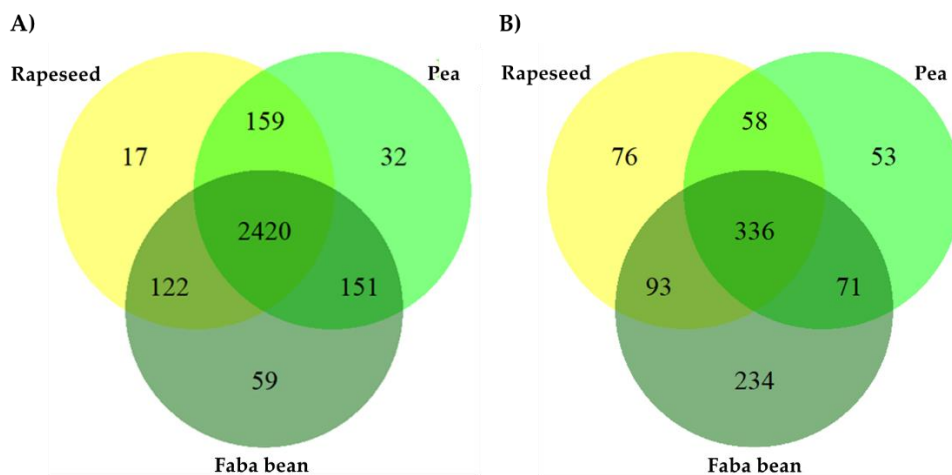


Figure 7: Venn diagrams indicating the numbers of shared and unique bacterial (A) and fungal (B) OTUs between the three rhizospheres: rapeseed, pea and faba bean.

### 3.3. Comparison of the relative abundance of bacterial and fungal genera known as biocontrol

Bacterial and fungal genera already known for their biocontrol potential against *A. euteiches* were listed from the literature (Table 3) and from this study. Relative abundance of these potential biocontrol bacterial genus considering OTUs data set were then compared between rapeseed, pea and faba bean rhizospheres. Some significant differences in the relative abundance of bacterial genera could be highlighted. *Arthrobacter* and *Lysobacter* were significantly more abundant in rapeseed rhizosphere compared to faba bean. *Paenibacillus* and *Rhizobium* were significantly more abundant in pea rhizosphere compared to faba bean. *Bacillus* was significantly more abundant in faba bean rhizosphere compared to pea. Concerning fungi, *Trichoderma* genus presented a high abundance in pea rhizosphere (Table 3).

The structure of the potential antagonistic microbial communities was analyzed by PCA to compare the three rhizospheres based on all OTUs from antagonistic bacterial genus, coming from the literature or



identified in this study (Figure 8). This PCA showed that each rhizosphere presented distinct assembly of biocontrol bacteria, with one or more known antagonistic bacterial genus preferentially associated with each rhizosphere. Faba bean rhizosphere was more associated with the presence of *Bacillus*, *Achromobacter*, *Streptomyces* and *Funneliformis*, rapeseed rhizosphere with *Arthrobacter*, *Lysobacter* and *Microbacterium*, and pea rhizosphere principally with *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Trichoderma*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter* and *Variovorax*.

Table 3: Relative abundance levels of microbial genera presenting known antagonistic species against *A. euteiches* into each rhizosphere (rapeseed, pea and faba bean). Means were calculated from three replicates per rhizosphere and per antagonistic bacterial and fungal genus. Standard deviation is indicated in parentheses. Significant differences among rhizospheres are indicated by different letters at  $P < 0.05$ , differences observed with a kruskalmc test (package pgirmess, R).

Antagonist (genus)	Soil 1		Soil 2	References
	Rapeseed	Pea	Faba bean	
<b>Bacteria</b>				
<i>Acinetobacter</i>	0.062% ( $\pm 0.009$ ) <i>a</i>	0.092% ( $\pm 0.015$ ) <i>a</i>	0.051% ( $\pm 0.005$ ) <i>a</i>	this study
<i>Achromobacter</i>	0.0010% ( $\pm 0.0018$ ) <i>a</i>	0.0005% ( $\pm 0.0009$ ) <i>a</i>	0.0048% ( $\pm 0.0035$ ) <i>a</i>	Godebo <i>et al.</i> (2020)
<i>Arthrobacter</i>	<b>1.33% (<math>\pm 0.05</math>) <i>b</i></b>	0.71% ( $\pm 0.05$ ) <i>ab</i>	0.50% ( $\pm 0.06$ ) <i>a</i>	Godebo <i>et al.</i> (2020)
<i>Bacillus</i>	0.63% ( $\pm 0.03$ ) <i>ab</i>	0.47% ( $\pm 0.12$ ) <i>a</i>	<b>1.95% (<math>\pm 0.05</math>) <i>b</i></b>	Godebo <i>et al.</i> (2020) & Wakelin <i>et al.</i> (2002) & this study
<i>Brevibacillus</i>	nd	0.002% ( $\pm 0.002$ ) <i>a</i>	0.009% ( $\pm 0.009$ ) <i>a</i>	Godebo <i>et al.</i> (2020)
<i>Burkholderia</i>	0.09% ( $\pm 0.01$ ) <i>a</i>	0.11% ( $\pm 0.01$ ) <i>a</i>	0.07% ( $\pm 0.02$ ) <i>a</i>	Heungens & Parke (2000)
<i>Flavobacterium</i>	0.45% ( $\pm 0.08$ ) <i>a</i>	0.68% ( $\pm 0.21$ ) <i>a</i>	0.65% ( $\pm 0.02$ ) <i>a</i>	Godebo <i>et al.</i> (2020)
<i>Lysobacter</i>	<b>1.13% (<math>\pm 0.11</math>) <i>b</i></b>	0.81% ( $\pm 0.09$ ) <i>ab</i>	0.64% ( $\pm 0.04$ ) <i>a</i>	Godebo <i>et al.</i> (2020)
<i>Microbacterium</i>	0.11% ( $\pm 0.01$ ) <i>a</i>	0.07% ( $\pm 0.01$ ) <i>a</i>	0.08% ( $\pm 0.01$ ) <i>a</i>	Godebo <i>et al.</i> (2020)
<i>Paenibacillus</i>	0.19% ( $\pm 0.04$ ) <i>ab</i>	<b>0.31% (<math>\pm 0.07</math>) <i>b</i></b>	0.07% ( $\pm 0.01$ ) <i>a</i>	Godebo <i>et al.</i> (2020) & Wakelin <i>et al.</i> (2002)
<i>Pantoea</i>	nd	0.0046% ( $\pm 0.0052$ ) <i>a</i>	0.0046% ( $\pm 0.0036$ ) <i>a</i>	Godebo <i>et al.</i> (2020)
<i>Pseudomonas</i>	0.28% ( $\pm 0.02$ ) <i>a</i>	0.45% ( $\pm 0.01$ ) <i>a</i>	0.27% ( $\pm 0.04$ ) <i>a</i>	Godebo <i>et al.</i> (2020) & this study
<i>Rhizobium</i>	0.56% ( $\pm 0.02$ ) <i>ab</i>	<b>2.4% (<math>\pm 0.91</math>) <i>b</i></b>	0.46% ( $\pm 0.05$ ) <i>a</i>	Godebo <i>et al.</i> (2020)
<i>Stenotrophomonas</i>	0.01% ( $\pm 0.01$ ) <i>a</i>	0.05% ( $\pm 0.02$ ) <i>a</i>	0.03% ( $\pm 0.02$ ) <i>a</i>	Godebo <i>et al.</i> (2020)
<i>Streptomyces</i>	4.16% ( $\pm 0.08$ ) <i>a</i>	3.98% ( $\pm 0.62$ ) <i>a</i>	4.99% ( $\pm 0.11$ ) <i>a</i>	Godebo <i>et al.</i> (2020)
<i>Variovorax</i>	0.25% ( $\pm 0.02$ ) <i>a</i>	0.29% ( $\pm 0.05$ ) <i>a</i>	0.20% ( $\pm 0.004$ ) <i>a</i>	Godebo <i>et al.</i> (2020)
<b>Fungi</b>				
<i>Trichoderma</i>	0.45% ( $\pm 0.14$ ) <i>a</i>	4.7% ( $\pm 2.2$ ) <i>b</i>	0.25% ( $\pm 0.04$ ) <i>ab</i>	Dandurand <i>et al.</i> (1993)
<i>Glomus</i>	0.004% ( $\pm 0.007$ ) <i>a</i>	0.001% ( $\pm 0.002$ ) <i>a</i>	0.001% ( $\pm 0.002$ ) <i>a</i>	Thygesen <i>et al.</i> (2004)
<i>Funneliformis</i>	0.01% ( $\pm 0.01$ ) <i>a</i>	0.01% ( $\pm 0.01$ ) <i>a</i>	0.05% ( $\pm 0.02$ ) <i>a</i>	Bødker <i>et al.</i> (2002) & Rosendahl (1985)





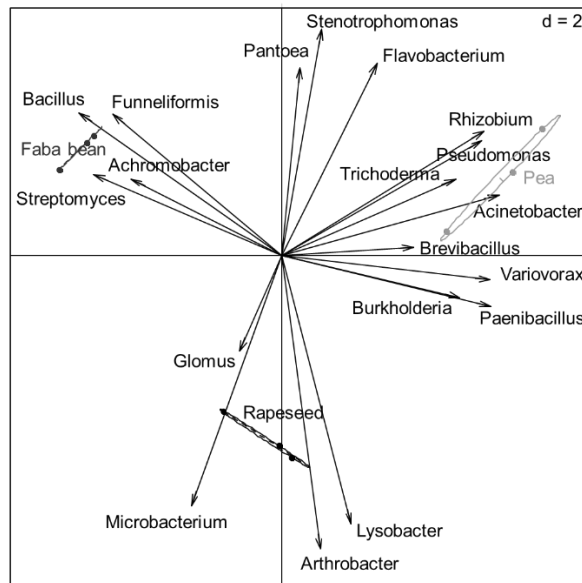


Figure 8: Principal component plots of the pea, rapeseed and faba bean rhizospheres from antagonistic bacterial and fungal genera matrices of OTUs relative abundance.

#### 4. Discussion

##### 4.1. Identification of potential biocontrol agents against *A. euteiches* from crop rhizosphere

Using microorganisms as biocontrol agent represents a realistic alternative to manage crop diseases. The value of these microorganisms is well studied and described [61–64]. In this study, 3 different crop rhizospheres were explored for bacterial biocontrol potential. Rapeseed, pea and faba bean were chosen to diversify environments and maximize the probability to isolate bacterial antagonist. Eight bacterial isolates with *in vitro* antagonism towards *A. euteiches* were successfully screened from rapeseed and faba bean rhizospheres. These strains were identified as belonging to *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Acinetobacter* genera. *Pseudomonas* and *Bacillus* represented the most prominent bacterial genera including species well-known for their interest in disease management [65–67]. Various inoculants are indeed available as commercial inoculant for biological control [68]. Similarly, the biocontrol potential of *Acinetobacter* strains had also already been described against different pathogens [69–71]. Several microbial genera have been identified as potential biocontrol agents against *A. euteiches* such as *Pseudomonas fluorescens* [72,73], *Burkholderia cepacia* [74], *Gliocladium roseum* [75], *Clonostachys rosea* [76], *Trichoderma harzianum* [77] or arbuscular mycorrhizal fungi [78,79]. More recently, Godebo *et al.*, (2020) realized a screening of soil bacterial isolates and pointed out the multitude of genera found in soil and presenting a biocontrol interest towards pea root rot, including those also described in this study. To our knowledge, it is the first time than an *Acinetobacter* strain were showed to have a biocontrol potential towards *A. euteiches*.

Microbial agents used for biological control act through a great variety of mechanisms such as antibiosis, hyperparasitism, competition, induction of plant defense and plant growth promotion [80]. The complementary screening methodologies could give some clues concerning modes of action. With the first assay, most strains were totally overlaid by the pathogen while others possessed ability to repulse and forced it to circumvent bacterial colony. This could be linked to very local production of specific metabolites repulsing the pathogen without impacting its global growth. Only 17 isolates seemed to be antagonist and stopped mycelium growth, reflecting direct antibiosis and/or parasitism towards *A. euteiches*. With classical confrontation dual plate assay, only 8 out of 17 bacterial strains remotely limited



*A. euteiches* growth. These bacterial strains seemed to secrete bioactive metabolites diffusing in the medium to limit pathogen growth. The variation in the degree of *A. euteiches* growth inhibition observed among screened isolates, was probably linked to different biocontrol arsenal of bacteria [35,81]. Soil-borne bacteria belonging to *Pseudomonas* genus are well known to present multiple traits of interest for biocontrol. Numerous strains were showed to produce a wide variety of antimicrobial metabolites, such as 2,4-diacetylphloroglucinaol, phenazine-1-carboxylic acid, pyoluteorin, pyrrolnitrin that play a prominent role in the suppression of soilborne plant pathogens [82–86]. Similarly, plentiful soil-borne members of the *Bacillus* genus produce a large range of bioactive metabolites including bacteriocins, antimicrobial peptides and lipopeptides, polyketides and siderophores [87,88]. Some *Acinetobacter* strains were also showed to produce interesting antimicrobial metabolites for pathogen inhibition, such as the antifungal compounds iturin, [89]. Generally, direct antagonism results from combined production of secondary metabolites and cell wall degrading enzymes, that impaired mycelium growth. Cell degradation is caused by a range of lytic enzymes, like chitinase, protease and cellulase activities, classically searched enzymatic panel during biocontrol screening [90]. Cellulase is particularly relevant for hyperparasitism towards oomycota. Here, no specific enzymatic pattern could be distinct for bacterial isolates with closed or even long-distance effect and even no detected activities for I2-RSF and I6-RSF isolates. In this study, all tested enzymatic activities have been highlighted at least once in *Pseudomonas* isolates. Existence of characterized chitinolytic, proteolytic and cellulolytic activities of biocontrol *Pseudomonas* strains have already been described [91–93], as for *Bacillus* sp. [94–97]. However only proteolytic activity was observed here for all *Bacillus* isolates. Lastly, although these 3 tested enzymatic activities have been reported in *Acinetobacter* spp. [69,98,99], none of them appeared to be produced here by I2-RSF. Finally, besides antagonisms through antibiosis or parasitism, another possible mechanism of action could be competitive interaction for nutrients and space [65,100,101]. Further assessments are now needed to evaluate the actual efficiency of these bacterial isolate to protect pea. Indeed, some bacterial strains that showed interesting *in vitro* potential could sometimes failed to reduce plant symptoms in controlled conditions [35]. Furthermore, microbial antagonist would have to be tested in natural field conditions. Indeed, numerous studies showed a problematic huge difference between *in vitro*, *in vivo* and *in situ* deployment. One challenge in the development of biocontrol solution based on microorganisms stay the difficulty to transfer technology to natural complex environment, where various factors of influence could interact and impede strategy success, particularly climatic conditions, soil parameters, cultural practices or coalition of several pathogens associated in a disease complex, such as in the case of pea root rot [102]. In this context, deciphering both the fine mechanisms of action of microbial biocontrol agents to optimize their action and understand the complexity of pathobiome functioning remains an essential for reliable integrated pest management.

#### 4.2 Determinism of microbiome structure and diversity in rhizosphere

The crucial influence of plants on microbiome assembly is clearly demonstrated in a multitude of studies [103–107]. Here, analyzes of assigned OTUs in the metabarcoding dataset showed that the structure of bacterial communities was distinct between the 3 crops. Particularly, a clear differentiation between rapeseed and pea could be highlighted even though they were co-localized in the same field, under similar soil physicochemical characteristics. Crop influence remained in this case the only deciding factor for bacterial microbiome structuration. Root exudation by plants of a large range of molecules, including numerous primary metabolites like sugars, amino acids or carboxylic acids and various secondary metabolites, constitute indeed the major driver shaping microbial community in the rhizosphere [108]. These secreted compounds represent both readily available nutrient supporting microbial growth but also a multitude of signaling molecules acting on microorganisms [44,46,109]. The composition of root exudates greatly varies according to plant species, and so do their associated microbiome [37]. In faba bean rhizosphere, here, the distinct bacterial community probably resulted from the combined effect of plant and soil parameters [110]. Indeed, soil edaphic characteristics have been shown to influence strongly microbial community [37], with soil pH and soil type generally considered as the major predictors [111–113].



Rhizospheres were here mostly predominated by Proteobacteria and Actinobacteria, particularly abundant and widespread in soils and plant rhizospheres [107,114–117]. These two phyla encompassed a plethora of species showing large metabolic diversity, with key role in the principal biogeochemical nutrient cycling [117,118]. Moreover, numerous Proteobacteria and Acidobacteria presented interesting abilities to promote plant growth and health [117,118]. Here, Actinobacteria dominated faba bean rhizosphere, whereas Proteobacteria dominated the 2 others, as previously described [119–122]. Several other low-abundance bacterial phyla were detected as differentially balanced between the 3 crops. These bacterial groups, classical described as minor members of plant rhizosphere, support important potential functions in soils [37,119–121,123]. Acidobacteria, more present in pea rhizosphere, is ubiquitous and mostly dominant in soils [124] but less in rhizospheres [125]. Their ecological functions stay poorly understood, although probably involved in biogeochemical cycles [126]. Similarly, a higher abundance of Nitrospirae, particularly implicated in nitrification process [127], could be detected in pea rhizosphere. Both rapeseed and pea rhizospheres harbored more abundant Chloroflexi, known to be widespread in soil with possible functions in nitrogen and carbon cycling [114,128,129]. Planctomycetes, more abundant under rapeseed, have already be found in a wide range of soil habitats, even though very little is known about their functions [130]. Faba bean hosted more abundant Firmicutes population, that constitute generally a significant proportion of soil microorganisms with implication in nitrogen cycling [131]. Diverse Candidatus Saccharibacteria, also well represented under this crop, are often found in rhizosphere, although little is known about their metabolism and functions [132]. Recently, Starr *et al.*, (2018) showed that a member of Candidatus Saccharibacteria was able to use microbially-processed plant-derived carbon. Verrucomicrobia, one of the less frequent in soils and still poorly understood [133], was more present in faba bean rhizosphere. Finally, Bacteroidetes and Gemmatimonadetes were equally abundance in the 3 crop rhizospheres. These phyla were commonly and consistently detected in all terrestrial systems [131,134].

For fungal community, analysis of assigned OTUs showed a distinct structuration between faba bean and the 2 other crops. Fungal community appeared to be more strongly influence by soil characteristics than bacterial community. Similarly, Singh *et al.*, (2009) observed that soil location is the most important factor structuring fungal community. The tenuous difference between pea and rapeseed showed that the influence of crop on fungal community appeared to be secondary [110]. Besides soil properties, differences in farming practices between the two fields could also represent a determining factor of fungal structuration [135]. Ascomycota was massively predominant in the 3 studied rhizospheres, as classically observed, followed by Basidiomycota and Zygomycota [121,123,136,137]. The relative abundance of these 2 phyla was variable between the 3 crops, with a particularly high abundance of Zygomycota associated with faba bean, contrary to other studies [122,123]. All other observed fungal phyla stay globally marginal for all crops, as previously observed [121,123,137].

#### 4.3 Crop incidence on beneficial microbial assemblage

The use of microbial biocontrol agents generally relies on the artificial inoculation in the fields. The ability of these microorganisms to colonize and persist in plant rhizosphere constitutes the prerequisite for successful disease management [138–140]. Indeed, introduced bioagents must compete with indigenous microbial community [141,142]. A suitable strategy for the screening of biocontrol candidates is to specifically target microorganisms inhabiting rhizosphere. Rhizobacteria constitute the most likely pool of organisms clustering desirable rhizosphere competences, maximizing for further successful colonization of this habitat [24,29,143,144]. Three different rhizospheric environments were explored here to find reliable antagonist towards *A. euteiches*. Because faba bean is a resistant host, a focus on the microbiome in this suppressive niche seemed particularly relevant. In parallel, the prospection of pea rhizosphere could allow to find well adapted isolates to that plant, more likely to be competitive when re-introduced. And finally, brassicaceous rhizosphere, through the production well known bioactive secondary metabolites called glucosinolates, constitute a very selective and specific habitat for microbial community [145,146]. In this study, several promising bacterial antagonists were isolated from faba bean and rapeseed rhizosphere, contrary to pea. So, a clear influence of crop species



on antagonistic rhizobacteria towards *A. euteiches* could be highlighted, as observed by Berg *et al.*, (2002, 2006) towards *Verticillium dahliae*. Numerous authors postulated that plants would be able to actively recruit beneficial microorganisms in accordance with their requirements, as first line of defense against pathogens [30,41,147]. Here, through the culturable approach, pea rhizosphere appeared to be a non-advantageous environment, with ineffective selection of microbial antagonists, contrary to faba bean. The reduced ability of pea to recruit beneficial partners to sustain root rot resistance could exacerbate high susceptibility to *A. euteiches* in fields. Cultures of winter pea, considered as sensitive to *A. euteiches* as spring pea, were nevertheless observed to be less affected by root rot in field. The major postulate for this partial disease escape relies on temporal spacing between vulnerable stage of plant and favorable period for pathogen development [12]. However, deciphering the ability of winter cultivars to select beneficial rhizospheric partners and the consequences for both their tolerance and modulation of soil suppressiveness must be explored.

Besides classical culturable approach, exploring the biocontrol potential of microbiome by assessing global assemblage of beneficial populations would contribute to a better understanding and exploitation of plant microbe interactions to counteract pathogens. Indeed, an alternative could be to rely on modulating beneficial microbial associations in soils, leading to natural disease suppressiveness. Soil suppressiveness constitutes the best example of the key role that could play native microbial community on plant protection against soil-borne pathogens [32]. A large pool of bacterial and fungal antagonists, able to interfere with pathogen development, were generally encountered naturally in most soils [148,149]. Since plants constitute a key factor shaping global microbial community, the comprehension of their roles in modeling beneficial association of antagonist in the rhizosphere appeared essential for reliable disease management [41,108,150]. Based on this study and the previous ones identifying antagonist towards *A. euteiches* [35,74,78,79,81,151,152], *in silico* analyzes of bacterial and fungal OTUs dataset were achieved. Distinct combination of potential antagonistic genera was observed according to crop species. Some populations appeared to be more dedicated to each crop. These microbial assemblages could be in relation with specific requirements of each plant species [40,41]. Pea rhizosphere hosted an abundant population of *Rhizobium* strains, as expected because of symbiosis for nitrogen fixation. On the contrary, surprisingly, a similar high abundance was not recorded in faba bean rhizosphere. Interestingly, pea rhizosphere also harbored abundant *Pseudomonas* populations, gathering multiples known strains of biocontrol interest [65], particularly against *A. euteiches* [152], whereas no antagonist strain was successfully isolated from pea here. The use of specific medium to target *Pseudomonas* could allow a more profound prospection of these microorganisms to find interesting isolates. Landa *et al.* (2002) similarly described a high *Pseudomonas* abundance associated with pea. Co-inoculation of *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains showed a great potential to promote pea growth and production [154]. Pea rhizosphere also hosted abundant *Trichoderma* populations, well known for their biocontrol potential (Harman, 2006), including towards *A. euteiches* [152]. Screening fungal diversity instead of bacteria could be interesting to explore the biocontrol potential of this community. Contrary to the previous observation from the culturable approach, rhizospheric microbiome of pea seemed to possess an interesting potential for biocontrol. This ability to recruit *Rhizobium*, *Pseudomonas* and *Trichoderma* could finally constitute one of the factors explaining disease escape of winter pea in fields. Finally, *Paenibacillus*, *Acinetobacter* and *Variovorax* had already been described for their PGPR effect on pea growth [155–157]. Faba bean rhizosphere appeared to be more characterized by richer *Bacillus* and *Streptomyces* populations, known for multiple PGPR and biocontrol benefits on this crop [158–161]. Similarly, abundant populations of *Achromobacter* and of the arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis* were noticed, in relation with plant nutrient needs, principally towards phosphorus and nitrogen [162–164]. Rapeseed hosted comparatively a higher abundance of *Arthrobacter*, *Microbacterium* and *Lysobacter*. Some strains belonging to first two bacterial genera were well described for their ability to solubilize phosphorus and mineralize organic sulfur [165–167]. Because rapeseed is known to present a high phosphorus and sulfur requirement [168], recruiting phosphorus-solubilizing and arylsulfatase-producing microorganisms would be advantageous. Lastly,





strains of the bacterial genera *Lysobacter* were associated with biocontrol abilities, for example towards clubroot disease caused by *Plasmodiophora brassicae* and impacted cruciferous crop [169].

The primary interest of this study remained to highlight the influence of plant species on beneficial microbial populations in their rhizosphere. Once again, selective enrichment of biocontrol agent in plant rhizosphere under the influence of crop species towards *A. euteiches* is totally in accordance with previous observation in the case of *V. dahlia* [148,149,170]. As plant could adjust their associated microbiome in front of pathogen attack to promote disease suppressiveness [41], deciphering the beneficial microorganisms recruited in the pea rhizosphere in conjunction with *A. euteiches* presence could be very informative for the global understanding of this pathobiome. Besides crop influence, soil parameters could also play a role in shaping antagonists' assemblage [149], leading to more abundant *Bacillus* and *Streptomyces* populations with faba bean.

#### 4.4 Microbial recruitment and modulation of assemblage at the benefit of plant health

The exceptional potential of microbiome to sustain plant health opens prospects for the future of sustainable disease management. The objective would be to construct and optimize soil habitat in order to promote the establishment of robust beneficial interactions between plant and indigenous microorganisms leading to the elaboration of soil suppressiveness at field scale [41,171]. Numerous agricultural practices, such as tillage, input of organic matter or artificial inoculation of biocontrol agents could markedly impact microbial community and constitute de facto valuable tools to shape beneficial assembly [108]. The importance of plant-driven selection on microbiome is here clearly relevant as a promising and sustainable strategy for target enrichment towards beneficial functions [41,172]. The influence of plant species could be larger than only strictly limited to the closed rhizosphere [171,173,174]. The pool of available microbial partners in soils for the newly forming rhizosphere is directly the legacy of those recruited by the previous crop [175]. Crop rotation constitutes a secular tool commonly used to manage soil fertility and plant health, which major expected benefit is to reduce density of soil-borne pathogens [176]. All the results obtained here highlighted the necessity to consider this practice also as a powerful tool to customize beneficial microbial community, based on soil state and plant requirement, in order to manage pea root rot [108,150,177,178].

#### 5. Conclusion

The multiple nutritional, agronomic, environmental and economic benefits carried out by pea, make it valuable crop to be included in agrosystems. However, the threat caused by *A. euteiches* lead to massive disengagement of farmers towards this crop. The absence of reliable existing solutions to efficiently mitigate pea root rot triggers intense researches. The use of microbial agent for biological control of soil-borne pathogens represents a promising alternative to overcome currently impasses. In this study, several antagonistic bacterial isolates, able to limit *A. euteiches* growth, were successfully screened from the rhizosphere of faba bean and rapeseed. The main supposed mechanism of action relied on the production of specific unknown metabolites and a panel of lytic enzymes. Surprisingly, no culturable antagonists were found in pea rhizosphere.

Observed differences in the structure and diversity of bacterial community was clearly due to plant-driven selection, whereas soil type seemed to be determinant for fungi. Similarly, *in silico* analyzes of antagonistic microbial populations showed distinct assemblages between the 3 crops. These observed dedicated beneficial communities were linked to specificity in selection and recruitment by crop species, probably through root exudation. The legacy of this microbiome modulation, governing by the previous crop, represent the reservoir of microorganisms for the following culture, and so the bricks for a build-up of suppressiveness. These findings highlighted the potential of crop rotation to shape microbial community at the benefit of plant health, through the enrichment of antagonistic agents, as a pertinent approach to manage pea root rot.



**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Table S1: Physico-chemical characteristic of rhizospheric soil from the 3 studied crops, Table S2: Relative abundance for each fungal phylum per rhizosphere. Table S3: Relative abundance for each bacterial phylum per rhizosphere.

**Author Contributions:** All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved for publication. Conceptualization, Adrien Gauthier and Mélanie BRESSAN; Formal analysis, Pauline Lusley; Funding acquisition, Isabelle Trinsoutrot-Gattin and Karine Laval; Methodology, Pauline Lusley, Adrien Gauthier and Mélanie BRESSAN; Project administration, Isabelle Trinsoutrot-Gattin and Karine Laval; Supervision, Adrien Gauthier, Karine Laval and Mélanie BRESSAN; Validation, Adrien Gauthier, Isabelle Trinsoutrot-Gattin, Karine Laval and Mélanie BRESSAN; Writing – original draft, Pauline Lusley, Adrien Gauthier and Mélanie BRESSAN; Writing – review & editing, Adrien Gauthier and Mélanie BRESSAN.

**Acknowledgments:** The authors acknowledge the support provided by the region Normandy, the University of Rouen-Normandie and the SFR Normandie Végétale. The authors want also to particularly acknowledge François d’Hubert for his help in the field and farmers of the “Groupement d’Intérêt Economique et Environnementale” (GIEE), focused on winter pea, for their participation to this study by giving access to their farm plots.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Calles, T. The International Year of Pulses: what are they and why are they important. 2016. Tropical Agriculture Association, 1–3. <http://www.fao.org/3/a-bl797e.pdf>.
2. Calles, T.; Xipsiti, M.; del Castello, R. Legacy of the International Year of Pulses. *Environ Earth Sci* **2019**, *78*, 124, doi:10.1007/s12665-019-8106-6.
3. Grünwald, N.J.; Chen, W.; Larsen, R.C. Pea Diseases and their Management. In *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II*; Naqvi, S.A.M.H., Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 2004; pp. 301–331 ISBN 978-1-4020-1823-7.
4. Gaulin, E.; Jacquet, C.; Bottin, A.; Dumas, B. Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mol. Plant Pathol.* **2007**, *8*, 539–548, doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00413.x.
5. Wu, L.; Chang, K.-F.; Conner, R.L.; Strelkov, S.; Fredue-Agyeman, R.; Hwang, S.-F.; Feindel, D. *Aphanomyces euteiches*: A Threat to Canadian Field Pea Production. *Engineering* **2018**, *4*, 542–551, doi:10.1016/j.eng.2018.07.006.
6. Pfender, W.F.; Hagedorn, D.J. Disease progress and yield loss in *Aphanomyces* root rot of peas. *Phytopathology* **1983**, *73*, 1109–1113, doi: 10.1094/Phyto-73-1109.
7. Barzman M., Barberi P., Birch A. N. E., Boonekamp P., Dachbrodt-Saaydeh S., Graf B., Hommel B., Jensen J. E., Kiss J., Kudsk P.; et al. Eight principles of integrated pest management. *Agron. Sustain. Dev.* **2015**, *35*, 1199–1215, doi:10.1007/s13593-015-0327-9.
8. Pilet-Nayel, L.; Muehlbauer, F.J.; McGee, R.J.; Kraft, J.M.; Baranger, A.; Coyne, C.J. Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. *Theor. Appl. Genet.* **2002**, *106*, 28–39, doi:10.1007/s00122-002-0985-2.
9. Pilet-Nayel, M.L.; Muehlbauer, F.J.; McGee, R.J.; Kraft, J.M.; Baranger, A.; Coyne, C.J. Consistent quantitative trait loci in pea for partial resistance to *Aphanomyces euteiches* isolates from the United States and France. *Phytopathology* **2005**, *95*, 1287–1293, doi:10.1094/PHYTO-95-1287.



10. Wicker, E.; Moussart, A.; Duparque, M.; Rouxel, F. Further contributions to the development of a differential set of pea cultivars (*Pisum sativum*) to investigate the virulence of isolates of *Aphanomyces euteiches*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2003**, *109*, 47–60, doi:10.1023/A:1022020312157.
11. Hamon, C.; Baranger, A.; Coyne, C.J.; McGee, R.J.; Le Goff, I.; L'anthoëne, V.; Esnault, R.; Rivière, J.-P.; Klein, A.; Mangin, P.; et al. New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple French and American environments. *Theor. Appl. Genet.* **2011**, *123*, 261–281, doi:10.1007/s00122-011-1582-z.
12. Desgroux, A.; Baudais, V.N.; Aubert, V.; Le Roy, G.; de Larambergue, H.; Miteul, H.; Aubert, G.; Boutet, G.; Duc, G.; Baranger, A.; et al. Comparative genome-wide-association mapping identifies common loci controlling root system architecture and resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea. *Front Plant Sci.* **2018**, *8*, 2195, doi:10.3389/fpls.2017.02195.
13. McDonald, B.A.; Linde, C. Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential, and Durable Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2002**, *40*, 349–379, doi:10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443.
14. Moussart, A.; Even, M.N.; Tivoli, B. Reaction of genotypes from several species of grain and forage legumes to infection with a French pea isolate of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2008**, *122*, 321–333, doi:10.1007/s10658-008-9297-y.
15. Gangneux, C.; Cannesan, M.-A.; Bressan, M.; Castel, L.; Moussart, A.; Vicré-Gibouin, M.; Driouich, A.; Trinsoutrot-Gattin, I.; Laval, K. A Sensitive Assay for rapid detection and quantification of *Aphanomyces euteiches* in soil. *Phytopathology* **2014**, *104*, 1138–1147, doi: 10.1094/PHYTO-09-13-0265-R.
16. Oyarzun, P.; Gerlagh, M.; Hoogland, A.E. Relation between cropping frequency of peas and other legumes and foot and root rot in peas. *Neth. J. Plant Pathol.* **1993**, *99*, 35–44, doi:10.1007/BF01974783.
17. Moussart, A.; Even, M.N.; Lesné, A.; Tivoli, B. Successive legumes tested in a greenhouse crop rotation experiment modify the inoculum potential of soils naturally infested by *Aphanomyces euteiches*. *Plant Pathol.* **2013**, *62*, 545–551, doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02679.x.
18. Fritz, V.A.; Allmaras, R.R.; Pflieger, F.L.; Davis, D.W. Oat residue and soil compaction influences on common root rot (*Aphanomyces euteiches*) of peas in a fine-textured soil. *Plant Soil* **1995**, *171*, 235–244, doi:10.1007/BF00010277.
19. Hossain, S.; Bergkvist, G.; Glinwood, R.; Berglund, K.; Mårtensson, A.; Hallin, S.; Persson, P. Brassicaceae cover crops reduce *Aphanomyces* pea root rot without suppressing genetic potential of microbial nitrogen cycling. *Plant Soil* **2015**, *392*, 227–238, doi:10.1007/s11104-015-2456-y.
20. Papavizas, G.C.; Ayers, W.A. *Aphanomyces* species and their root diseases in pea and sugar beet. *Tech. Bull. Agric. Res. Serv. US Dep. Agric.* **1974**, *1485*, 1–159.
21. Pal, K.K.; McSpadden Gardener, B. Biological Control of Plant Pathogens. *Plant Health Instr.* **2006**, 1–25, doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
22. O'Brien, P.A. Biological control of plant diseases. *Australas. Plant Pathol.* **2017**, *46*, 293–304, doi:10.1007/s13313-017-0481-4.
23. Jeyarajan, R.; Nakkeeran, S. Exploitation of Microorganisms and Viruses as Biocontrol Agents for Crop Disease Management. In *Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture: Crop Diseases, Weeds, and Nematodes*; Upadhyay, R.K., Mukerji, K.G., Chamola, B.P., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2000; pp. 95–116 ISBN 978-1-4615-4209-4.



24. Whipps, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 487–511, doi:10.1093/jexbot/52.suppl\_1.487.
25. Berg, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 11–18, doi:10.1007/s00253-009-2092-7.
26. Singh, H.B. Management of Plant Pathogens with Microorganisms. *Proceedings of the Indian National Science Academy* **2014**, *80*, 443, doi:10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55120.
27. Mazzola, M. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *A. Van Leeuw.* **2002**, *81*, 557–564, doi:10.1023/A:1020557523557.
28. Weller, D.M.; Raaijmakers, J.M.; Gardener, B.B.M.; Thomashow, L.S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2002**, *40*, 309–348, doi:10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010.
29. Raaijmakers, J.M.; Paulitz, T.C.; Steinberg, C.; Alabouvette, C.; Moëgne-Loccoz, Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* **2009**, *321*, 341–361, doi:10.1007/s11104-008-9568-6.
30. Mendes, R.; Kruijt, M.; de Bruijn, I.; Dekkers, E.; van der Voort, M.; Schneider, J.H.M.; Piceno, Y.M.; DeSantis, T.Z.; Andersen, G.L.; Bakker, P.A.H.M.; et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* **2011**, *332*, 1097–1100, doi:10.1126/science.1203980.
31. Schlatter, D.; Kinkel, L.; Thomashow, L.; Weller, D.; Paulitz, T. Disease suppressive soils: new insights from the soil microbiome. *Phytopathology* **2017**, *107*, 1284–1297, doi:10.1094/PHYTO-03-17-0111-RVW.
32. Gómez Expósito, R.; de Bruijn, I.; Postma, J.; Raaijmakers, J.M. Current insights into the role of rhizosphere bacteria in disease suppressive soils. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fmicb.2017.02529.
33. Bibi, F.F.I.; Yasir, M.S.; Song, G.C.; Lee, S.Y.; Chung, Y.R. Diversity and characterization of endophytic bacteria associated with tidal flat plants and their antagonistic effects on oomycetous plant pathogens. *Plant Pathol. J.* **2012**, *28*, 20–31, doi:10.5423/PPJ.OA.06.2011.0123
34. Shrestha, A.; Park, S.H.; Shrestha, B.; Kim, K.; Chae, J.C.; Lee, K.J. Biological Control of Oomycetous Plant Pathogens: A Review. *Nepal J. Sci. Technol.* **2014**, *15*, 157–166, doi:10.3126/njst.v15i1.12033
35. Godebo, A.T.; Germida, J.J.; Walley, F.L. Isolation, identification, and assessment of soil bacteria as biocontrol agents of pea root rot caused by *Aphanomyces euteiches*. *Can. J. Soil. Sci.* **2020**, 1–11, doi:10.1139/cjss-2019-0133.
36. Olanrewaju, O.S.; Ayangbenro, A.S.; Glick, B.R.; Babalola, O.O. Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 1155–1166, doi:10.1007/s00253-018-9556-6.
37. Philippot, L.; Raaijmakers, J.M.; Lemanceau, P.; van der Putten, W.H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 789–799, doi:10.1038/nrmicro3109.
38. Orozco-Mosqueda, M. del C.; Rocha-Granados, M. del C.; Glick, B.R.; Santoyo, G. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiol. Res.* **2018**, *208*, 25–31, doi:10.1016/j.micres.2018.01.005.
39. Martínez-Hidalgo, P.; Maymon, M.; Pule-Meulenberg, F.; Hirsch, A.M. Engineering root microbiomes for healthier crops and soils using beneficial, environmentally safe bacteria. *Can. J. Microbiol.* **2019**, *65*, 91–104, doi:10.1139/cjm-2018-0315.





40. Lareen, A.; Burton, F.; Schäfer, P. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol Biol* **2016**, *90*, 575–587, doi:10.1007/s11103-015-0417-8.
41. Berendsen, R.L.; Pieterse, C.M.J.; Bakker, P.A.H.M. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* **2012**, *17*, 478–486, doi:10.1016/j.tplants.2012.04.001.
42. Mueller, U.G.; Sachs, J.L. Engineering microbiomes to improve plant and animal health. *Trends Microbiol.* **2015**, *23*, 606–617, doi:10.1016/j.tim.2015.07.009.
43. Gransee, A.; Wittenmayer, L. Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **2000**, *163*, 381–385, doi:10.1002/1522-2624(200008)163:4<381::AID-JPLN381>3.0.CO;2-7.
44. Bais, H.P.; Weir, T.L.; Perry, L.G.; Gilroy, S.; Vivanco, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* **2006**, *57*, 233–266, doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.
45. Uren, N.C. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In *The Rhizosphere, Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*; CRC, 2007; pp. 1–21 ISBN Boca Raton.
46. Sasse, J.; Martinoia, E.; Northen, T. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in Plant Science* **2018**, *23*, 25–41, doi:10.1016/j.tplants.2017.09.003.
47. Kjeldahl, J. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z. Anal. Chem.* **1883**, *22*, 366–382, doi: 10.1007/BF01338151.
48. Tirol-Padre, A.; Ladha, J.K. Assessing the reliability of permanganate-oxidizable carbon as an index of soil labile carbon. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2004**, *68*, 969–978, doi:10.2136/sssaj2004.9690.
49. Wicker, E.; Hullé, M.; Rouxel, F. Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathol.* **2001**, *50*, 433–442, doi:10.1046/j.1365-3059.2001.00590.x.
50. Okay, S.; Tefon, B.E.; Ozkan, M.; Ozcengiz, G. Expression of chitinase A (chiA) gene from a local isolate of *Serratia marcescens* in Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *104*, 161–170, doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03570.x.
51. Kumari, P.; Jandaik, S.; Batta, S. A thermotolerant protease from *Bacillus* sp– isolation, characterization, optimization and purification. *J. Pure Appl Microbio.* **2014**, *8*, 3667–3674, doi: 10.1007/s13205-016-0377-y
52. Kim, Y.-K.; Lee, S.-C.; Cho, Y.-Y.; Oh, H.-J.; Ko, Y.H. Isolation of cellulolytic *Bacillus subtilis* strains from agricultural environments. *ISRN Microbiol.* **2012**, ID 650563, doi:10.5402/2012/650563.
53. Marchesi, J.R.; Sato, T.; Weightman, A.J.; Martin, T.A.; Fry, J.C.; Hiom, S.J.; Wade, W.G. Design and Evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 795–799, doi:10.1128/AEM.64.2.795-799.1998.
54. Muyzer, G.; de Waal, E.C.; Uitterlinden, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 695–700, doi: 10.1128/aem.59.3.695-700.1993.
55. Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2460–2461, doi:10.1093/bioinformatics/btq461.



56. Zaharia, M.; Bolosky, W.J.; Curtis, K.; Fox, A.; Patterson, D.; Shenker, S.; Stoica, I.; Karp, R.M.; Sittler, T. Faster and More Accurate Sequence Alignment with SNAP. **2011**, *arXiv:1111.5572 [cs, q-bio]*.
57. Cole, J.R.; Wang, Q.; Fish, J.A.; Chai, B.; McGarrell, D.M.; Sun, Y.; Brown, C.T.; Porras-Alfaro, A.; Kuske, C.R.; Tiedje, J.M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D633-642, doi:10.1093/nar/gkt1244.
58. Abarenkov, K.; Nilsson, R.H.; Larsson, K.-H.; Alexander, I.J.; Eberhardt, U.; Erland, S.; Høiland, K.; Kjølner, R.; Larsson, E.; Pennanen, T.; et al. The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytol.* **2010**, *186*, 281–285, doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03160.x.
59. Bokulich, N.A.; Subramanian, S.; Faith, J.J.; Gevers, D.; Gordon, J.I.; Knight, R.; Mills, D.A.; Caporaso, J.G. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 57–59, doi:10.1038/nmeth.2276.
60. R Development Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. **2004**.
61. Alabouvette, C.; Olivain, C.; Migheli, Q.; Steinberg, C. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.* **2009**, *184*, 529–544, doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03014.x.
62. Kannan, V.R.; Bastas, K.K. *Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria*; CRC Press, 2015; ISBN 978-1-4822-4054-2.
63. Syed Ab Rahman, S.F.; Singh, E.; Pieterse, C.M.J.; Schenk, P.M. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Sci.* **2018**, *267*, 102–111, doi:10.1016/j.plantsci.2017.11.012.
64. Ciancio, A.; Pieterse, C.M.J.; Mercado-Blanco, J. *Harnessing Useful Rhizosphere Microorganisms for Pathogen and Pest Biocontrol, Volume II*; Frontiers Media SA, 2019; ISBN 978-2-88963-200-8.
65. Santoyo, G.; Orozco-Mosqueda, M. del C.; Govindappa, M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Sci. Technol.* **2012**, *22*, 855–872, doi:10.1080/09583157.2012.694413.
66. Sivasakthi, S.; Usharani, G.; Saranraj, P. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *Afr. J. Agric. Res.* **2014**, *14*.
67. Khabbaz, S.E.; Zhang, L.; Cáceres, L.A.; Sumarah, M.; Wang, A.; Abbasi, P.A. Characterisation of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains for biocontrol potential and suppression of damping-off and root rot diseases. *Ann. Appl. Biol.* **2015**, *166*, 456–471, doi:10.1111/aab.12196.
68. Velivelli, S.L.S.; De Vos, P.; Kromann, P.; Declerck, S.; Prestwich, B.D. Biological control agents: from field to market, problems, and challenges. *Trends Biotechnol* **2014**, *32*, 493–496, doi:10.1016/j.tibtech.2014.07.002.
69. Trotel-Aziz, P.; Couderchet, M.; Biagianni, S.; Aziz, A. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environ. Exper. Bot.* **2008**, *64*, 21–32, doi:10.1016/j.envexpbot.2007.12.009.
70. Xue, Q.-Y.; Chen, Y.; Li, S.-M.; Chen, L.-F.; Ding, G.-C.; Guo, D.-W.; Guo, J.-H. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biol. Control* **2009**, *48*, 252–258, doi:10.1016/j.biocontrol.2008.11.004.



71. Labuschagne, N.; Pretorius, T.; Idris, A.H. Plant growth promoting rhizobacteria as biocontrol agents against soil-borne plant diseases. In *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*; Maheshwari, D.K., Ed.; Microbiology Monographs; Springer: Berlin, Heidelberg, 2011; pp. 211–230 ISBN 978-3-642-13612-2.
72. Parke, J.L. Biological control of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. *Plant Dis.* **1991**, *75*, 987, doi:10.1094/PD-75-0987.
73. Bowers, J.H.; Parke, J.L. Epidemiology of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. *Phytopathology* **1993**, *83*, 1466, doi:10.1094/Phyto-83-1466.
74. Heungens, K.; Parke, J.L. Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. *Phytopathology* **2001**, *91*, 383–391, doi:10.1094/PHYTO.2001.91.4.383.
75. Xue, A.G. *Gliocladium roseum* strains useful for the control of fungal pathogens in plants. **2002**, patent number: US6495133B1.
76. Xue, A.G. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology* **2003**, *93*, 329–335, doi:10.1094/PHYTO.2003.93.3.329.
77. Prashar, P.; Vandenberg, A. Genotype-specific responses to the effects of commercial *Trichoderma* formulations in lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*) in the presence and absence of the oomycete pathogen *Aphanomyces euteiches*. *Biocontrol Sci. Technol.* **2017**, *27*, 1123–1144, doi:10.1080/09583157.2017.1376035.
78. Bødker, L.; Kjøller, R.; Kristensen, K.; Rosendahl, S. Interactions between indigenous arbuscular mycorrhizal fungi and *Aphanomyces euteiches* in field-grown pea. *Mycorrhiza* **2002**, *12*, 7–12, doi:10.1007/s00572-001-0139-4.
79. Thygesen, K.; Larsen, J.; Bødker, L. Arbuscular mycorrhizal fungi reduce development of pea root-rot caused by *Aphanomyces euteiches* using oospores as pathogen inoculum. *E. J. Plant Pathol.* **2004**, *110*, 411–419, doi:10.1023/B:EJPP.0000021070.61574.8b.
80. Junaid, J.M.; Dar, N.A.; Bhat, T.A.; Bhat, A.H.; Bhat, M.A. Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *Intern. J. Mod. Plant Anim. Sci.* **2013**, *1*, 39–57.
81. Wakelin, S.A.; Walter, M.; Jaspers, M.; Stewart, A. Biological control of *Aphanomyces euteiches* root-rot of pea with spore-forming bacteria. *Australas. Plant Pathol.* **2002**, *31*, 401–407, doi:10.1071/AP02051.
82. Weller, D.M.; Thomashow, L.S. Use of rhizobacteria for biocontrol. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1993**, *4*, 306–311, doi:10.1016/0958-1669(93)90100-B.
83. Dowling, D.N.; O’Gara, F. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* **1994**, *12*, 133–141, doi:10.1016/0167-7799(94)90091-4.
84. Raaijmakers, J.M.; Weller, D.M.; Thomashow, L.S. Frequency of Antibiotic-Producing *Pseudomonas* spp. in Natural Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 881–887.
85. Haas, D.; Keel, C. Regulation of Antibiotic Production in Root-Colonizing *Pseudomonas* Spp. and Relevance for Biological Control of Plant Disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* **2003**, *41*, 117–153, doi:10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656.
86. Weller, D.M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* **2007**, *97*, 250–256, doi:10.1094/PHYTO-97-2-0250.



87. Sansinenea, E.; Ortiz, A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 1523–1538, doi:10.1007/s10529-011-0617-5.
88. Fira, D.; Dimkić, I.; Berić, T.; Lozo, J.; Stanković, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J. Biotechnol.* **2018**, *285*, 44–55, doi:10.1016/j.jbiotec.2018.07.044.
89. Liu, C.H.; Chen, X.; Liu, T.T.; Lian, B.; Gu, Y.; Caer, V.; Xue, Y.R.; Wang, B.T. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 in vitro and identification of its antifungal components. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 459–466, doi:10.1007/s00253-007-1010-0.
90. Köhl, J.; Kolnaar, R.; Ravensberg, W.J. Mode of action of microbial Biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Front Plant Sci.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fpls.2019.00845.
91. Neiendam Nielsen, M.; Sørensen, J. Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1999**, *30*, 217–227, doi:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00650.x.
92. Sindhu, S.S.; Dadarwal, K.R. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. *Cicer* in chickpea. *Microbiol. Res.* **2001**, *156*, 353–358, doi:10.1078/0944-5013-00120.
93. Siddiqui, I.A.; Haas, D.; Heeb, S. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 5646–5649, doi:10.1128/AEM.71.9.5646-5649.2005.
94. Das, S.N.; Sarma, P.V.S.R.N.; Neeraja, C.; Malati, N.; Podile, A.R. Members of Gammaproteobacteria and Bacilli represent the culturable diversity of chitinolytic bacteria in chitin-enriched soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 1875–1881, doi:10.1007/s11274-010-0369-8.
95. Sevinc, N.; Demirkan, E. Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties. *J. Biol. Environ. Sci.* **2011**, *10*.
96. Josephine, F.S. Isolation, production and characterization of protease from *Bacillus* sp. isolated from soil sample. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* **2012**, *7*.
97. Nandimath, A.P.; Kharat, K.R.; Gupta, S.G.; Kharat, A.S. Optimization of cellulase production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. soil isolates. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2016**, *10*, 410–419, doi:10.5897/AJMR2016.7954.
98. Ekperigin, M.M. Preliminary studies of cellulase production by *Acinetobacter anitratus* and *Branhamella* sp. *Afr. J. Biotechnol.* **2007**, *6*, doi:10.4314/ajb.v6i1.56088.
99. Ash, K.; Sushma; Lall, A.M.; Rao, K.P.; Ramteke, P.W. Production and optimization of an alkaline protease from *Acinetobacter variabilis* isolated from soil samples. *Int. J. Agric. Environ. Biotechnol.* **11**, 379–386.
100. Blumenstein, K.; Albrechtsen, B.R.; Martín, J.A.; Hultberg, M.; Sieber, T.N.; Helander, M.; Witzell, J. Nutritional niche overlap potentiates the use of endophytes in biocontrol of a tree disease. *Biocontrol* **2015**, *60*, 655–667, doi:10.1007/s10526-015-9668-1.
101. Ghorbanpour, M.; Omidvari, M.; Abbaszadeh-Dahaji, P.; Omidvar, R.; Kariman, K. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biol. Control* **2018**, *117*, 147–157, doi:10.1016/j.biocontrol.2017.11.006.
102. Hughes, T.J.; Grau, C.R. *Aphanomyces* root rot (common root rot) of legumes. In *The Plant health Instructor*; APS Press: St. Paul, MN, USA, 2007; pp. 1–8.





103. Marschner, P.; Yang, C.-H.; Lieberei, R.; Crowley, D.E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **2001**, *33*, 1437–1445, doi:10.1016/S0038-0717(01)00052-9.
104. Smalla, K.; Wieland, G.; Buchner, A.; Zock, A.; Parzy, J.; Kaiser, S.; Roskot, N.; Heuer, H.; Berg, G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 4742–4751, doi:10.1128/aem.67.10.4742-4751.2001.
105. Costa, R.; Götz, M.; Mrotzek, N.; Lottmann, J.; Berg, G.; Smalla, K. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, *56*, 236–249, doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00026.x.
106. Garbeva, P.; van Elsas, J.D.; van Veen, J.A. Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant Soil* **2008**, *302*, 19–32, doi:10.1007/s11104-007-9432-0.
107. Pii, Y.; Mimmo, T.; Tomasi, N.; Terzano, R.; Cesco, S.; Crecchio, C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol. Fertil. Soils* **2015**, *51*, 403–415, doi:10.1007/s00374-015-0996-1.
108. Hartmann, A.; Schmid, M.; Tuinen, D. van; Berg, G. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* **2009**, *321*, 235–257, doi:10.1007/s11104-008-9814-y.
109. Badri, D.V.; Weir, T.L.; van der Lelie, D.; Vivanco, J.M. Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. *Curr. Op. Biotechnol.* **2009**, *20*, 642–650, doi:10.1016/j.copbio.2009.09.014.
110. Berg, G.; Smalla, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *68*, 1–13, doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x.
111. Fierer, N.; Jackson, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 626–631, doi:10.1073/pnas.0507535103.
112. Singh, B.K.; Munro, S.; Potts, J.M.; Millard, P. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Appl. Soil Ecol.* **2007**, *36*, 147–155, doi:10.1016/j.apsoil.2007.01.004.
113. Lauber, C.L.; Strickland, M.S.; Bradford, M.A.; Fierer, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol. Biochem.* **2008**, *40*, 2407–2415, doi:10.1016/j.soilbio.2008.05.021.
114. Janssen, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 1719–1728, doi:10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006.
115. Spain, A.M.; Krumholz, L.R.; Elshahed, M.S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. *ISME J* **2009**, *3*, 992–1000, doi:10.1038/ismej.2009.43.
116. Garcia, S.L.; McMahon, K.D.; Grossart, H.-P.; Warnecke, F. Successful enrichment of the ubiquitous freshwater actinobacteria. *Environ. Microbiol. Rep.* **2014**, *6*, 21–27, doi:10.1111/1758-2229.12104.
117. Yadav, A.N.; Verma, P.; Kumar, S.; Kumar, V.; Kumar, M.; Kumari Sugitha, T.C.; Singh, B.P.; Saxena, A.K.; Dhaliwal, H.S. Chapter 2 - Actinobacteria from Rhizosphere: Molecular Diversity, Distributions, and Potential Biotechnological Applications. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Singh, B.P., Gupta, V.K., Passari, A.K., Eds.; Elsevier, 2018; pp. 13–41 ISBN 978-0-444-63994-3.



118. Kersters, K.; De Vos, P.; Gillis, M.; Swings, J.; Vandamme, P.; Stackebrandt, E. Introduction to the Proteobacteria. In *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Eds.; Springer: New York, NY, 2006; pp. 3–37 ISBN 978-0-387-30745-9.
119. Sharma, S.; Aneja, M.K.; Mayer, J.; Munch, J.C.; Schloter, M. Characterization of bacterial community structure in rhizosphere soil of grain legumes. *Microb. Ecol.* **2005**, *49*, 407–415, doi:10.1007/s00248-004-0041-7.
120. Turner, T.R.; Ramakrishnan, K.; Walshaw, J.; Heavens, D.; Alston, M.; Swarbreck, D.; Osbourn, A.; Grant, A.; Poole, P.S. Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *ISME J.* **2013**, *7*, 2248–2258, doi:10.1038/ismej.2013.119.
121. Gkarmiri, K.; Mahmood, S.; Ekblad, A.; Alström, S.; Högberg, N.; Finlay, R. Identifying the active microbiome associated with roots and rhizosphere soil of oilseed rape. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83*, doi:10.1128/AEM.01938-17.
122. Siczek, A.; Fraç, M.; Gryta, A.; Kalembasa, S.; Kalembasa, D. Variation in soil microbial population and enzyme activities under faba bean as affected by pentachlorophenol. *Appl. Soil Ecol.* **2020**, *150*, 103466, doi:10.1016/j.apsoil.2019.103466.
123. Granzow, S.; Kaiser, K.; Wemheuer, B.; Pfeiffer, B.; Daniel, R.; Vidal, S.; Wemheuer, F. The effects of cropping regimes on fungal and bacterial communities of wheat and faba bean in a greenhouse pot experiment differ between plant species and compartment. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fmicb.2017.00902.
124. Kielak, A.; Pijl, A.S.; van Veen, J.A.; Kowalchuk, G.A. Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. *ISME J.* **2009**, *3*, 378–382, doi:10.1038/ismej.2008.113.
125. Marilley, L.; Hartwig, U.A.; Aragno, M. Influence of an elevated atmospheric CO<sub>2</sub> content on soil and rhizosphere bacterial communities beneath *Lolium perenne* and *Trifolium repens* under field conditions. *Microb. Ecol.* **1999**, *38*, 39–49, doi:10.1007/s002489900155.
126. Lee, S.-H.; Ka, J.-O.; Cho, J.-C. Members of the phylum *Acidobacteria* are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *285*, 263–269, doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01232.x.
127. Garrity, G.M.; Holt, J.G.; Spieck, E.; Bock, E.; Johnson, D.B.; Spring, S.; Schleifer, K.-H.; Maki, J.S. Phylum BVIII. Nitrospirae phy. nov. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*; Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M., Eds.; Springer: New York, NY, 2001; pp. 451–464 ISBN 978-0-387-21609-6.
128. Sorokin, D.Y.; Lücker, S.; Vejmelkova, D.; Kostrikina, N.A.; Kleerebezem, R.; Rijpstra, W.I.C.; Damsté, J.S.S.; Le Paslier, D.; Muyzer, G.; Wagner, M.; et al. Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. *ISME J.* **2012**, *6*, 2245–2256, doi:10.1038/ismej.2012.70.
129. Hug, L.A.; Castelle, C.J.; Wrighton, K.C.; Thomas, B.C.; Sharon, I.; Frischkorn, K.R.; Williams, K.H.; Tringe, S.G.; Banfield, J.F. Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. *Microbiome* **2013**, *1*, 22, doi:10.1186/2049-2618-1-22.
130. Buckley, D.H.; Huangyutitham, V.; Nelson, T.A.; Rumberger, A.; Thies, J.E. Diversity of Planctomycetes in Soil in Relation to Soil History and Environmental Heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 4522–4531, doi:10.1128/AEM.00149-06.



131. Jung, J.; Choi, S.; Jung, H.; Scow, K.M.; Park, W. Primers for amplification of nitrous oxide reductase genes associated with Firmicutes and Bacteroidetes in organic-compound-rich soils. *Microbiology* **2013**, *159*, 307–315, doi:10.1099/mic.0.060194-0.
132. Ferrari, B.; Winsley, T.; Ji, M.; Neilan, B. Insights into the distribution and abundance of the ubiquitous Candidatus Saccharibacteria phylum following tag pyrosequencing. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 3957, doi:10.1038/srep03957.
133. Bergmann, G.T.; Bates, S.T.; Eilers, K.G.; Lauber, C.L.; Caporaso, J.G.; Walters, W.A.; Knight, R.; Fierer, N. The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biol. and Biochem.* **2011**, *43*, 1450–1455, doi:10.1016/j.soilbio.2011.03.012.
134. DeBruyn, J.M.; Nixon, L.T.; Fawaz, M.N.; Johnson, A.M.; Radosevich, M. Global Biogeography and Quantitative Seasonal Dynamics of Gemmatimonadetes in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 6295–6300, doi:10.1128/AEM.05005-11.
135. Sommermann, L.; Geistlinger, J.; Wibberg, D.; Deubel, A.; Zwanzig, J.; Babin, D.; Schlüter, A.; Schellenberg, I. Fungal community profiles in agricultural soils of a long-term field trial under different tillage, fertilization and crop rotation conditions analyzed by high-throughput ITS-amplicon sequencing. *PLOS ONE* **2018**, *13*, e0195345, doi:10.1371/journal.pone.0195345.
136. Xu, L.; Ravnskov, S.; Larsen, J.; Nicolaisen, M. Linking fungal communities in roots, rhizosphere, and soil to the health status of *Pisum sativum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2012**, *82*, 736–745, doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01445.x.
137. Xu, L.; Ravnskov, S.; Larsen, J.; Nilsson, R.H.; Nicolaisen, M. Soil fungal community structure along a soil health gradient in pea fields examined using deep amplicon sequencing. *Soil Biol. Biochem.* **2012**, *46*, 26–32, doi:10.1016/j.soilbio.2011.11.010.
138. Weller, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopath.* **1988**, *26*, 379–407, doi:10.1146/annurev.py.26.090188.002115.
139. Bull, C.T. Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology* **1991**, *81*, 954, doi:10.1094/Phyto-81-954.
140. Pliego, C.; Ramos, C.; de Vicente, A.; Cazorla, F.M. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil* **2011**, *340*, 505–520, doi:10.1007/s11104-010-0615-8.
141. Ahmad, F.; Husain, F.M.; Ahmad, I. Rhizosphere and root colonization by bacterial inoculants and their monitoring methods: a critical area in PGPR research. In *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*; Ahmad, I., Ahmad, F., Pichtel, J., Eds.; Springer: New York, NY, 2011; pp. 363–391 ISBN 978-1-4419-7931-5.
142. Singh, D.P.; Singh, H.B.; Prabha, R. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives*; Springer, 2016; ISBN 978-81-322-2647-5.
143. Iqbal, M.N.; Ashraf, A. Antagonism in Rhizobacteria: Application for Biocontrol of Soil-borne Plant Pathogens. *PSM Microbiol.* **2017**, *2*, 78–79.
144. Karthika, S.; Varghese, S.; Jisha, M.S. Exploring the efficacy of antagonistic rhizobacteria as native biocontrol agents against tomato plant diseases. *3 Biotech* **2020**, *10*, 320, doi:10.1007/s13205-020-02306-1.
145. Rumberger, A.; Marschner, P. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. *Soil Biol. Biochem.* **2003**, *35*, 445–452, doi:10.1016/S0038-0717(02)00296-1.



146. Bressan, M.; Roncato, M.-A.; Bellvert, F.; Comte, G.; Haichar, F. el Z.; Achouak, W.; Berge, O. Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. *ISME J.* **2009**, *3*, 1243–1257, doi:10.1038/ismej.2009.68.
147. Cook, R.J.; Thomashow, L.S.; Weller, D.M.; Fujimoto, D.; Mazzola, M.; Banger, G.; Kim, D.S. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *PNAS* **1995**, *92*, 4197–4201, doi:10.1073/pnas.92.10.4197.
148. Berg, G.; Zachow, C.; Lottmann, J.; Götz, M.; Costa, R.; Smalla, K. Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4203–4213, doi:10.1128/AEM.71.8.4203-4213.2005.
149. Berg, G.; Opelt, K.; Zachow, C.; Lottmann, J.; Götz, M.; Costa, R.; Smalla, K. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, *56*, 250–261, doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00025.x.
150. Chaparro, J.M.; Sheflin, A.M.; Manter, D.K.; Vivanco, J.M. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol Fertil Soils* **2012**, *48*, 489–499, doi:10.1007/s00374-012-0691-4.
151. Rosendahl, S. Interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. *J. Phytopathol.* **1985**, *114*, 31–40, doi:10.1111/j.1439-0434.1985.tb04335.x.
152. Dandurand, L.M.; Knudsen, G.R. Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the spermosphere and rhizosphere of pea. *Phytopathology* **1993**, *83*, 265, doi:10.1094/Phyto-83-265.
153. Landa, B.B.; Mavrodi, O.V.; Raaijmakers, J.M.; Gardener, B.B.M.; Thomashow, L.S.; Weller, D.M. Differential Ability of Genotypes of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas fluorescens* Strains To Colonize the Roots of Pea Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3226–3237, doi:10.1128/AEM.68.7.3226-3237.2002.
154. Dileep Kumar, B.S.; Berggren, I.; Mårtensson, A.M. Potential for improving pea production by co-inoculation with fluorescent *Pseudomonas* and *Rhizobium*. *Plant Soil* **2001**, *229*, 25–34, doi:10.1023/A:1004896118286.
155. Grady, E.N.; MacDonald, J.; Liu, L.; Richman, A.; Yuan, Z.-C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb. Cell. Fact.* **2016**, *15*, 203, doi:10.1186/s12934-016-0603-7.
156. Gulati, A.; Vyas, P.; Rahi, P.; Kasana, R.C. Plant growth-promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. *Curr. Microbiol.* **2009**, *58*, 371–377, doi:10.1007/s00284-008-9339-x.
157. Jiang, R.H.Y.; Tyler, B.M. Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **2012**, *50*, 295–318, doi:10.1146/annurev-phyto-081211-172912.
158. Abd-El-Khair, H.; Haggag, K.; El-Nasr, H.I.S. Field application of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* combined with *Rhizobium* for controlling *Fusarium* root rot in faba bean in organic farming. *Middle East J. Appl. Sci.* **2018**, *8*, 865–873.
159. El-Shatoury, S.A.; Ameen, F.; Moussa, H.; Wahid, O.A.; Dewedar, A.; AlNadhari, S. Biocontrol of chocolate spot disease (*Botrytis cinerea*) in faba bean using endophytic actinomycetes *Streptomyces*: a field study to compare application techniques. *PeerJ* **2020**, *8*, e8582, doi:10.7717/peerj.8582.





160. Hewedy, M.A. Associative effect of the rhizobacteria *Streptomyces chibaensis* and commercial biofertilizers on the growth, yield and nutritional value of *Vicia faba*. *Egypt. J. Biol. Pest Co.* **2011**, *21*, 219–225.
161. Mbazia, A.; Youssef, N.O.B.; Kharrat, M. Tunisian isolates of *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* can control *Botrytis fabae* on faba bean. *Biocontrol Sci Technol* **2016**, *26*, 915–927, doi:10.1080/09583157.2016.1168775.
162. Ingrassia, R.; Amato, G.; Frenda, A.S.; Giambalvo, D. Impacts of arbuscular mycorrhizal fungi on nutrient uptake, N<sub>2</sub> fixation, N transfer, and growth in a wheat/faba bean intercropping system. *PLOS ONE* **2019**, *14*, e0213672, doi:10.1371/journal.pone.0213672.
163. Qiao, X.; Bei, S.; Li, C.; Dong, Y.; Li, H.; Christie, P.; Zhang, F.; Zhang, J. Enhancement of faba bean competitive ability by arbuscular mycorrhizal fungi is highly correlated with dynamic nutrient acquisition by competing wheat. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8122, doi:10.1038/srep08122.
164. Rfaki, A.; Nassiri, L.; Ibjibijen, J. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of faba bean (*Vicia faba* L.) in Meknes region, Morocco. *Microbiol. Res. J. Int.* **2015**, 247–254, doi:10.9734/BMRJ/2015/14379.
165. Cregut, M.; Piutti, S.; Vong, P.-C.; Slezack-Deschaumes, S.; Crovisier, I.; Benizri, E. Density, structure, and diversity of the cultivable arylsulfatase-producing bacterial community in the rhizosphere of field-grown rape and barley. *Soil Biol. Biochem.* **2009**, *41*, 704–710, doi:10.1016/j.soilbio.2009.01.005.
166. Madani, H.; Kelarestaghi, K.B.; Malboobi, M.A. Comparison of biological and chemical phosphorus fertilizers on rapeseed yield in Iran, Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI, Sacramento, USA, August 26-30, 2009.
167. Valetti, L.; Iriarte, L.; Fabra, A. Growth promotion of rapeseed (*Brassica napus*) associated with the inoculation of phosphate solubilizing bacteria. *Appl. Soil Ecol.* **2018**, *132*, 1–10, doi:10.1016/j.apsoil.2018.08.017.
168. Rashid, A.; Bughio, N. Evaluating internal phosphorus requirement of rapeseed, chickpea, lentil, and wheat by seed analysis. *Commun Soil Sci Plant* **1993**, *24*, 1359–1369, doi:10.1080/00103629309368882.
169. Fu, L.; Li, H.; Wei, L.; Yang, J.; Liu, Q.; Wang, Y.; Wang, X.; Ji, G. Antifungal and biocontrol evaluation of four lysobacter strains against clubroot disease. *Indian J. Microbiol.* **2018**, *58*, 353–359, doi:10.1007/s12088-018-0716-2.
170. Berg, G.; Roskot, N.; Steidle, A.; Eberl, L.; Zock, A.; Smalla, K. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3328–3338, doi:10.1128/AEM.68.7.3328-3338.2002.
171. Bakker, M.G.; Manter, D.K.; Sheflin, A.M.; Weir, T.L.; Vivanco, J.M. Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. *Plant Soil* **2012**, *360*, 1–13, doi:10.1007/s11104-012-1361-x.
172. Ryan, P.R.; Dessaux, Y.; Thomashow, L.S.; Weller, D.M. Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant Soil* **2009**, *321*, 363–383, doi:10.1007/s11104-009-0001-6.
173. Bremer, C.; Braker, G.; Matthies, D.; Beierkuhnlein, C.; Conrad, R. Plant presence and species combination, but not diversity, influence denitrifier activity and the composition of nirK-type denitrifier communities in grassland soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *70*, 377–387, doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00732.x.
174. Kumar, V.; Prasad, R.; Kumar, M.; Choudhary, D.K. *Microbiome in Plant Health and Disease: Challenges and Opportunities*; Springer, 2019; ISBN 9789811384950.



175. Jones, D.L.; Hodge, A.; Kuzyakov, Y. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol.* **2004**, *163*, 459–480, doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01130.x.
176. Abawi, G.S.; Widmer, T.L. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Appl. Soil Ecol.* **2000**, *15*, 37–47, doi:10.1016/S0929-1393(00)00070-6.
177. Peters, R.D.; Sturz, A.V.; Carter, M.R.; Sanderson, J.B. Developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. *Soil Till. Res.* **2003**, *72*, 181–192, doi:10.1016/S0167-1987(03)00087-4.
178. Gorlach-Lira, K.; Stefaniak, O. Antagonistic activity of bacteria isolated from crops cultivated in a rotation system and a monoculture against *Pythium debaryanum* and *Fusarium oxysporum*. *Folia Microbiol.* **2009**, *54*, 447–450, doi:10.1007/s12223-009-0062-1.



Table S1: Physicochemical characteristic of rhizospheric soil from the 3 studied crops. Values are mean from 3 replicates. Standard deviations are indicated in parentheses.

	Rapeseed	Pea	Faba bean
pH H <sub>2</sub> O	7.90 (± 0.05)	7.84 (± 0.05)	7.98 (± 0.05)
pH KCl	7.40 (± 0.01)	7.46 (± 0.02)	7.41 (± 0.11)
TOC (g kg <sup>-1</sup> dry soil)	18.74 (± 0.26)	19.78 (± 0.40)	19.78 (± 0.28)
TC (g kg <sup>-1</sup> dry soil)	19.62 (± 0.17)	20.69 (± 0.44)	10.64 (± 0.26)
% OM	3.37 (± 0.03)	3.56 (± 0.07)	1.83 (± 0.04)
N (g kg <sup>-1</sup> dry soil)	2.55 (± 0.03)	2.43 (± 0.05)	1.59 (± 0.06)
C/N	7.69 (± 0.17)	8.53 (± 0.23)	6.69 (± 0.17)
Ca <sup>2+</sup> (mg kg <sup>-1</sup> dry soil)	6.52 (± 0.17)	6.56 (± 0.16)	3.94 (± 0.09)
POXC (mg kg <sup>-1</sup> dry soil)	733.33 (± 17.36)	764.65 (± 15.06)	592.19 (± 29.02)
P Olsen (mg kg <sup>-1</sup> dry soil)	2.5 (± 0.10)	1.18 (± 1.79)	22.12 (± 0.29)



Table S2: Relative abundance for each fungal phylum per rhizosphere. Means were calculated from three replicates per rhizosphere (Rapeseed, Faba bean and Pea). Standard deviation of the mean is indicated in parentheses. Significant differences among rhizospheres are indicated by different letters at  $P < 0.05$ , differences were observed with a kruskalmc test (package pgirmess, R).

Phylum	Rapeseed	Pea	Fababean
Ascomycota	82.195% ( $\pm 2.247$ ) <i>b</i>	81,326% ( $\pm 5.789$ ) <i>a,b</i>	70,974% ( $\pm 5.150$ ) <i>a</i>
Basidiomycota	6.155% ( $\pm 1.508$ ) <i>a</i>	9,438% ( $\pm 6.269$ ) <i>a</i>	11,243% ( $\pm 8.931$ ) <i>a</i>
Chytridiomycota	0,536% ( $\pm 0.198$ ) <i>a</i>	0,317% ( $\pm 0.151$ ) <i>a</i>	0,714% ( $\pm 0.404$ ) <i>a</i>
Fungi_phy_Incertae_sedis	0.006% ( $\pm 0.008$ ) <i>a,b</i>	nd	0,105% ( $\pm 0.061$ ) <i>b</i>
Glomeromycota	0.069% ( $\pm 0.025$ ) <i>a</i>	0,135% ( $\pm 0.050$ ) <i>a</i>	0,061% ( $\pm 0.002$ ) <i>a</i>
Rozellomycota	0.009% ( $\pm 0.116$ )	nd	nd
Zygomycota	11.030% ( $\pm 1.958$ ) <i>a,b</i>	8,784% ( $\pm 2.943$ ) <i>a</i>	16,902% ( $\pm 3.918$ ) <i>b</i>





Table S3: Relative abundance for each bacterial phylum per rhizosphere (rapeseed, faba bean and pea). Means were calculated from three replicates per rhizosphere. Standard deviations are indicated in parentheses. Significant differences among rhizospheres are indicated by different letters at  $P < 0.05$ , differences were observed with a kruskalmc test (package pgirmess, R).

Phylum	Rapeseed	Pea	Fababean
Acidobacteria	4,27% ( $\pm 0,132$ ) <i>a,b</i>	5,973% ( $\pm 0,719$ ) <i>b</i>	3,992% ( $\pm 0,205$ ) <i>a</i>
Actinobacteria	29,715% ( $\pm 0,510$ ) <i>a,b</i>	26,072% ( $\pm 2,592$ ) <i>a</i>	35,158% ( $\pm 0,297$ ) <i>b</i>
Aquificae	0,004% ( $\pm 0,002$ ) <i>a</i>	0,006% ( $\pm 0,003$ ) <i>a</i>	0,007% ( $\pm 0,001$ ) <i>a</i>
Armatimonadetes	0,178% ( $\pm 0,004$ ) <i>a,b</i>	0,213% ( $\pm 0,030$ ) <i>b</i>	0,073% ( $\pm 0,006$ ) <i>a</i>
Bacteroidetes	4,676% ( $\pm 0,041$ ) <i>a</i>	4,419% ( $\pm 0,768$ ) <i>a</i>	5,048% ( $\pm 0,227$ ) <i>a</i>
Calditrichaeota	0,003% ( $\pm 0,002$ ) <i>a</i>	0,005% ( $\pm 0,002$ ) <i>a</i>	nd
Candidatus Atribacteria	0,090% ( $\pm 0,006$ ) <i>a,b</i>	0,068% ( $\pm 0,019$ ) <i>a</i>	0,192% ( $\pm 0,014$ ) <i>b</i>
Candidatus Campbellbacteria	0,001% ( $\pm 0,001$ ) <i>a</i>	0,003% ( $\pm 0,002$ ) <i>a</i>	0,001% ( $\pm 0,001$ ) <i>a</i>
Candidatus Saccharibacteria	3,498% ( $\pm 0,051$ ) <i>a</i>	4,614% ( $\pm 0,161$ ) <i>a,b</i>	5,165% ( $\pm 0,186$ ) <i>b</i>
Candidatus Tectomicrobia	0,035% ( $\pm 0,008$ ) <i>a</i>	0,018% ( $\pm 0,004$ ) <i>a</i>	0,029% ( $\pm 0,002$ ) <i>a</i>
Chlamydiae	0,084% ( $\pm 0,002$ ) <i>a,b</i>	0,135% ( $\pm 0,016$ ) <i>b</i>	0,041% ( $\pm 0,007$ ) <i>a</i>
Chlorobi	nd	0,005% ( $\pm 0,002$ ) <i>a</i>	0,002% ( $\pm 0,001$ ) <i>a</i>
Chloroflexi	6,260% ( $\pm 0,052$ ) <i>b</i>	5,798% ( $\pm 0,183$ ) <i>a,b</i>	4,556% ( $\pm 0,282$ ) <i>a</i>
Cyanobacteria	0,372% ( $\pm 0,029$ ) <i>a</i>	0,316% ( $\pm 0,017$ ) <i>a</i>	0,225% ( $\pm 0,034$ ) <i>a</i>
Deinococcus-Thermus	0,065% ( $\pm 0,007$ ) <i>b</i>	0,0423% ( $\pm 0,004$ ) <i>a,b</i>	0,029% ( $\pm 0,005$ ) <i>a</i>
Dictyoglomi	0,108% ( $\pm 0,005$ ) <i>b</i>	0,080% ( $\pm 0,007$ ) <i>a,b</i>	0,033% ( $\pm 0,003$ ) <i>a</i>
Elusimicrobia	0,030% ( $\pm 0,001$ ) <i>a,b</i>	0,049% ( $\pm 0,008$ ) <i>b</i>	0,014% ( $\pm 0,007$ ) <i>a</i>
Fibrobacteres	0,044% ( $\pm 0,019$ ) <i>a</i>	0,060% ( $\pm 0,017$ ) <i>a</i>	0,016% ( $\pm 0,006$ ) <i>a</i>
Firmicutes	5,239% ( $\pm 0,280$ ) <i>a</i>	5,460% ( $\pm 0,745$ ) <i>a</i>	6,242% ( $\pm 0,138$ ) <i>a</i>
Fusobacteria	0,004% ( $\pm 0,002$ ) <i>a</i>	0,004% ( $\pm 0,002$ ) <i>a</i>	0,004% ( $\pm 0,001$ ) <i>a</i>
Gemmatimonadetes	1,620% ( $\pm 0,058$ ) <i>a</i>	1,493% ( $\pm 0,241$ ) <i>a</i>	1,501% ( $\pm 0,041$ ) <i>a</i>
Ignavibacteriae	0,017% ( $\pm 0,004$ ) <i>a</i>	0,023% ( $\pm 0,009$ ) <i>a</i>	0,014% ( $\pm 0,003$ ) <i>a</i>
Nitrospinae	0,015% ( $\pm 0,005$ ) <i>a</i>	0,032% ( $\pm 0,004$ ) <i>a</i>	0,011% ( $\pm 0,002$ ) <i>a</i>
Nitrospirae	1,974% ( $\pm 0,053$ ) <i>a,b</i>	2,757% ( $\pm 0,234$ ) <i>b</i>	1,087% ( $\pm 0,029$ ) <i>a</i>
Planctomycetes	3,375% ( $\pm 0,074$ ) <i>a</i>	2,931% ( $\pm 0,190$ ) <i>a</i>	2,881% ( $\pm 0,101$ ) <i>a</i>
Proteobacteria	34,280% ( $\pm 0,538$ ) <i>a,b</i>	35,859% ( $\pm 1,625$ ) <i>b</i>	29,499% ( $\pm 0,293$ ) <i>a</i>
Rhodothermaeota	0,004% ( $\pm 0,001$ ) <i>a</i>	0,004% ( $\pm 0,001$ ) <i>a</i>	nd
Spirochaetes	0,178% ( $\pm 0,020$ ) <i>a</i>	0,175% ( $\pm 0,025$ ) <i>a</i>	0,095% ( $\pm 0,016$ ) <i>a</i>
Tenericutes	0,011% ( $\pm 0,010$ ) <i>a</i>	0,014% ( $\pm 0,003$ ) <i>a</i>	0,003% ( $\pm 0,003$ ) <i>a</i>
unclassified Bacteria	0,638% ( $\pm 0,034$ ) <i>a</i>	0,901% ( $\pm 0,075$ ) <i>a</i>	0,840% ( $\pm 0,014$ ) <i>a</i>
Verrucomicrobia	2,657% ( $\pm 0,053$ ) <i>a,b</i>	2,469% ( $\pm 0,041$ ) <i>a</i>	3,243% ( $\pm 0,005$ ) <i>b</i>





---

## Synthèse, discussion générale et perspectives

---



Chantal Nicolas, INRA



## 5 Synthèse, discussion générale et perspectives

Au vu des multiples bénéfices environnementaux, alimentaires et agronomiques des protéagineux, les pouvoirs publics cherchent à en promouvoir la culture, en particulier dans l'objectif de se libérer de la dépendance vis à vis des importations de soja. La culture du pois protéagineux a fortement chuté au cours des dernières années en raison des nombreuses contraintes affectant cette espèce végétale, en particulier l'atteinte par la pourriture racinaire causée par *A. euteiches*, causant des dégâts parfois considérables imputant fortement le rendement. Aucun traitement totalement efficace n'étant à ce jour disponible, le monde scientifique est aujourd'hui mobilisé pour la recherche de solutions de lutte contre cette maladie, pour une culture sans risque majeur et un retour sur parcelle plus fréquent. De nombreuses pistes sont ainsi explorées, depuis la sélection variétale jusqu'au développement de solutions de biocontrôle. Ce travail demande une meilleure compréhension du fonctionnement de cette maladie et des facteurs ayant une influence sur celle-ci.

Ce projet de thèse avait plus particulièrement pour but de mieux comprendre le rôle des facteurs biologiques (espèce végétale – variétés d'une même espèce – microbiomes associés) dans le déterminisme de la maladie. Nos recherches ont permis de mettre en avant 1) l'importance du choix variétal de pois protéagineux (pois d'hiver / pois de printemps) de par la variabilité de l'expression de la maladie en lien avec les modifications architecturales induites par *A. euteiches*, 2) l'importance du choix variétal, de par cette fois-ci la présence et le recrutement différentiel d'endophytes antagonistes envers *A. euteiches* au sein des nodules racinaires et 3) l'importance du choix des espèces végétales au sein de la rotation culturale sur la composition du sol en microorganismes dont des genres biocontrôlent contre *A. euteiches*.

### 5.1 Synthèse des résultats de thèse

#### 5.1.1 Expression différentielle de la pourriture racinaire du pois causée par *A. euteiches* en fonction du géotype variétal.

Dans ce premier axe de recherche, l'hypothèse de départ était qu'outre la vision classique de l'échappement au champ par la désynchronisation des périodes de vulnérabilité de la plante et de développement favorable au pathogène, la sensibilité générale des pois d'hiver à *A. euteiches* était moindre comparativement à celle des pois de printemps, en lien avec leur



génotype. Pour vérifier cette hypothèse, une analyse comparative de l'expression des symptômes et des modifications architecturales induites par *A. euteiches* chez des variétés d'hiver et de printemps de pois protéagineux a été menée.

Afin de n'introduire aucun biais dans l'analyse, un système de culture inerte et stérile a été mis en œuvre en conditions phytotroniques contrôlées. Ce système de culture a permis de réaliser des évaluations sur les premiers stades de développement des plantules : notation des symptômes racinaires à travers un indice de maladie (DI pour Disease Index, représenté par une note de 0 à 5 qualifiant le degré de pourriture), évaluation de différents traits architecturaux aériens et racinaires reflétant la bonne croissance de la plante. Une des originalités de cette étude a été de se baser uniquement sur des cultivars possiblement utilisés par les agriculteurs au champ mais aussi d'évaluer et comparer les effets causés par deux doses pathogènes de 15 et 30 oospores  $g^{-1}$  de substrat inerte (respectivement considéré comme une dose faible et une dose moyenne). En effet au-delà de 30 oospores  $g^{-1}$  de substrat inerte, les plantes sont toutes très fortement atteintes, limitant la possibilité d'observer des différences. À l'inverse, en dessous de 15, les plantes ne montraient pas de symptômes. Le choix des oospores d'*A. euteiches* en tant qu'inoculum, au contraire de la majorité des études sur ce pathogène utilisant des zoospores, repose sur la volonté de permettre la mise en place du cycle infectieux entier. En effet dans le sol, les sécrétions racinaires des plantes hôtes, une fois perçues, vont déclencher la production de zoospores par les oospores, formes mobiles qui iront coloniser les tissus racinaires. Lors de cette expérimentation, trois variétés de pois d'hiver (Dexter, Myster et Indiana, fournis par R.A.G.T. semences) et trois variétés de pois de printemps ont été choisies (Aurélia, Avenger et LG AURIS, fournies par Limagrain).

À dose faible de pathogène, les résultats ont montré des symptômes racinaires plus importants chez les variétés d'hiver qui, pourtant, ne montraient pas de modifications architecturales significatives par rapport aux plantes non inoculées tandis que les pois de printemps voyaient déjà leur architecture aérienne et racinaire décroître. En revanche à dose pathogène moyenne, aucune différence entre ces deux groupes variétaux n'était visible. La mise en œuvre de deux doses d'inoculum pathogène a donc permis de mettre en évidence des mécanismes de défense probablement différents. Un même retard d'apparition des symptômes aériens malgré une atteinte racinaire importante a de la même façon été décrit chez *Brassica napus* face à *Verticillium dahliae* (Eynck *et al.*, 2009). Les parties racinaires de tous les génotypes testés étaient touchées de façon similaire tandis que seuls les génotypes sensibles voyaient leurs parties aériennes colonisées. Ce différentiel reposait sur la présence de quantités





plus importantes de composés phénoliques solubles au niveau des tissus de l'hypocotyle, limitant l'expansion du pathogène. Un mécanisme de défense similaire pourrait par exemple être mis en place chez les variétés de pois d'hiver. Par ailleurs, une autre explication possible est que chez les variétés de pois d'hiver, la fonctionnalité nutritive des racines arrive à être maintenue malgré les lésions, pour soutenir le développement des parties aériennes. Cette absence de modifications architecturales aériennes chez les pois d'hiver à dose faible de pathogène appuie les observations empiriques au champ d'une meilleure tolérance à *A. euteiches* du pois d'hiver.

Un autre résultat mis en avant est l'existence de deux patrons de réponse distincts à l'infection par *A. euteiches*. Ainsi les variétés Myster (pois d'hiver), Dexter (pois d'hiver) et Aurélia (pois de printemps) ont été caractérisés par une augmentation de la croissance racinaire en réaction au pathogène ; au contraire des variétés LG AURIS (pois de printemps), Avenger (pois de printemps) et Indiana (pois d'hiver). Ce phénomène de vigueur racinaire a été de la même façon, observée chez divers géotypes de pois lors d'une infection par *Fusarium solani* (Kraft and Boge, 2001). Une augmentation du nombre de racines latérales a aussi été notée lors d'une infection par *A. euteiches* chez *Medicago truncatula* (Djébali *et al.*, 2009). La vigueur racinaire en réponse à l'infection des variétés Dexter, Myster et Aurelia s'accompagne d'une sévérité légèrement moindre des symptômes. Cette corrélation entre l'architecture racinaire induite et la sévérité de maladie est bien connue (Snapp *et al.*, 2003 ; Dias *et al.*, 2004 ; Román-Avilés *et al.*, 2004 ; Bonhomme *et al.*, 2014). Les résultats obtenus ici confirment l'étude de Desgroux *et al.*, (2018) montrant l'importance du choix variétal et de son architecture racinaire en cas d'infection par *A. euteiches*.

Cette étude a permis de montrer que l'intérêt des variétés de pois d'hiver vis-à-vis de la pourriture racinaire causée par *A. euteiches* ne repose pas uniquement sur un évitement temporel. Comme attendu, le géotype de la variété joue un rôle substantiel dans la résistance contre la maladie en lien avec la mise en œuvre probable de mécanismes de défenses spécifiques.

### **5.1.2 Influence des cultivars sur la diversité intra-nodules des endophytes bactériens du pois.**

Outre l'observation des modifications induites par *A. euteiches* chez des cultivars de



pois d'hiver et de pois de printemps, ainsi que l'évaluation des patrons de tolérance / sensibilité, l'objectif de ce travail de thèse a aussi été de prendre en considération les communautés microbiennes associées aux plantes. L'hypothèse de départ était que les variétés de pois de printemps et d'hiver vont présenter des spécificités d'associations avec des bactéries endophytes au sein des nodules, et plus particulièrement des antagonistes potentiels.

Le second axe de recherche s'est donc attaché à décrire l'influence du choix variétal sur la diversité et la structure des communautés bactériennes recrutées et observées au sein des nodules racinaires, en ciblant spécifiquement les genres bactériens reconnus comme ayant un effet biocontrôle envers *A. euteiches*. Les nodules racinaires constituent un environnement particulier pouvant renfermer des agents antagonistes d'intérêt, dont l'isolement pourrait être à la base du développement de solutions de lutte contre ce pathogène.

Les six variétés de pois précédemment utilisées ont été semées sur un sol natif exporté d'une parcelle agricole normande. Après 1 mois de culture, les nodules des plantes ont été échantillonnés et stockés, pour analyses ultérieures. Deux approches complémentaires ont été déployées : 1) Une approche cultivable par isolement des bactéries issues des nodules avec caractérisation de leur potentiel antagoniste envers *A. euteiches* par test de confrontation et 2) une approche métabarcoding par séquençage haut débit, pour une comparaison des diversités et des structures des microbiomes bactériens globaux des nodules avec un focus *in silico* sur l'abondance des genres bactériens reconnus comme biocontrôle.

La méthode d'extraction et d'isolement des bactéries issues des nodules de pois a permis de mettre en évidence pour la première fois des agents de biocontrôle au sein des populations endophytes présentes dans cet environnement particulier. Dix-sept isolats bactériens avec effet antagoniste *in vitro* envers *A. euteiches* ont été isolés, principalement des variétés Aurélia (pois de printemps), Dexter et Myster (pois d'hiver). Ces isolats à effet antagoniste, identifiés par séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S, appartiennent tous aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus*. Des membres de ces deux genres bactériens sont déjà largement reconnus pour leur pouvoir biocontrôle, entre autres contre *A. euteiches* (Heungens & Parke 2000 ; Wakelin *et al.*, 2002 ; Santoyo *et al.*, 2012 ; Godebo *et al.*, 2020). En revanche, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence un effet antagoniste des souches du genre *Rhizobium*. Les genres *Pseudomonas* et *Bacillus* sont connus pour leur sécrétion de métabolites secondaires aux propriétés antimicrobiennes (Weller, 2007 ; Fira *et al.*, 2018). Ils présentent par ailleurs une grande capacité de colonisation des tissus en tant qu'endophytes (Sturz *et al.*,



2000). Par l'approche métabarcoding, nous avons mis en évidence une grande diversité bactérienne au sein des nodules des différents cultivars étudiés. L'OTU très majoritaire a été identifié comme *Rhizobium lusitanum*, suivi par *Rhizobium leguminosarum*, deux espèces bactériennes fixatrices d'azote. Si la seconde est connue comme étant le partenaire privilégié spécifique du pois (Meade *et al.*, 1985 ; Jensen, 1987 ; Laguerre *et al.*, 2003), la première (*Rhizobium lusitanum*) est pour la première fois identifiée au sein des nodules de cette espèce végétale. *Rhizobium lusitanum* a été identifiée chez d'autres espèces comme le haricot (Valverde *et al.*, 2011). Toutefois le pois est décrit comme ayant un spectre assez large en termes d'acceptation de symbiontes fixateurs d'azote (Johnston and Beringer, 1976 ; Martínez-Molina *et al.*, 2016), sous la dépendance des conditions environnementales et de la variété (Bourion *et al.*, 2018). Outre ces 2 espèces, une riche communauté bactérienne endophyte est observée au sein des nodules, même si ces organismes restent très minoritaires. Les deux cultivars de pois d'hiver, Dexter et Myster, présentent une abondance relative ainsi qu'une diversité globale plus importantes de ces phyla bactériens mineurs. La diversité des organismes endophytes est connue pour varier en fonction de la variété, mais aussi de son architecture ainsi que de l'environnement (Berendsen *et al.*, 2012 ; Philippot *et al.*, 2013 ; Rossmann *et al.*, 2017).

Dans notre étude, le seul facteur de variation reste la variété de pois. Cette différence se retrouve en ciblant *in silico* les genres bactériens connus dont certaines souches ont montré des effets antagonistes envers *A. euteiches*. En particulier, une abondance relative plus importante des genres biocontrôles est notée chez les deux variétés d'hiver Dexter et Myster. La variété d'hiver Indiana, quant à elle, présente un profil intermédiaire, plus proche des variétés de printemps. Il est intéressant de noter que cette dernière est aussi caractérisée par une tolérance au froid moindre que les deux autres variétés. Cette capacité à sélectionner et abriter des endophytes potentiellement biocontrôle envers le pathogène pourrait ainsi constituer finalement un des arsenaux de défense de ces variétés d'hiver. Leur stade de développement étant plus avancé au champ au moment de la période propice à l'infection d'*A. euteiches*, les nodules sont alors déjà formés. La capacité à recruter des endophytes bénéfiques, selon un processus de co-évolution, constituerait donc une nécessité pour ces variétés (Baltrus, 2017). À l'inverse, chez les variétés de pois de printemps, sévèrement impactées dès les premiers stades de développement, la mise en place des nodules est largement entravée. Il serait intéressant de décrypter l'existence d'un lien entre le génotype des cultivars étudiés et la capacité de recrutement d'endophytes bénéfiques. Ce trait particulier pourrait à termes représenter une autre piste d'orientation de la sélection variétale du pois.



### 5.1.3 Influence de l'espèce végétale sur la modification de la diversité et la structure du microbiome de la rhizosphère.

La lutte biologique par inoculation d'agents de biocontrôle ou par un choix de la variété cultivée pourrait être complétement par la mise en œuvre des rotations culturales. En effet de nombreuses études montrent l'impact des espèces végétales sur le développement d'*A. euteiches* (Muehlchen *et al.*, 1990 ; Fritz *et al.*, 1995 ; Smolinska *et al.*, 1997 ; Williams-Woodward *et al.*, 1997 ; Moussart *et al.*, 2008 ; 2013 ; Hossain *et al.*, 2014). Toutefois aucune étude ne s'est attachée à montrer l'impact ciblé des espèces cultivées sur les genres microbiens de la rhizosphère connus comme ayant un effet antagoniste envers *A. euteiches*. Notre hypothèse de départ était que le couvert végétal représentait un facteur de sélection et de recrutement d'agents de biocontrôle d'intérêt pour la lutte contre *A. euteiches*.

Au cours de ce travail, trois couverts végétaux ont été plus particulièrement étudiés, au travers d'un dispositif en parcelle agricole naturelle. Deux parcelles normandes ont été échantillonnées : une accueillant simultanément une culture de colza incluse dans une culture de pois et l'autre parcelle avec une culture de féverole. Deux approches ont été réalisées : 1) une approche classique cultivable pour isolement des bactéries du sol et évaluation de leur potentiel antagoniste envers *A. euteiches* par test de confrontation *in vitro* et 2) une approche métabarcoding par séquençage haut débit dans le but d'évaluer et comparer la diversité et la structure des communautés bactériennes et fongiques présentes dans la rhizosphère, avec une attention particulière portée aux genre bactériens et fongiques reconnus comme possédant un intérêt biocontrôle.

L'approche cultivable à partir des échantillons de sol rhizosphérique issu des trois cultures a permis de mettre en évidence dix-sept isolats bactériens à effet antagoniste *in vitro*. Aucun antagoniste ne provient de la rhizosphère de la culture du pois tandis que neuf proviennent de la rhizosphère du colza se trouvant pourtant sur la même parcelle. Enfin huit isolats proviennent du sol rhizosphérique sous couvert féverole. Les isolats bactériens à effet antagoniste envers *A. euteiches* ont été identifiés comme appartenant aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*. Des membres des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* ont déjà été répertoriés en tant qu'agents de biocontrôle envers *A. euteiches* (Wakelin *et al.*, 2002 ; Godebo *et al.*, 2020). Le genre *Acinetobacter* est lui aussi connu comme ayant un effet antagoniste envers certains pathogènes (Trotel-Aziz *et al.*, 2008 ; Xue *et al.*, 2009 ; Labuschagne *et al.*, 2010) mais n'a encore jamais été identifié comme antagoniste envers *A. euteiches*. Les





différences entre les trois rhizosphères semblent indiquer à première vue, que le pois ne semble pas sélectionner les mêmes microorganismes comparativement au colza mais aussi à la féverole. Les tests de screening effectués ont permis de déceler plusieurs modes d'action potentiels pouvant expliquer le contrôle d'*A. euteiches*, à savoir l'antibiose par sécrétion de composés volatiles bien décrits chez les genres *Pseudomonas* (Weller and Thomashow, 1993 ; Haas and Keel, 2003) et *Bacillus* (Sansinenea and Ortiz, 2011 ; Fira *et al.*, 2018) et peut-être aussi un mécanisme de compétition pour l'espace et/ou les nutriments (Santoyo *et al.*, 2012 ; Blumenstein *et al.*, 2015). Toutefois, le mode opératoire de ces agents microbiens devra encore être exploré, de même que la capacité réelle de protection des plantes face au pathogène.

L'analyse métabarcoding a permis de mettre en évidence l'influence du couvert végétal sur la composition et la structure des communautés microbiennes du sol. En effet les trois microbiomes bactériens rhizosphériques se distinguent les uns des autres. La rhizosphère de la féverole présente une abondance relative plus importante d'Actinobactéries, Firmicutes, Verrucomicrobia tandis que les couverts pois et colza présente davantage de Protéobactéries et des abondances variables pour les autres phyla. Les différences observées entre le pois et le colza sont le fait unique de l'effet du couvert sur la structuration des populations bactériennes. Les plantes vont agir sur les microorganismes du sol principalement à travers la sécrétion des exsudats racinaires dont le contenu varie en fonction de l'espèce végétale (Philippot *et al.*, 2013). Ces exsudats constituent à la fois une source nutritive importante pour les microorganismes et en tant que molécules signal, voire même possèdent des propriétés antimicrobiennes (Bais *et al.*, 2006 ; Badri *et al.*, 2009 ; Sasse *et al.*, 2018). Concernant le couvert féverole, même si l'effet de l'espèce végétale sur la composition du microbiome est certain, il ne peut pas être exclu non plus un fort impact des propriétés physicochimiques du sol, assez différentes entre les deux parcelles de l'étude. Les composantes abiotiques sont en effet reconnues comme ayant une forte influence sur la diversité et la structure des communautés microbiennes (Berg and Smalla, 2009). Concernant la communauté fongique, l'impact de la localisation, donc des caractéristiques physicochimiques des sols, semble plus prédominant que l'influence de l'espèce végétale, même si les deux effets sont probablement combinés (Singh *et al.*, 2009). En effet, la communauté fongique de la rhizosphère féverole se distingue des deux autres, dont les différences sont plus ténues.

Un focus *in silico* a ensuite été effectué sur la base de données des OTUs, en fonction des genres bactériens et fongiques ayant un effet biocontrôle reconnu contre *A. euteiches* (Rosendahl, 1985 ; Dandurand 2000 ; Heungens and Parke, 2001 ; Bødker *et al.*, 2002 ; Wakelin



*et al.*, 2002 ; Thygesen *et al.*, 2004 ; Godebo *et al.*, 2020). Les résultats ont montré une affinité spécifique des genres biocontrôles en fonction de l'espèce cultivée, et donc une forte influence de l'espèce végétale sur le recrutement et la sélection des microorganismes dans la rhizosphère des plantes. Ainsi, par exemple, une certaine richesse d'espèces appartenant au genre bactérien *Pseudomonas* et au genre fongique *Trichoderma*, particulièrement intéressants pour le biocontrôle (Harman, 2006 ; Santoyo *et al.*, 2012), a été mise en évidence chez le pois, bien qu'aucune souche à effet antagoniste n'ait pu être isolée lors de ce travail. Les assemblages particuliers observés des genres potentiellement biocontrôle sont probablement la résultante des exigences particulières de chacun des couverts, en fonction des conditions environnementales environnantes.

Cette étude a mis en évidence une sélection forte des microorganismes du sol, dont certains sont biocontrôles d'*A. euteiches*, en lien avec l'espèce végétale cultivée mais aussi en fonction des caractéristiques abiotiques du sol. Le modelage des associations microbiennes, mis en place avec la plante par la sélection orientée des microorganismes du sol au travers des couverts végétaux, pourrait se révéler être un outil précieux pour la gestion des maladies des plantes. La culture pourrait disposer d'un pool de microorganismes biocontrôles à recruter par le biais d'un travail d'assemblage du microbiome au préalable par les cultures de la rotation, et en particulier par héritage du précédent cultural, au bénéfice de la santé des cultures suivantes.

## **5.2 Intérêt de ces résultats pour une compréhension systémique des interactions Pois – microorganismes telluriques : contribution au développement de moyens de lutte contre *A. euteiches***

La capitalisation des résultats obtenus ont permis une avancée notable des connaissances pour la compréhension du rôle moteur des composantes biotiques et en particulier les interactions « Pathogène - Géotype végétal (variété ou espèce) - microbiome associé » dans le déterminisme de la pourriture racinaire du pois. Il s'agit de se placer dans une vision holistique intégrative du système, partant de la vision classique du pathosystème vers celle plus complexe du pathobiome (Vayssier-Taussat *et al.*, 2014). Ces travaux pointent plus spécifiquement l'intérêt de combiner différents leviers, reposant sur l'exploitation de mécanismes naturels, pour une mise en pratique des grands principes de la lutte intégrée au sein des agrosystèmes. Ainsi, une gestion intégrée des maladies des cultures doit être envisagée en considérant le système



entier : la plante et ses microbiomes, à savoir l'holobionte, dans leur écosystème tellurique, sous contraintes environnementales et agricoles (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2015).

### **5.2.1 Le choix variétal : premier levier agronomique.**

Semées à la fin de l'été jusqu'au début de l'automne, les variétés de pois d'hiver présentent des bénéfices agronomiques équivalents aux variétés de printemps. Ces variétés ont été spécifiquement sélectionnées uniquement sur la base de leur résistance au froid et au gel. Cette tolérance hivernale serait liée à un délai entre le stade végétal le plus sensible au froid et l'exposition à des températures basses (Lejeune-Hénaut *et al.*, 1999) ou encore à un phénomène d'acclimatation au froid (Bourion *et al.*, 2003; Kuwabara and Imai, 2009). La culture des variétés de pois d'hiver peut conduire à un rendement supérieur pour les agriculteurs, avec une production plus importante de biomasse ainsi que de graines (Bourion *et al.*, 2003; McGee *et al.*, 2017). Un bénéfice attendu de leur implantation est en outre d'interrompre le cycle des ravageurs et des pathogènes, ou tout du moins de limiter leur incidence. Les variétés de pois de printemps et d'hiver sont en général affectées par les mêmes ravageurs et pathogènes (McGee *et al.*, 2017). Mais la désynchronisation entre les périodes favorables à leur développement et la vulnérabilité des plantes constitue une approche prophylactique efficace (McGee *et al.*, 2017). Les agriculteurs et les conseillers techniques constatent généralement un impact moindre voire pas d'impact de la pourriture racinaire au champ (McGee *et al.*, 2017). Dans la vision collective, la raison évoquée expliquant l'intérêt à cultiver des variétés de pois d'hiver vis-à-vis du risque lié à *A. euteiches* repose uniquement sur l'évitement temporel par désynchronisation des cycles plante / pathogène (McGee *et al.*, 2017). Cette vision semble trop réductrice au vu des résultats obtenus lors de ces travaux. La spécificité de réponse des cultivars étudiés en réponse à *A. euteiches* indique que les différences génétiques entre les variétés ont aussi des conséquences sur les patrons de tolérance et de sensibilité. En conditions de culture identiques, les cultivars étudiés ont déployé des stratégies de défense distinctes, conduisant à des sévérités de symptômes et des modifications architecturales différentes. En particulier, deux comportements intéressants ont pu être soulignés. Tout d'abord, les variétés de pois d'hiver présentent un retard d'impact sur leurs parties aériennes malgré une atteinte similaire aux variétés de printemps de leurs parties racinaires, lorsque la pression pathogène reste modérée. Un accroissement du système racinaire en réponse à l'infection est aussi noté chez certains cultivars, sans lien strict avec leur appartenance aux groupes hiver ou printemps. Les 2 caractéristiques mises en avant ici (délai d'impact sur les parties aériennes et vigueur racinaire) constituent deux traits d'intérêt



à valoriser, optimiser, voire même combiner pour orienter la sélection variétale. De plus il est nécessaire de prendre en considération les différences éventuelles en lien avec l'amplitude de la pression pathogène subie par les plantes.

### **Quelques limites :**

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de doctorat démontrent aussi l'impossibilité de généraliser les conclusions concernant les effets variétaux observés en fonction de leur appartenance aux groupes hiver et printemps. Ici, seuls 6 cultivars ont été étudiés quant à leur sensibilité et leurs réponses à l'infection par *A. euteiches*. Elargir par la suite le panel de cultivars étudiés issus des deux groupes hiver / printemps pour en déterminer les patrons de sensibilité, en lien avec les traits architecturaux et la sévérité des symptômes observés sur la partie aérienne constituerait une évaluation pertinente pour la recherche des variétés présentant les traits d'intérêt proposés ci-dessus. De plus, les cultivars choisis présentent des différences phénotypiques notables au niveau du système racinaire en l'absence du pathogène. Aucun lien flagrant avec les patrons de sensibilité n'a pu être mis à jour ici, contrairement aux observations de Desgroux *et al.* (2018). A nouveau, il serait intéressant d'élargir le panel de cultivars étudiés pour confirmer (ou non) l'absence de relation observée ici. Enfin, l'ensemble des expérimentations a été effectué dans un substrat inerte, qui pourrait entraîner des réactions différentes que celles observées en situation naturelle. La reproduction de ces expérimentations dans un sol, dépourvu de microorganismes pour limiter les sources de variabilité, pourrait fournir des informations intéressantes concernant les mécanismes mis en place dans un environnement plus proche de la situation au champ. Une forte variabilité intra-cultivar a malheureusement été observée tout au long des expérimentations. La nécessité d'appliquer des doses pathogènes raisonnables pour ne pas induire uniquement une mortalité systématique des plantes est immanquablement accompagnée d'un risque important d'hétérogénéité plus grande dans le milieu de culture. Les conclusions discutées ici sont la plupart du temps seulement des tendances et doivent donc être considérées avec prudence quant à leur application. Par ailleurs, il pourrait être intéressant de mener une expérimentation plus longue pour réaliser ces évaluations sur des stades de développement des plantes plus avancés. Enfin, la souche *A. euteiches* utilisée est un isolat français de référence. La comparaison des réactions engendrées sur ces cultivars de pois par des souches de virulence variable pourraient révéler d'autres différences.





## **5.2.2 Le rôle des microorganismes dans la gestion de la pourriture racinaire du pois.**

### **5.2.2.1 Les microorganismes : arsenal antagoniste naturel envers *A. euteiches*.**

La valorisation des potentialités des microorganismes au bénéfice de la santé et de la nutrition des plantes constitue à l'heure actuelle un challenge important pour le biocontrôle, en particulier pour une application en grande culture. La rhizosphère, riche en diversité, est le siège privilégié où s'instaurent les interactions entre les plantes et les communautés microbiennes. Cet environnement constitue donc à ce titre un réservoir important d'agents de biocontrôle (Barea *et al.*, 2005). En effet, cette microflore va constituer la première ligne de défense naturelle des racines des plantes contre les stress de nature biotique et abiotique. De plus, les organismes issus de cette niche, où la compétition est grande, possèdent naturellement les compétences nécessaires pour la coloniser et s'y maintenir (Iqbal and Ashraf, 2017; Karthika *et al.*, 2020), pré-requis essentiel au succès de l'utilisation d'agents microbiens de biocontrôle. Outre la rhizosphère, le compartiment racinaire est habité par de nombreuses populations microbiennes endophytes (Rossmann *et al.*, 2017), en particulier au sein des nodules dans le cas spécifique des légumineuses (Martínez-Hidalgo and Hirsch, 2017). Cette communauté microbienne, très intimement liée aux plantes, et ne se limitant pas aux bactéries fixatrices d'azote, présentent aussi de nombreuses potentialités PGPR prometteuses (Santoyo *et al.*, 2016). Explorer et exploiter cette diversité endophyte nodulaire dans un contexte de protection des cultures semble tout indiqué (Berg *et al.*, 2017). Le succès des agents de biocontrôle passe aussi par une spécificité d'utilisation et d'application. Combiner les compétences rhizosphériques et/ou racinaires nécessaires à la spécificité vis-à-vis de l'hôte pourrait ainsi maximiser leur efficacité au champ (Pliego *et al.*, 2011). Différents isolats antagonistes ont pu être mis en évidence au cours de ce travail, issus à la fois de la rhizosphère de différents couverts mais aussi des nodules de pois. Ces souches constituent des pistes à explorer pour le développement de nouvelles solutions de biocontrôle ciblant le pathosystème pois / *A. euteiches*.

Nous pouvons nous interroger sur la pertinence d'extraire des éléments microbiens unitaires pour les ré-inoculer de façon individuelle dans les sols. Il est probablement regrettable de négliger ainsi l'extraordinaire avantage que constitue la diversité microbienne dans la lutte contre les phytopathologies (Berg *et al.*, 2017). En effet, les microbiomes associées aux plantes

comprennent des milliers d'espèces, alors que seule une petite proportion de cette diversité taxonomique est actuellement exploitée en biocontrôle. Une tendance émergente en protection

des cultures est cette fois-ci d'avoir recours non plus à un seul agent de biocontrôle isolé mais plutôt à un consortium microbien (Berg *et al.*, 2013 ; 2017 ; Sarma *et al.*, 2015 ; Palmieri *et al.*, 2017). Dans le sol, les PGPM (Plant Growth-Promoting Microorganisms) sont organisés en communauté complexe, accompagnés de nombreux organismes non PGPM. Ce mode de vie communautaire incite à considérer le bénéfice possible à développer des solutions de lutte biologique sur la base de mélange d'agents de biocontrôle de différentes espèces (Sarma *et al.*, 2015). L'utilisation de mélange microbien complexe pourrait alors améliorer la fiabilité et la constance d'efficacité dans des sols différents et sous des conditions climatiques variables (Stockwell *et al.*, 2011). De plus, le spectre d'activité relativement étroit contre les pathogènes que peut posséder individuellement un agent de biocontrôle est une contrainte majeure pour l'exploitation commerciale de ces organismes (Palmieri *et al.*, 2017). L'utilisation d'un consortium microbien a l'avantage d'augmenter l'efficacité *via* la multiplicité des mécanismes d'action (Massart *et al.*, 2015). Les microorganismes étant rarement seuls dans leur environnement, les introduire en combinaison pourrait faciliter leur implantation dans le sol, par la conservation d'interactions nécessaires entre eux. Enfin, la combinaison d'agents de biocontrôle peut aussi permettre de faire face à des phytopathologies complexes. Certaines maladies, considérées comme étant le résultat d'une infection causée par un pathogène primaire, résultent en fait de la co-occurrence de plusieurs autres pathogènes opportunistes, l'hôte devenant plus sensible du fait de la première infection (Bass *et al.*, 2019).

C'est dans ce contexte que ce travail de thèse s'est positionné. La recherche multisite d'agents bactériens d'intérêt, à la fois dans le sol rhizosphérique mais aussi dans les nodules racinaires ici, se veut à terme être une occasion de développer un consortium pertinent, combinant isolats rhizosphériques et endophytes. Une solution ambitieuse et intégrale pour une lutte efficace contre *A. euteiches* reposerait alors sur la mise en œuvre d'un pool de microorganismes issus du terroir normand, pour en maximiser l'efficacité. Il s'agit alors de contribuer à l'enrichissement ciblé dans le sol des associations et des interactions avec les microorganismes natifs au bénéfice de la santé de la plante. Une attention particulière concernant le microbiome associé aux nodules racinaires apparaît aussi comme essentiel. Par le décryptage du déterminisme des facteurs environnementaux ainsi que du génotype de la plante hôte sur les associations microbiennes permettra de développer des consortia optimaux spécifiques, et donc favoriser le succès d'implantation des solutions (Martínez-Hidalgo and Hirsch, 2017).



### **Quelques limites :**

Lors de ce travail, le potentiel antagoniste de l'ensemble des isolats a été mis en évidence uniquement *in vitro*. Bien évidemment, les assertions concernant une utilisation comme moyen de lutte contre *A. euteiches* ne peuvent être validés qu'après test en présence de la plante. Seul deux milieux de culture très généralistes (LB et R<sub>2</sub>A pour le sol rhizosphérique ; YMA pour les nodules) ont été utilisés, ce qui a pu contraindre la diversité des souches récupérées. Il pourrait être intéressant de réaliser un screening à plus grande échelle, sur d'autres milieux de culture. De plus, seul le potentiel bactérien a été exploré. Au vu des nombreux services des champignons en lien avec la santé des plantes, il serait judicieux d'explorer ce compartiment. Outre la recherche d'enzyme lytiques classiques, d'autres tests classiques de screening pourraient être appliqués pour une caractérisation PGPR plus complète des souches (production d'auxine, d'H<sub>2</sub>CN, de sidérophores, solubilisation du phosphore). La conception d'un consortium à visée de lutte contre les maladies nécessite aussi de vérifier la compatibilité entre les souches mises en contact pour limiter les interactions négatives, néfastes à l'efficacité des assemblages (Sarma *et al.*, 2015).

#### **5.2.2.2 Le pilotage des phytobiomes**

Les microbiomes associés aux plantes jouent un rôle capital dans la santé et la productivité des plantes (Berg *et al.*, 2017). La modification des équilibres entre microorganismes au bénéfice de la santé des plantes est de plus en plus envisagée comme une solution prometteuse pour la gestion des phytopathologies. Pour une lutte efficace contre les phytopathologies, il s'agit de miser sur la construction de la suppressivité des sols par un modelage microbien ciblé. L'existence de ce phénomène de suppressivité des sols est rapportée pour différentes maladies comme par exemple la galle commune de la pomme de terre causée par des *Streptomyces*, des fusarioses chez plusieurs espèces végétales, ou encore le rhizoctone brun chez la betterave ( Raaijmakers *et al.*, 2009 ; Mendes *et al.*, 2011). Le cas le plus connu est le déclin naturel du piétin échaudage sur culture de blé au champ. En condition de monoculture, la gravité de la maladie va augmenter les premières années pour diminuer ensuite naturellement. Ce phénomène est directement lié à la construction progressive dans les sols d'une microflore antagoniste, principalement des populations de *Pseudomonas fluorescens* (Weller *et al.*, 2002). L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce travail démontre que



les espèces végétales voire les variétés d'une même espèce constituent à elles seules un agent de sélection très efficace de populations microbiennes bénéfiques. Ainsi le couvert végétal en place (ici colza, pois d'hiver et féverole) va conduire à des assemblages microbiens distincts dans la rhizosphère, et donc des potentialités biocontrôle différentes. Ces résultats soulignent clairement que les plantes présentent donc des capacités variables de recrutement des microorganismes. La compréhension des mécanismes qui gouvernent le recrutement ainsi que l'activité des organismes recrutés dans l'objectif de construire une communauté microbienne bénéfique efficiente pourrait ouvrir de multiples opportunités d'exploitation pour augmenter la productivité des cultures (Berendsen *et al.*, 2012).

Les exsudats racinaires, utilisés en tant que substrats ou comme molécules signal, représenteraient la clé du dialogue plantes - microorganismes (Ryan *et al.*, 2009). Les plantes ajustent en permanence la composition de leurs exsudats et modulent ainsi leurs microbiomes (Lareen *et al.*, 2016; Sasse *et al.*, 2018). Les plantes vont attirer certains microorganismes au regard de leurs exigences, surtout démontrées pour la nutrition (Parniske, 2008 ; Ferguson *et al.*, 2019). Les populations microbiennes recrutées par la plante constituent aussi sa ligne de défense principale sur le front de bataille avec les pathogènes (Raaijmakers *et al.*, 2009). L'influence des plantes est probablement souvent bien plus large qu'uniquement limitée à la zone rhizosphérique, rendant leur utilisation d'autant plus pertinent (Bakker *et al.*, 2012). Ainsi, puisque les plantes se succèdent au cours des rotations des cultures, les microorganismes colonisant la rhizosphère nouvellement formée vont provenir d'un pool construit au préalable dans le sol (Jones *et al.*, 2004). La disponibilité des populations bénéfiques est donc directement sous la dépendance de la sélection par l'espèce végétale cultivée précédemment. Les rotations des cultures représentent un outil séculaire dont le bénéfice le plus important concerne la réduction des maladies causées par des pathogènes. Jouer sur ce levier apparaît a priori comme un outil opérant pour limiter le développement des pathogènes (Abawi and Widmer, 2000). Ces postulats manquent encore souvent d'observation et de mesures concrètes. Or, il apparaît aujourd'hui nécessaire d'obtenir des connaissances supplémentaires sur les effets de ces pratiques non plus seulement sur la dynamique des organismes pathogènes mais aussi pour la construction d'un pool de populations microbiennes à potentialité bénéfique dans les sols, en tant qu'héritage des précédents. Les pratiques culturales, tels que le labour, l'apport de matières organiques ou encore l'inoculation d'agents microbiens, vont aussi avoir un impact fort sur les communautés microbiennes et constituent de ce fait d'autres outils de choix pour les façonner (Hartman *et al.*, 2018). Une des clés de succès pourrait être déjà de favoriser au maximum la





diversité microbienne des sols (Berg *et al.*, 2017), en misant sur une plus grande probabilité de rencontrer des partenaires bénéfiques dans une communauté diverse et multiple. Cette diversité microbienne constitue de plus un moyen de limiter la prolifération des pathogènes (Mendes *et al.*, 2011). Le concept de « Smart-farming », évoqué par Hartman *et al.* (2018) se dessine alors, pour la mise en œuvre, en bonne intelligence, de différents leviers et technologies visant à améliorer la qualité, la quantité et la durabilité des productions agricoles.

Une autre piste résultant des résultats obtenus dans le cadre de ce travail découle de l'observation d'un effet du génotype des cultivars de pois sur le microbiome associé aux nodules, en particulier concernant les associations privilégiées mises en place avec des microorganismes à potentialité biocontrôle. La capacité à recruter des microorganismes spécifiques constitue à ce titre une caractéristique d'intérêt chez les plantes hôtes. Les programmes de sélection variétale ne prennent généralement pas en compte l'aptitude des lignées végétales à établir des interactions bénéfiques avec les microorganismes. Il s'agirait alors de caractériser les traits spécifiques chez la plante, voire les gènes, responsables de la sélection de microorganismes à effet biocontrôle issus du sol et de la mise en place d'interactions au bénéfice de la santé des cultures (Smith and Goodman, 1999). La sélection variétale pourrait alors être repensée sur la base de la construction d'un holobionte complet, un génotype végétal capable d'établir des relations bénéfiques avec un microbiome riche en organismes PGPR, et plus spécifiquement à potentialité biocontrôle. Les variétés de pois de printemps apparaissent ici comme peu efficaces pour recruter en abondance des endophytes antagonistes, au contraire des variétés de pois d'hiver. Elucider la base génétique de cette observation pourrait alors incrémenter les traits fonctionnels à rechercher pour diriger la conception de variétés résistantes à *A. euteiches*, en complément de ceux mis en évidence lors de la comparaison de l'expression de la maladie et des modifications architecturales induites chez les deux groupes variétaux de pois.

### **Quelques limites :**

Toutefois, la prudence reste de mise concernant l'ensemble de ces résultats. En effet, seul trois cultivars végétaux ont été étudiés concernant les assemblages rhizosphériques et 6 cultivars pour les microbiomes des nodules. Il convient donc de ne pas généraliser les résultats obtenus, en particulier au regard de la forte influence que les caractéristiques physicochimiques des sols peuvent avoir, ainsi que les pratiques culturales. De plus, l'ensemble des assertions sur la construction de communautés microbiennes antagonistes repose sur la description dans la

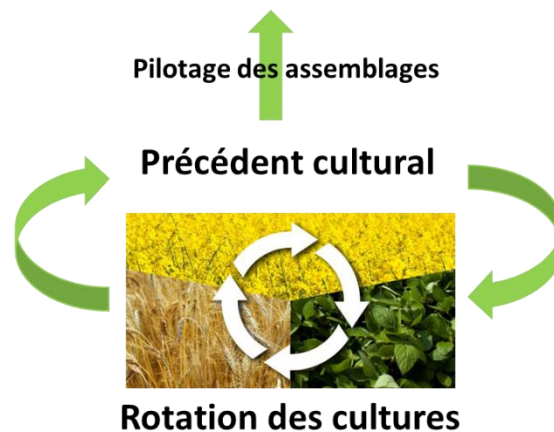
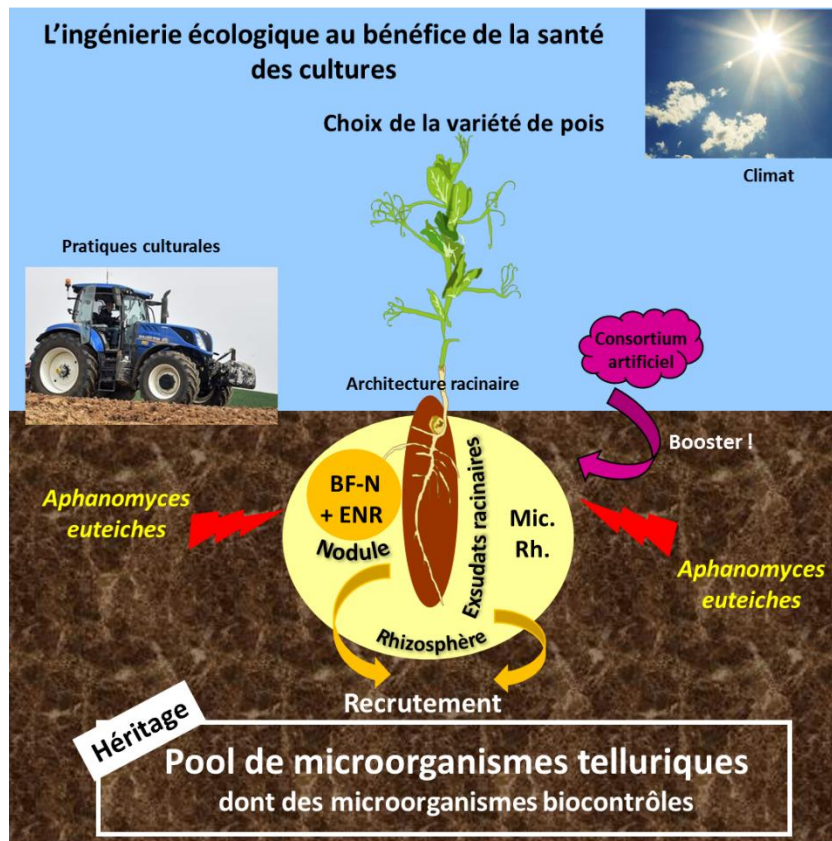


littérature des capacités potentiels des genres bactériens ciblés. En aucun cas leur efficacité n'est totalement avérée ici en tant que microbiome d'intérêt pour la lutte contre la pourriture racinaire du pois. Cette étude se veut être principalement une exploration de ces pistes, pour une meilleure compréhension des systèmes et la conceptualisation de la lutte intégrée contre les maladies en prenant en compte l'ensemble des interactions plantes – microorganismes.

### 5.2.2.3 Cas de la variété Indiana

Il est intéressant de faire un focus récapitulatif particulier concernant la variété de pois d'hiver Indiana. L'ensemble des résultats obtenus concernant cette variété la rapproche en général plus des variétés de pois de printemps que des autres pois d'hiver. Indiana présente de base une architecture racinaire constitutivement plus courte que celles des autres variétés étudiées ici. Dans les conditions de l'expérimentation mise en place pour comparer l'expression de la pourriture racinaire du pois en fonction des doses pathogènes, la variété Indiana montre une sensibilité importante à ce pathogène, ainsi qu'une réduction de la croissance racinaire en réponse à l'infection, au contraire des variétés Dexter et Myster. Les mécanismes de défense mis en œuvre sont donc très probablement différents. Cette distinction se retrouve étonnamment aussi concernant la diversité et la structure des microbiomes bactériens associés aux nodules, globaux mais aussi en ciblant les genres connus comme biocontrôle envers *A. euteiches*. La diversité et l'abondance des endophytes bactériens au sein des nodules se rapprochent dans les deux cas plutôt des variétés de pois de printemps. Il convient de noter que les variétés Dexter et Myster présentent une résistance au froid plus importante qu'Indiana, finalement assez sensible même si elle reste pourtant considérée comme pois d'hiver (Source : R.A.G.T. Semences). Il serait intéressant d'étudier de plus près les différences génétiques entre ces variétés, pour rechercher les facteurs de dissemblance pouvant sous-tendre ces associations spécifiques avec les microorganismes.

L'étude de cette variété nous a finalement offert l'opportunité d'observer un cas intermédiaire. Mais il serait du coup judicieux d'élargir le panel de pois d'hiver à d'autres variétés présentant une grande résistance au froid.



**Mic. Rh. : Microbiome Rhizosphérique**  
**BF-N : Bactéries Fixatrices d'Azote**  
**ENR: Endophyte Non Rhizobiacés**

Figure 53 : Schéma récapitulatif sous forme de concept qu'est l'ingénierie écologique au bénéfice de la santé des cultures. La santé des plantes est influencée par un grand nombre de facteurs dont par exemple le climat, les pratiques agricoles et les interventions humaines, les paramètres physico-chimiques et biologiques du sol. Par ces travaux de recherche, on y ajoute, le choix variétal avec son architecture racinaire ainsi que sa capacité à recruter des agents de biocontrôle qui proviennent d'un pool microbien directement influencé par le précédent cultural et donc par la rotation. A tous ces facteurs influençant la santé des plantes, le pool microbien peut être agrémenter par un consortium artificiel bénéfique pour les plantes.

#### 5.2.2.4 Conclusion : l'ingénierie écologique des microbiomes au service de la santé des plantes

Un nouvel horizon de recherche en médecine et en agriculture repose sur une amélioration de la santé et de la performance des organismes par la modification de leur microbiome (Costello *et al.*, 2012 ; Gopal *et al.*, 2013). Au vu de tous les bénéfices que peuvent apporter les microorganismes, l'exploitation de leurs caractéristiques représentent une alternative prometteuse pour soutenir la production agricole. Manipuler la composition des communautés microbiennes pourrait ainsi constituer une solution durable pour promouvoir la croissance des plantes et gérer les phytopathologies en limitant le recours aux fertilisants chimiques et aux produits phytosanitaires (Adesemoye and Kloepper, 2009; del Carmen Orozco-Mosqueda *et al.*, 2018). Le développement de méthodes permettant de façonner la composition et la structure du microbiome dans le but d'encourager les relations bénéfiques est une vision de plus en plus pertinente (Lareen *et al.*, 2016). Il s'agit plus particulièrement, par ingénierie écologique, de pouvoir enrichir les sols et les microbiomes associés aux plantes en groupes microbiens spécifiques dont les activités de biocontrôle vont permettre de gérer les pathogènes (Ryan *et al.*, 2009 ; Berendsen *et al.*, 2012 ; Mueller and Sachs, 2015 ; Gómez Expósito *et al.*, 2017). La construction et l'optimisation d'un environnement rhizosphérique et racinaire qui permettraient à la plante d'établir des liens essentiels avec ces microorganismes bénéfiques, constituent certes une utopie mais aussi un beau défi important à relever. Ce modelage à façon des interactions plantes-microorganismes au bénéfice de la santé des plantes reposeraient sur la mise en œuvre et la combinaison de différentes stratégies (Figure 53) :

- Le choix des variétés de pois cultivées, sélectionné en fonction de traits favorisant une meilleure résistance à la pourriture racinaire, en lien avec l'architecture racinaire et surtout de leur capacité à recruter efficacement des microorganismes à potentialité biocontrôle.
- La mise en œuvre de consortia artificiels spécifiques adaptés, à partir d'un assemblage pertinent des isolats obtenus ici, ciblant à la fois la rhizosphère mais aussi l'environnement racinaire, dans l'objectif d'amplifier et enrichir de façon choisie les communautés microbiennes et donc de maximiser les potentialités d'interactions bénéfiques.



- La construction de séquences de rotation des cultures permettant de moduler les communautés microbiennes des sols, en particulier selon l'héritage issu du précédent cultural.

L'ensemble de ces actions ont pour objectif d'optimiser les associations microbiennes pour fournir à la plante des partenaires efficaces à recruter, pour la lutte contre *A. euteiches*. Bien évidemment, l'influence des caractéristiques physico-chimiques du sol, des pratiques culturales ainsi que du climat sont autant de points à prendre aussi en considération. Il apparaît évident qu'un point de vue plus holistique des systèmes, en partant de la vision simple du pathosystème vers la considération de l'holobionte jusqu'à la grande complexité du pathobiome, est indispensable pour une meilleure compréhension des multiples interactions entre tous les protagonistes, en particulier pour arriver à exploiter les équilibres microbiens et les variétés à leur plein potentiel.

### **5.3 Quelques perspectives de recherche**

#### **5.3.1 La spectroscopie Infra-Rouge en tant qu'outil de diagnostic précoce**

Le seul moyen actuellement à disposition pour une gestion du risque lié à *A. euteiches* est de réaliser des tests de diagnostic préventifs, biologique et/ou moléculaire, avant semis, pour évaluation des parcelles agricoles par détection du pathogène dans les sols (décrit dans la partie 2.3.2 de la synthèse bibliographique). Ce travail de thèse a été l'occasion de démontrer l'existence possible de solutions de valeur pour la lutte contre ce pathogène, principalement à travers une combinaison de différents leviers comme le choix des variétés, le développement de consortia d'agents de biocontrôle, la construction des microbiomes au bénéfice de la lutte contre la pourriture racinaire du pois par la rotation culturale. Une autre piste à explorer repose sur une détection précoce de l'infection par le pathogène en ciblant non pas la notation de symptômes sur le système racinaire (qui entraînerait une destruction de la plante) mais par analyse non destructive des parties aériennes. Pour cela, l'intérêt de l'outil de spectroscopie infra-rouge a été prospecté. Cette technologie connaît un essor important dans le secteur agro-alimentaire en tant que moyen de détection de pathogènes ou de composés biochimiques particuliers (Davis and Mauer, 2010 ; Assaf *et al.*, 2014). La spectroscopie infra-rouge est aussi décrite dans la littérature comme moyen de détection des phytopathogènes sur plantes, et donc





permettant de réaliser des diagnostic fiables (Conrad and Bonello, 2016 ; Zhang *et al.*, 2017 ; Yao *et al.*, 2019).

Au sein de cette thèse nous avons entamé un travail exploratoire pour évaluer l'opportunité de développer un outil de détection précoce par spectroscopie à transformée de Fourier selon la technique de la réflectance totale atténuée (FTIR-ATR), sur feuilles de pois. La FTIR-ATR est décrite dans la littérature comme outil pertinent de détection et d'identification de certains pathogènes fongiques sur plante (Salman *et al.*, 2010). Ce travail a permis dans un premier temps la création d'une banque de spectres en moyen infrarouge, acquis sur les feuilles de six variétés de pois protéagineux saines ou infectées à deux doses pathogènes. La comparaison des spectres obtenus a permis de commencer à rechercher l'existence de différence, non pas entre variétés, mais entre plantes saines et plantes infectées, et qui permettrait donc un diagnostic quelle que soit la variété cultivée par l'agriculteur. La création d'un modèle informatique (en collaboration avec Lyes Lakhal, UniLaSalle campus de Beauvais), basé sur un réseau neuronal artificiel permettant une classification rapide des spectres, est en cours. Les premières tendances obtenues ont montré qu'un diagnostic de la pathologie serait possible à 80% de probabilité. Toutefois, ce travail reste encore trop incomplet. Il est nécessaire de compléter ce modèle par l'acquisition d'un nombre plus conséquent de spectres en moyen infrarouge, sur un panel plus important de variétés. Il sera par la suite intéressant de confronter les résultats obtenus en conditions *in vitro* avec la réalité du terrain par des prélèvements en parcelles agricoles.

### **5.3.2 Décryptage des mécanismes de défenses mis en place par les variétés d'hiver**

Les résultats de l'analyse comparée de la sévérité des symptômes et des modifications architecturales induites par *A. euteiches* chez les pois d'hiver et de printemps ont montré une différence dans la symptomatologie aérienne lors d'une inoculation à dose faible de pathogène. L'absence de modifications de la partie aérienne chez les pois d'hiver, pourtant très touchés au niveau racinaire, suscite de nombreuses questions quant aux mécanismes de défense de ces variétés. Il serait donc intéressant dans de futures recherches de pouvoir décrypter les systèmes de défenses (génétiques, métaboliques, physiologiques, mécaniques) déclenchés par l'infection par *A. euteiches*. En particulier, une observation attentive et une comparaison entre variétés de la structure des tissus végétaux se situant entre les parties aérienne et racinaire permettrait de



mettre en évidence un éventuel mécanisme de barrière physique contre le pathogène, comme observé par Eynck *et al.*, (2009). Plus globalement, il pourrait être intéressant de réaliser un suivi général comparatif de la colonisation des tissus par *A. euteiches*, en particulier lors de la production nouvelle d'oospores au sein des racines, étape clé du cycle de vie du pathogène.

En parallèle, au vu des résultats obtenus, il serait judicieux de pouvoir évaluer en conditions semi-contrôlées (serres) et au champ la contribution des cultures de pois sur la multiplication des densités d'oospores présents dans le sol, comparativement au pois de printemps. En effet, on peut imaginer que le stock d'inoculum d'*A. euteiches* pourrait être influencé par la culture des variétés de pois d'hiver. Leurs avantages, en lien avec une apparente meilleure résistance au champ face à la maladie, ne doivent pas pour autant être contrebalancés par une augmentation du risque pathogène pour les cultures suivantes.

### **5.3.3 Mesurer l'impact des BCAs identifiés lors de cette thèse sur la pourriture racinaire du pois dans l'objectif de concevoir des consortia bénéfiques adaptés**

Les isolats bactériens issus du sol et des nodules de pois dont l'effet antagoniste envers *A. euteiches* a été mis en évidence ici uniquement *in vitro* feront l'objet de recherche complémentaire pour évaluer leur efficacité de protection réelle des plantes contre la pourriture racinaire du pois. L'innocuité des souches sera testée en ajoutant les ou la souche(s) biocontrôle dans le substrat de croissance des plantes puis l'efficacité de protection pourra être vérifié *in vitro* en milieu stérile et en conditions semi-contrôlées dans du sol exporté, en présence ou non des communautés microbiennes natives, avant de passer au test au champ. Enfin, la possibilité de construction d'un consortium dédié à la protection contre *A. euteiches* nécessitera de réaliser différentes combinaisons spécifiques et tester leur pertinence et leur efficacité sur différentes variétés, dans différentes conditions environnementales. Une attention particulière sera portée à l'évaluation de la compatibilité des souches entre elles.

Les mécanismes d'action mis en œuvre par les différents isolats contre *A. euteiches* pourront également être élucidés : recherche de la production de métabolites secondaires, test des effets sur la germination des oospores ou sur les zoospores, production de sidérophores, production d'auxine, etc.



#### **5.3.4 Détermination des facteurs du déterminisme du recrutement des microorganismes au sein de la rhizosphère et des nodules**

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont mis en avant le pouvoir de recrutement des espèces végétales et des variétés, en particulier pour la mise en place d'interaction au bénéfice de la résistance contre *A. euteiches*. Il serait intéressant d'extraire, étudier et comparer la rhizodéposition voire même uniquement les exsudats racinaires sécrétés, pour évaluer leur contribution dans cette sélection d'organismes de biocontrôle. Nous pourrions ainsi imaginer une expérimentation permettant une récolte des exsudats des six variétés de pois utilisées précédemment et évaluer leurs effets sur les communautés microbiennes du sol, ou plus spécifiquement sur l'attraction et la croissance d'isolats antagonistes.

Plus globalement il serait aussi intéressant de rechercher des liens génétiques entre la capacité de recrutement de microorganismes bénéfiques et la tolérance à la pourriture racinaire du pois. Les résultats de l'analyse métabarcoding ont montré que les microbiomes associés aux variétés de pois d'hiver présentant une forte tolérance au froid se distinguent des autres variétés testées dont la tolérance au froid est plus faible. Des recherches supplémentaires pourraient de cette façon améliorer la compréhension du déterminisme de la sélection des endophytes mais aussi des microorganismes de la rhizosphère par les cultivars.

#### **5.3.5 Evaluer le pouvoir de la rotation culturale, et plus particulièrement de l'héritage du précédent cultural pour le modelage du phytobiome en faveur de la lutte contre *A. euteiches***

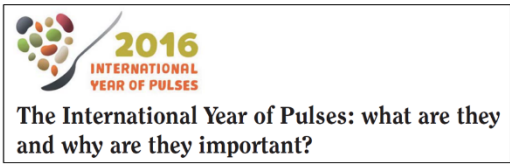
Cet axe de recherche a permis de mettre en évidence le rôle de l'espèce végétale et du choix variétal sur la manipulation des genres microbiens à potentialité biocontrôle au bénéfice des plantes. Des futures recherches pourront être réalisées pour comprendre davantage l'effet d'autres cultures très présentes au sein des rotations normandes, par exemple, le blé, l'orge, la betterave. Ainsi nous pourrions créer une base de données sur les différents microbiomes en fonction des cultures et proposer une succession de cultures idéale avant pois. Par ailleurs il sera intéressant de vérifier la pertinence de cette agriculture de précision ciblée sur les interactions plantes – microorganismes bénéfiques par l'évaluation de l'effet protecteur contre la pourriture racinaire. Ainsi des cultures de différents précédents végétaux (blé, colza, etc.)



pourraient être effectués sur un même sol de départ, en réalisant un suivi des modifications microbiennes induites. Puis une culture de pois de printemps pourrait être effectuée sur ces sols post-modélage, avec inoculation artificielle du pathogène (à dose faible et modérée). L'objectif serait alors d'évaluer les différences dans l'expression des symptômes et donc mettre en avant un potentiel de protection







Plant and Soil 171: 235–244, 1995.  
© 1995 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

Soil Biology & Biochemistry  
www.elsevier.com/locate/soilbio

Oat residue and soil compaction influences on common root rot (*Aphanomyces euteiches*) of peas in a fine-textured soil

Calcium concentrations of soil affect suppressiveness against *Aphanomyces* root rot of pea

Techniques

A Sensitive Assay for Rapid Detection and Quantification of *Aphanomyces euteiches* in Soil

Références (APA)

Forum | New Phytologist | frontiers in Plant Science | ORIGINAL RESEARCH published: 01 January 2018 doi: 10.3389/fpls.2017.02194

Commentary

Disentangling the factors shaping microbiota composition across the plant holobiont

Introduction  
Healthy and asymptomatic plants in nature are colonized by a rich assemble overall structurally related bacterial communities being to only four major bacterial phyla (Proteobacteria, Actinobacteria, Bacacteroidetes and Firmicutes), with Proteobacteria/Actinobacteria community members being consistently on and depleted, respectively, in plant roots compared to surrounding soil biomes (Esguerra *et al.*, 2015). Import Coleman *et al.* reports here that bacterial communities in and with agave plants growing in arid environments also show taxonomic signatures, indicating that the selective forces shape

Comparative Genome-Wide-Association Mapping Identifies Common Loci Controlling Root System Architecture and Resistance to *Aphanomyces euteiches* in Pea

OPEN ACCESS  
Edited by: [Name]

Review | Cell

The rhizosphere microbiome and plant health

Roeland L. Berendsen<sup>1</sup>, Corné M.J. Pieterse<sup>1,2</sup> and Peter A.H.M. Bakker<sup>1</sup>



## Références

- Abawi, G. S., & Widmer, T. L. (2000). Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Applied soil ecology*, *15*(1), 37-47.
- Abberton, M. (2010). Enhancing the role of legumes: potential and obstacles. *Integrated crop management*, *11*, 177-187.
- Abed, H., Rouag, N., Mouatassem, D., Rouabhi, A. (2016). Screening for *Pseudomonas* and *Bacillus* antagonistic rhizobacteria strains for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. *Eurasian Journal of Soil Science* *5*, 182–191.
- Abras, M., Cartrysse, C., Froidmont, E., Jamar, D., Rondia, P., Wavreille, J. (2017). Le pois protéagineux, une légumineuse à graines riches en protéines et en énergie. Association pour le Promotion des Protéagineux et des Oléagineux (APPO) ; Gembloux.
- Adesemoye, A. O., & Kloepper, J. W. (2009). Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied microbiology and biotechnology*, *85*(1), 1-12.
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. (2014). The effect of soil horizon and mineral type on the distribution of siderophores in soil. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *131*, 184-195.
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial biotechnology*, *7*(3), 196-208.
- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in plant science*, *17*(2), 73-90.
- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., de la Cruz, J., Monte, E., & Llobell, A. (2001). An antifungal exo- $\alpha$ -1, 3-glucanase (AGN13. 1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(12), 5833-5839.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K., & Hayashi, H. (2005). Transesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, *435*, 824-827.
- Alabouvette, C., Edel, V., Lemanceau, P., Olivain, C., Recorbet, G., & Steinberg, C. (2001). Diversity and interactions among strains of *Fusarium oxysporum*: application to biological control. *Biotic interactions in plant–pathogen associations*. Wallingford, UK: CAB International, 131-158.
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision.
- Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International journal of molecular sciences*, *18*(4), 705.
- Assaf, A., Cordella, C. B., & Thouand, G. (2014). Raman spectroscopy applied to the horizontal methods ISO 6579: 2002 to identify *Salmonella* spp. in the food industry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *406*(20), 4899-4910.
- Azcón-Aguilar, C., Jaizme-Vega, M. C., & Calvet, C. (2002). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In *Mycorrhizal technology in agriculture* (pp. 187-197). Birkhäuser, Basel.
- Badri, D. V., Weir, T. L., van der Lelie, D., & Vivanco, J. M. (2009). Rhizosphere chemical dialogues : plant–microbe interactions. *Current opinion in biotechnology*, *20*(6), 642-650.
- Bai, Y., Zhou, X., & Smith, D. L. (2003). Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop science*, *43*(5), 1774-1781.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol.* *57*:233-266.
- Baker, K. F., & Cook, R. J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. WH Freeman and Company.

- Bakker, M. G., Manter, D. K., Sheflin, A. M., Weir, T. L., & Vivanco, J. M. (2012). Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. *Plant and Soil*, 360(1-2), 1-13.
- Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I., Doolittle, W.F. (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* 290, 972-977. <https://doi.org/10.1126/science.290.5493.972>
- Balestrini, R.M., Lumini, E., Borriello, R., Bianciotto, V. (2014). Plant-Soil Biota Interactions, in: *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Academic Press, London, UK.
- Baltrus, D. A. (2017). Adaptation, specialization, and coevolution within phytobiomes. *Current opinion in plant biology*, 38, 109-116.
- Bàrberi, P. A. O. L. O. (2002). Weed management in organic agriculture: are we addressing the right issues? *Weed research*, 42(3), 177-193.
- Bardin, S. D., Huang, H. C., Pinto, J., Amundsen, E. J., & Erickson, R. S. (2004). Biological control of Pythium damping-off of pea and sugar beet by Rhizobium leguminosarum bv. viceae. *Canadian journal of botany*, 82(3), 291-296.
- Barea, J. M. (2015). Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(2), 261-282.
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcon, R., & Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417), 1761-1778.
- Bass, D., Stentiford, G. D., Wang, H. C., Koskella, B., & Tyler, C. R. (2019). The pathobiome in animal and plant diseases. *Trends in ecology & evolution*, 34(11), 996-1008.
- Batjes, N. H., & Sombroek, W. G. (1997). Possibilities for carbon sequestration in tropical and subtropical soils. *Global change biology*, 3(2), 161-173.
- Berendsen, R. L., & Pieterse, C. M. J, Bakker PAHM. (2012). *The rhizosphere microbiome and plant health*. *Trends Plant Sci*, 17, 478-48610.
- Berg, G., Alavi, M., Schmidt, C. S., Zachow, C., Egamberdieva, D., Kamilova, F., & Lugtenberg, B. (2013). Biocontrol and osmoprotection for plants under salinated conditions. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, 1, 561-573.
- Berg, G., Köberl, M., Rybakova, D., Müller, H., Grosch, R., & Smalla, K. (2017). Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS microbiology ecology*, 93(5).
- Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 68(1), 1-13.
- Bergersen, F. J. (1982). Root nodules of legumes: Structure and functions. *Root nodules of legumes: structure and functions*.
- Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R., & Bianciotto, V. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. *Frontiers in microbiology*, 6, 1559.
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., ... & Séjalon-Delmas, N. (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol*, 4(7), e226.
- Bever JD, Platt TG, Morton ER. (2012). Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. *Annu Rev Microbiol*. 66:265-283.

- Bhargava, P., Vats, S., & Gupta, N. (2019). Metagenomics as a Tool to Explore Mycorrhizal Fungal Communities. In *Mycorrhizosphere and Pedogenesis* (pp. 207-219). Springer, Singapore.
- Bibi, F., Yasir, M., Song, G. C., Lee, S. Y., & Chung, Y. R. (2012). Diversity and characterization of endophytic bacteria associated with tidal flat plants and their antagonistic effects on oomycetous plant pathogens. *Plant Pathol J*, 28(1), 20-31.
- Bidartondo, M.I., Redecker, D., Hijri, I., Wiemken, A., Bruns, T.D., Domínguez, L., Sérsic, A., Leake, J.R., Read, D.J. (2002). Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 419, 389–392. <https://doi.org/10.1038/nature01054>
- Biddle, A. J., & Cattlin, N. (2007). *Pests, Diseases and Disorders of Peas and Beans: A Colour Handbook*. CRC Press.
- Biederbeck, V. O., Zentner, R. P., & Campbell, C. A. (2005). Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semiarid climate. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(10), 1775-1784.
- Błaszowski, J. (1993). Comparative studies of the occurrence of arbuscular fungi and mycorrhizae (Glomales) in cultivated and uncultivated soils of Poland. *Acta Mycologica*, 28(1), 93.
- Blumenstein, K., Albrechtsen, B.R., Martín, J.A., Hultberg, M., Sieber, T.N., Helander, M., Witzell, J. (2015). Nutritional niche overlap potentiates the use of endophytes in biocontrol of a tree disease. *BioControl* 60, 655–667.
- Bødker, L., Kjølner, R., Kristensen, K., & Rosendahl, S. (2002). Interactions between indigenous arbuscular mycorrhizal fungi and *Aphanomyces euteiches* in field-grown pea. *Mycorrhiza*, 12(1), 7-12.
- Bødker, L., Kjølner, R. & Rosendahl, S. (1998). Effect of phosphate and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mycorrhiza* 8, 169–174.
- Bollman, M. I., & Vessey, J. K. (2006). Differential effects of nitrate and ammonium supply on nodule initiation, development, and distribution on roots of pea (*Pisum sativum*). *Botany*, 84(6), 893-903.
- Bonfante, P., & Requena, N. (2011). Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current opinion in plant biology*, 14(4), 451-457.
- Bonhomme, M., André, O., Badis, Y., Ronfort, J., Burgarella, C., Chantret, N., ... & Navier, H. (2014). High-density genome-wide association mapping implicates an F-box encoding gene in *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches*. *New Phytologist*, 201(4), 1328-1342.
- Bordat, A., Savoie, V., Nicolas, M., Salse, J., Chauveau, A., Bourgeois, M., ... & Marget, P. (2011). Translational genomics in legumes allowed placing in silico 5460 unigenes on the pea functional map and identified candidate genes in *Pisum sativum* L. G3: *Genes, Genomes, Genetics*, 1(2), 93-103.
- Bourion, V., Heulin-Gotty, K., Aubert, V., Tisseyre, P., Chabert-Martinello, M., Pervent, M., ... & Brunel, B. (2018). Co-inoculation of a pea core-collection with diverse rhizobial strains shows competitiveness for nodulation and efficiency of nitrogen fixation are distinct traits in the interaction. *Frontiers in plant science*, 8, 2249.
- Bourion, V., Lejeune-Hénaut, I., Munier-Jolain, N., & Salon, C. (2003). Cold acclimation of winter and spring peas: carbon partitioning as affected by light intensity. *European journal of agronomy*, 19(4), 535-548.
- Bowers, J. H., & Parke, J. L. (1993). Epidemiology of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. *Phytopathology*, 83(12), 1466-1473.
- Boyardieu, J. (1991). *Produire des grains oléagineux et protéagineux* (pp. 115-152). Technique et documentation-Lavoisier.

- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol.* 64 :807-838.
- Busby, P. E., Soman, C., Wagner, M. R., Friesen, M. L., Kremer, J., Bennett, A., ... & Dangl, J. L. (2017). Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLoS biology*, 15(3), e2001793.
- Busby, R. R., Rodriguez, G., Gebhart, D. L., & Yannarell, A. C. (2016). Native *Lespedeza* species harbor greater non-rhizobial bacterial diversity in root nodules compared to the coexisting invader, *L. cuneata*. *Plant and soil*, 401(1-2), 427-436.
- Calles, T., Xipsiti, M., & del Castillo, R. (2019). Legacy of the international year of pulses. *Environmental Earth Sciences*, 78(5), 1-8.
- Calles, T. (2016). The international year of pulses: what are they and why are they important. *Agriculture for Development*, 26, 40-42.
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., & Oomah, B. D. (2010). Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food research international*, 43(2), 461-482.
- Cannesan, M. A., Gangneux, C., Lanoue, A., Giron, D., Laval, K., Hawes, M., ... & Vitré-Gibouin, M. (2011). Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches*. *Annals of Botany*, 108(3), 459-469.
- Cannesan, M. A., Durand, C., Burel, C., Gangneux, C., Lerouge, P., Ishii, T., ... & Vitré-Gibouin, M. (2012). Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination. *Plant physiology*, 159(4), 1658-1670.
- Cawoy, H., Bettioli, W., Fickers, P., & Ongena, M. (2011). *Bacillus*-based biological control of plant diseases. *Pesticides in the modern world-pesticides use and management*, 273-302.
- Champomier-Vergès, M. C., & Zagorec, M. (2015). *La métagénomique: Développements et futures applications*. Quae.
- Chan, M. K. Y., & Close, R. C. (1987). *Aphanomyces* root rot of peas 1. Evaluation of methods for assessing inoculum density of *Aphanomyces euteiches* in soil. *New Zealand journal of agricultural research*, 30(2), 213-217.
- Chan, M. K. Y., & Close, R. C. (1987). *Aphanomyces* root rot of peas 3. Control by the use of cruciferous amendments. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 30(2), 225-233.
- Chandra, S., Choure, K., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2007). Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotiorum* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 124-130.
- Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 48(5), 489-499.
- Chaube, H. S., Mishra, D. S., Varshney, S., & Singh, U. S. (2004). Biocontrol of plant pathogens by fungal antagonists: Historical background, present status and future prospects. *Annual Review of Plant Pathology (Vol. 2)*, 2, 1-42.
- Chaudhari, B. L., Patil, S. N., Paradeshi, J. S., Chaudhari, M. A., & Chaudhari, C. S. (2017). Premier Biocontrol Traits of *Pseudomonads*: Siderophores, Phenazines or What Else?. In *Microorganisms for Green Revolution* (pp. 351-390). Springer, Singapore.
- Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., Selvakumar, G., & Sundaram, S. P. (2015). Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential. *Applied Soil Ecology*, 95, 38-53.

- Chen, Y., Qiao, W., Zeng, L., Shen, D., Liu, Z., Wang, X., & Tong, H. (2017). Characterization, pathogenicity, and phylogenetic analyses of *Colletotrichum* species associated with brown blight disease on *Camellia sinensis* in China. *Plant disease*, *101*(6), 1022-1028.
- Choudhary, D. K., & Varma, A. (Eds.). (2016). *Microbial-mediated induced systemic resistance in plants*. New York: Springer.
- Chuberre, C., Plancot, B., Driouich, A., Moore, J. P., Bardor, M., Gügi, B., & Vicroé, M. (2018). Plant immunity is compartmentalized and specialized in roots. *Frontiers in plant science*, *9*, 1692.
- Chupp, C., & Sherf, A. F. (1960). Vegetable diseases and their control. *Vegetable diseases and their control*.
- Coats, V. C., & Rumpho, M. E. (2014). The rhizosphere microbiota of plant invaders: an overview of recent advances in the microbiomics of invasive plants. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 368.
- Conrad, A. O., & Bonello, P. (2016). Application of infrared and raman spectroscopy for the identification of disease resistant trees. *Frontiers in plant science*, *6*, 1152.
- Conrath, U., Beckers, G. J., Langenbach, C. J., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annual review of phytopathology*, *53*, 97-119.
- Considine, M. J., Siddique, K. H., & Foyer, C. H. (2017). Nature's pulse power: legumes, food security and climate change. *Journal of Experimental Botany*, *68*(8), 1815-1818.
- Costello, E. K., Stagaman, K., Dethlefsen, L., Bohannan, B. J., & Relman, D. A. (2012). The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science*, *336*(6086), 1255-1262.
- Dandurand, L. M., Mosher, R. D., & Knudsen, G. R. (2000). Combined effects of *Brassica napus* seed meal and *Trichoderma harzianum* on two soilborne plant pathogens. *Canadian journal of microbiology*, *46*(11), 1051-1057.
- Dar, M. H., & Reshi, Z. A. (2017). Vesicular Arbuscular Mycorrhizal (VAM) fungi-as a major biocontrol agent in modern sustainable agriculture system. *Russian Agricultural Sciences*, *43*(2), 138-143.
- Davis, R., & Mauer, L. J. (2010). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, *2*, 1582-1594.
- De los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G. C., Miranda-Salcedo, M. A., & Peña-Cabriales, J. J. (2012). Burkholderiacepacia XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(8), 2615-2623.
- De Meyer, S. E., De Beuf, K., Vekeman, B., & Willems, A. (2015). A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, *83*, 1-11.
- Deacon, J. W., & Donaldson, S. P. (1993). Molecular recognition in the homing responses of zoosporic fungi, with special reference to *Pythium* and *Phytophthora*. *Mycological Research*, *97*(10), 1153-1171.
- Deacon, J. W., & Saxena, G. (1998). Germination triggers of zoospore cysts of *Aphanomyces euteiches* and *Phytophthora parasitica*. *Mycological Research*, *102*(1), 33-41.
- Del Carmen Orozco-Mosqueda, M., del Carmen Rocha-Granados, M., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2018). Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiological research*, *208*, 25-31.



- Depret, G., & Laguerre, G. (2008). Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae populations nodulating pea. *New Phytologist*, *179*(1), 224-235.
- Desgroux, A., Baudais, V. N., Aubert, V., Le Roy, G., de Larambergue, H., Miteul, H., ... & Burstin, J. (2018). Comparative genome-wide-association mapping identifies common loci controlling root system architecture and resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea. *Frontiers in plant science*, *8*, 2195.
- Desgroux, A., L'anthoëne, V., Roux-Duparque, M., Rivière, J. P., Aubert, G., Tayeh, N., ... & McGee, R. J. (2016). Genome-wide association mapping of partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea. *BMC genomics*, *17*(1), 124.
- D'haeze, W., & Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, *12*(6), 79R-105R.
- Dias, R. D. C., Pico, B., Espinos, A., & Nuez, F. (2004). Resistance to melon vine decline derived from *Cucumis melo* ssp. *agrestis*: genetic analysis of root structure and root response. *Plant Breeding*, *123*(1), 66-72.
- Diéguez-Uribeondo, J., García, M. A., Cerenius, L., Kozubíková, E., Ballesteros, I., Windels, C., ... & Martín, M. P. (2009). Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology*, *46*(5), 365-376.
- Dixon, R. A., & Sumner, L. W. (2003). Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology*, *131*(3), 878-885.
- Djéballi, N., Jauneau, A., Ameline-Torregrosa, C., Chardon, F., Jaulneau, V., Mathé, C., ... & Aouani, M. E. (2009). Partial resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* is associated with protection of the root stele and is controlled by a major QTL rich in proteasome-related genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *22*(9), 1043-1055.
- Doležel, J., & Greilhuber, J. (2010). Nuclear genome size: are we getting closer?. *Cytometry Part A*, *77*(7), 635-642.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M. A., Nardi, L., & Obermayer, R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of botany*, *82*(suppl\_1), 17-26.
- Doré, C., & Varoquaux, F. (2006). *Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées*. Editions Quae.
- Downie JA. (2014). Legume nodulation. *Curr Biol*. *24*(5):R184-R190.
- Downie, J. A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS microbiology reviews*, *34*(2), 150-170.
- Driouich, A., Follet-Gueye, M. L., Vicré-Gibouin, M., & Hawes, M. (2013). Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Current Opinion in Plant Biology*, *16*(4), 489-495.
- Driouich, A., Durand, C., Cannesan, M. A., Percoco, G., & Vicré-Gibouin, M. (2010). Border cells versus border-like cells: are they alike? *Journal of experimental botany*, *61*(14), 3827-3831.
- Dudeja, S. S., Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P., & Kothe, E. (2012). Interaction of endophytic microbes with legumes. *Journal of Basic Microbiology*, *52*(3), 248-260.
- Elad, Y., & Kapat, A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, *105*(2), 177-189.

- Elbadry, M., Taha, R. M., Eldougdoug, K. A., & Gamal-Eldin, H. (2006). Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of plant diseases and protection*, 113(6), 247-251.
- El-Tarabily, K. A., Hardy, G. E. S. J., & Sivasithamparam, K. (2010). Performance of three endophytic actinomycetes in relation to plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber under commercial field production conditions in the United Arab Emirates. *European Journal of Plant Pathology*, 128(4), 527-539.
- Elvira-Recueno, M., & Van Vuurde, J. W. L. (2000). Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Canadian journal of microbiology*, 46(11), 1036-1041.
- Emmert, E. A., & Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology letters*, 171(1), 1-9.
- Enquist, L. G. (1992). Studies on common root rot (*Aphanomyces euteiches*) of peas (*Pisum sativum*) in Sweden. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences (Norway)*.
- Erturk, Y., Ercisli, S., Haznedar, A., & Cakmakci, R. (2010). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biological research*, 43(1), 91-98.
- Evans, J., Fettell, N. A., Coventry, D. R., O'Connor, G. E., Walsgott, D. N., Mahoney, J., & Armstrong, E. L. (1991). Wheat response after temperate crop legumes in south-eastern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 42(1), 31-43.
- Evelin, H., Devi, T. S., Gupta, S., & Kapoor, R. (2019). Mitigation of salinity stress in plants by arbuscular mycorrhizal symbiosis: current understanding and new challenges. *Frontiers in Plant Science*, 10, 470.
- Eynck, C., Koopmann, B., Karlovsky, P., & Von Tiedemann, A. (2009). Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Phytopathology*, 99(7), 802-811.
- Faghire, M. (2012). *Rôle des microorganismes symbiotiques (cas des rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de Phaseolus vulgaris sous stress salin* (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech).
- Fawke, S., Doumane, M., & Schornack, S. (2015). Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 263-280.
- Feldmann, F., & Boyle, C. (1998). Concurrent development of arbuscular mycorrhizal colonization and powdery mildew infection on three *Begonia hiemalis* cultivars/Gleichzeitige
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of integrative plant biology*, 52(1), 61-76.
- Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones, C. H., ... & Gresshoff, P. M. (2019). Legume nodulation: The host controls the party. *Plant, cell & environment*, 42(1), 41-51.
- Fierer, N., Jackson R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(3) :626-631.
- Figueiredo, M. D. V. B., Bonifacio, A., Rodrigues, A. C., & de Araujo, F. F. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria: key mechanisms of action. In *Microbial-mediated induced systemic resistance in plants* (pp. 23-37). Springer, Singapore.

- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*, 285, 44-55.
- Flores, H. E., Vivanco, J. M., & Loyola-Vargas, V. M. (1999). 'Radicle'biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends in plant science*, 4(6), 220-226.
- Fritz, V. A., Allmaras, R. R., Pflieger, F. L., & Davis, D. W. (1995). Oat residue and soil compaction influences on common root rot (*Aphanomyces euteiches*) of peas in a fine-textured soil. *Plant and Soil*, 171(2), 235-244.
- Fry, W. E., & Grünwald, N. J. (2010). Introduction to oomycetes. *The Plant Health Instructor*.
- Gangneux, C., Cannesan, M. A., Bressan, M., Castel, L., Moussart, A., Vicré-Gibouin, M., ... & Laval, K. (2014). A sensitive assay for rapid detection and quantification of *Aphanomyces euteiches* in soil. *Phytopathology*, 104(10), 1138-1147.
- Gaulin, E., Madoui, M. A., Bottin, A., Jacquet, C., Mathé, C., Couloux, A., ... & Dumas, B. (2008). Transcriptome of *Aphanomyces euteiches*: new oomycete putative pathogenicity factors and metabolic pathways. *PLoS One*, 3(3), e1723.
- Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault-Roger, C., & Rey, P. (2014). Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7), 4847-4860.
- Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R., & Kariman, K. (2018). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, 117, 147-157.
- Gimsing, A. L., & Kirkegaard, J. A. (2009). Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemistry Reviews*, 8(1), 299-310.
- Glandorf, D. C., Verheggen, P., Jansen, T., Jorritsma, J. W., Smit, E., Leeflang, P., ... & Bakker, P. A. (2001). Effect of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r on the fungal rhizosphere microflora of field-grown wheat. *Applied and environmental microbiology*, 67(8), 3371-3378.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012: 1–15. Article ID 963401.
- Glyan'ko, A.K., Vasil'eva, G.G., Mitanova, N.B. et al. The influence of mineral nitrogen on legume-rhizobium symbiosis. *Biol Bull Russ Acad Sci* 36, 250–258 (2009).
- Godebo, A. T., Germida, J. J., & Walley, F. L. (2020). Isolation, identification, and assessment of soil bacteria as biocontrol agents of pea root rot caused by *Aphanomyces euteiches*. *Canadian Journal of Soil Science*, (0), 1-11.
- Gomaa, E. Z. (2012). Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *The Journal of Microbiology*, 50(1), 103-111.
- Gómez Expósito, R., De Bruijn, I., Postma, J., & Raaijmakers, J. M. (2017). Current insights into the role of rhizosphere bacteria in disease suppressive soils. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2529.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., & Gowda, C. L. L., and Krishnamurthy, L. (2015). *Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities*, 3, 355-377.
- Gopal, M., Gupta, A., & Thomas, G. V. (2013). Bespoke microbiome therapy to manage plant diseases. *Frontiers in microbiology*, 4, 355.
- Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol Res*. 206:131-140.

- Govindarajulu, M., Pfeffer, P. E., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D. D., Allen, J. W., ... & Schachar-Hill, Y. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, *435*, 819-823.
- Gransee, A., & Wittenmayer, L. (2000). Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *Journal of plant nutrition and soil science*, *163*(4), 381-385.
- Gregory, P. J. (2006). Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? *European Journal of Soil Science*, *57*(1), 2-12.
- Haas, D., & Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual review of phytopathology*, *41*(1), 117-153.
- Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., ... & Schulze-Lefert, P. (2015). Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell host & microbe*, *17*(5), 603-616.
- Hagedorn, D. J. (1984). Compendium of pea diseases. 57 p. *Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, Minnesota, USA*.
- Hajduk, E., Właśniewski, S., & Szpunar-Krok, E. (2015). Influence of legume crops on content of organic carbon in sandy soil. *Soil Science Annual*, *66*(2), 52-56.
- Hakim, S., Mirza, B. S., Imran, A., Zaheer, A., Yasmin, S., Mubeen, F., ... & Mirza, M. S. (2020). Illumina sequencing of 16S rRNA tag shows disparity in rhizobial and non-rhizobial diversity associated with root nodules of mung bean (*Vigna radiata* L.) growing in different habitats in Pakistan. *Microbiological Research*, *231*, 126356.
- Hammerschmidt R. (1999). PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? *Annu Rev Phytopathol.* *37*:285-306.
- Hamon, C., Baranger, A., Coyne, C. J., McGee, R. J., Le Goff, I., L'Anthoëne, V., ... & McPhee, K. E. (2011). New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple French and American environments. *Theoretical and applied genetics*, *123*(2), 261-281.
- Hamon, C., Coyne, C. J., McGee, R. J., Lesné, A., Esnault, R., Mangin, P., ... & Morin, G. (2013). QTL meta-analysis provides a comprehensive view of loci controlling partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in four sources of resistance in pea. *BMC plant biology*, *13*(1), 45.
- Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, *96*(2), 190-194.
- Hartman, K., van der Heijden, M. G., Wittwer, R. A., Banerjee, S., Walser, J. C., & Schlaeppli, K. (2018). Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. *Microbiome*, *6*(1), 1-14.
- Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, *6*(1), 58.
- Hattenschwiler, S., Barantal, S., Ganault, P., Gillespie, L., & Coq, S. (2018). Quels enjeux sont associés à la biodiversité des sols?.
- Hawes, M., Allen, C., Turgeon, B. G., Curlango-Rivera, G., Minh Tran, T., Huskey, D. A., & Xiong, Z. (2016). Root border cells and their role in plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, *54*, 143-161.
- Helgason, T., Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, A. H., & Young, J. P. W. (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, *394*(6692), 431-431.

- Helgason, T., Merryweather, J. W., Denison, J., Wilson, P., Young, J. P. W., & Fitter, A. H. (2002). Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology*, *90*(2), 371-384.
- Henry, G., Thonart, P., & Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *BASE*.
- Heungens, K., & Parke, J. L. (2001). Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. *Phytopathology*, *91*(4), 383-391.
- Heungens, K., & Parke, J. L. (2000). Zoospore homing and infection events: effects of the biocontrol bacterium *Burkholderia cepacia* AMMDR1 on two oomycete pathogens of pea (*Pisum sativum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(12), 5192-5200.
- Heyman, F., Lindahl, B., Persson, L., Wikström, M., & Stenlid, J. (2007). Calcium concentrations of soil affect suppressiveness against *Aphanomyces* root rot of pea. *Soil Biology and Biochemistry*, *39*(9), 2222-2229.
- Hodge, A., Campbell, C. D., & Fitter, A. H. (2001). An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature*, *413*(6853), 297-299.
- Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A., Terauchi, R., & Kamoun, S. (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular plant-microbe interactions*, *22*(2), 115-122.
- Holub, E. B., Grau, C. R., & Parke, J. L. (1991). Evaluation of the forma specialis concept in *Aphanomyces euteiches*. *Mycological Research*, *95*(2), 147-157.
- Hooker, J. E., Jaizme-Vega, M., & Atkinson, D. (1994). Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. In *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems* (pp. 191-200). Birkhäuser, Basel.
- Hossain, S., Bergkvist, G., Berglund, K., Glinwood, R., Kabouw, P., Mårtensson, A., & Persson, P. (2014). Concentration- and time-dependent effects of isothiocyanates produced from Brassicaceae shoot tissues on the pea root rot pathogen *Aphanomyces euteiches*. *Journal of agricultural and food chemistry*, *62*(20), 4584-4591.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, *87*(1), 4-10.
- Iqbal, M. N., & Ashraf, A. (2017). Antagonism in Rhizobacteria: Application for Biocontrol of Soil-borne Plant Pathogens. *PSM Microbiology*, *2*(3), 78-79.
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. *Frontiers in plant science*, *8*, 1617.
- Jansa, J., Mozafar, A., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I., & Frossard, E. (2002). Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza*, *12*(5), 225-234.
- Jansa, J., Wiemken, A., & Frossard, E. (2006). The effects of agricultural practices on arbuscular mycorrhizal fungi. *Geological Society, London, Special Publications*, *266*(1), 89-115.
- Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., & Steinberg, C. (2007). Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to indicators? *Soil biology and Biochemistry*, *39*(1), 1-23.
- Jensen, E. S., Peoples, M. B., Boddey, R. M., Gresshoff, P. M., Hauggaard-Nielsen, H., Alves, B. J., & Morrison, M. J. (2012). Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for sustainable development*, *32*(2), 329-364.

- Jensen, E. S. (1987). Inoculation of pea by application of Rhizobium in the planting furrow. *Plant and Soil*, 97(1), 63-70.
- Jiang, R. H., & Tyler, B. M. (2012). Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. *Annual review of phytopathology*, 50, 295-318.
- Johnston, A. W., & Beringer, J. E. (1976). Pea root nodules containing more than one Rhizobium species. *Nature*, 263(5577), 502-504.
- Johnston, A. W. B., & Beringer, J. E. (1976). Mixed inoculations with effective and ineffective strains of Rhizobium leguminosarum. *Journal of applied Bacteriology*, 40(3), 375-380.
- Jones, D. L., Hodge, A., & Kuzyakov, Y. (2004). Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New phytologist*, 163(3), 459-480.
- Jourdan, E., Ongena, M., & Thonart, P. (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *BASE*.
- Judelson, H. S. (2017). Metabolic diversity and novelties in the oomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 71, 21-39.
- Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T. A., Bhat, A. H., & Bhat, M. A. (2013). Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences*, 1(2), 39-57.
- Kaiser, B. N., Layzell, D. B., & Shelp, B. J. (1997). Role of oxygen limitation and nitrate metabolism in the nitrate inhibition of nitrogen fixation by pea. *Physiologia Plantarum*, 101(1), 45-50.
- Kamoun, S. (2003). Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic cell*, 2(2), 191-199.
- Kannan, V., & Sureendar, R. (2009). Synergistic effect of beneficial rhizosphere microflora in biocontrol and plant growth promotion. *Journal of Basic Microbiology*, 49(2), 158-164.
- Karimi, E., Sadeghi, A., Abbaszadeh Dahaji, P., Dalvand, Y., Omidvari, M., & Kakuei Nezhad, M. (2012). Biocontrol activity of salt tolerant Streptomyces isolates against phytopathogens causing root rot of sugar beet. *Biocontrol Science and Technology*, 22(3), 333-349.
- Karthika, S., Midhun, S. J., & Jisha, M. S. (2020). A potential antifungal and growth-promoting bacterium Bacillus sp. KTMA4 from tomato rhizosphere. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104049.
- Keswani, C., Bisen, K., Singh, V., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2016). Formulation technology of biocontrol agents: present status and future prospects. In *Bioformulations: For sustainable agriculture* (pp. 35-52). Springer, New Delhi.
- Khaosaad, T., García-Garrido, J. M., Steinkellner, S., & Vierheilig, H. (2007). Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(3), 727-734.
- King, E. B., & Parke, J. L. (1993). Biocontrol of Aphanomyces root rot and Pythium damping-off by Pseudomonas cepacia AMMD on four pea cultivars. *Plant Disease*, 77(12), 1185-1188.
- Klonowska, A., Melkonian, R., Miché, L., Tisseyre, P., & Moulin, L. (2018). Transcriptomic profiling of Burkholderia phymatum STM815, Cupriavidus taiwanensis LMG19424 and Rhizobium mesoamericanum STM3625 in response to Mimosa pudica root exudates illuminates the molecular basis of their nodulation competitiveness and symbiotic evolutionary history. *BMC genomics*, 19(1), 1-22.
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10, 845.
- Kotova, V. V., & Tsvetkova, N. A. (1980). Effectiveness of chemical control measures against Aphanomyces root rot of peas. *Review of Plant Pathology*, 59(7).

- Kraft, J. M., & Boge, W. (2001). Root characteristics in pea in relation to compaction and *Fusarium* root rot. *Plant disease*, 85(9), 936-940.
- Kraft, J. M., Marcinkowska, J., & Muehlbauer, F. J. (1990). Detection of *Aphanomyces euteiches* in field soil from northern Idaho by a wet sieving/baiting technique. *Plant disease*, 74(9), 716-718.
- Kreplak, J., Madoui, M. A., Cápál, P., Novák, P., Labadie, K., Aubert, G., ... & Klein, A. (2019). A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution. *Nature genetics*, 51(9), 1411-1422.
- Krupinsky, J. M., Bailey, K. L., McMullen, M. P., Gossen, B. D., & Turkington, T. K. (2002). Managing plant disease risk in diversified cropping systems. *Agronomy journal*, 94(2), 198-209.
- Kuwabara, C., & Imai, R. (2009). Molecular basis of disease resistance acquired through cold acclimation in overwintering plants. *Journal of Plant Biology*, 52(1), 19-26.
- Labuschagne, N., Pretorius, T., & Idris, A. H. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria as biocontrol agents against soil-borne plant diseases. In *Plant growth and health promoting bacteria* (pp. 211-230). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Laguerre, G., Depret, G., Bourion, V., & Duc, G. (2007). *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* genotypes interact with pea plants in developmental responses of nodules, roots and shoots. *New Phytologist*, 176(3), 680-690.
- Laguerre, G., Louvrier, P., Allard, M. R., & Amarger, N. (2003). Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2276-2283.
- Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*. 147(Pt 4):981-993.
- Lareen A, Burton F, Schäfer P. (2016). Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol Biol*. 90(6):575-587.
- Larsen, J., Mansfeld-Giese, K., & Bødker, L. (2000). Quantification of *Aphanomyces euteiches* in pea roots using specific fatty acids. *Mycological Research*, 104(7), 858-864.
- Latijnhouwers, M., de Wit, P. J., & Govers, F. (2003). Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in microbiology*, 11(10), 462-469.
- Lavaud, C., Baviere, M., Le Roy, G., Hervé, M. R., Moussart, A., Delourme, R., & Pilet-Nayel, M. L. (2016). Single and multiple resistance QTL delay symptom appearance and slow down root colonization by *Aphanomyces euteiches* in pea near isogenic lines. *BMC plant biology*, 16(1), 166.
- Lavaud, C., Lesne, A., Piriou, C., Le Roy, G., Boutet, G., Moussart, A., ... & Pilet-Nayel, M. L. (2015). Validation of QTL for resistance to *Aphanomyces euteiches* in different pea genetic backgrounds using near-isogenic lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(11), 2273-2288.
- Lee, E. H., Eo, J. K., Ka, K. H., & Eom, A. H. (2013). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their roles in ecosystems. *Mycobiology*, 41(3), 121-125.
- Leite, J., Fischer, D., Rouws, L. F., Fernandes-Júnior, P. I., Hofmann, A., Kublik, S., ... & Radl, V. (2017). Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2064.
- Lejeune-Hénaut, I., Bourion, V., Etévé, G., Cunot, E., Delhayé, K., & Desmyter, C. (1999). Floral initiation in field-grown forage peas is delayed to a greater extent by short photoperiods, than in other types of European varieties. *Euphytica*, 109(3), 201-211.

- Le May, C., Guibert, M., Leclerc, A., Andrivon, D., & Tivoli, B. (2012). A single, plastic population of *Mycosphaerella pinodes* causes ascochyta blight on winter and spring peas (*Pisum sativum*) in France. *Applied and environmental microbiology*, 78(23), 8431-8440.
- Li, D., Kinkema, M., & Gresshoff, P. M. (2009). Autoregulation of nodulation (AON) in *Pisum sativum* (pea) involves signalling events associated with both nodule primordia development and nitrogen fixation. *Journal of plant physiology*, 166(9), 955-967.
- Li L, Sinkko H, Montonen L, Wei G, Lindström K, Räsänen LA. (2012). Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal *Glycyrrhiza* species in China. *FEMS Microbiol Ecol*. 79(1):46-68.
- Lim, J. H., & Kim, S. D. (2009). Synergistic plant growth promotion by the indigenous auxins producing PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52(5), 531-538.
- Lin, A. J., Zhang, X. H., Wong, M. H., Ye, Z. H., Lou, L. Q., Wang, Y. S., & Zhu, Y. G. (2007). Increase of multi-metal tolerance of three leguminous plants by arbuscular mycorrhizal fungi colonization. *Environmental Geochemistry and Health*, 29(6), 473-481.
- Lockwood, J. (1960). Pea introductions with partial resistance to *Aphanomyces* root rot. *Phytopathology*, 50(8 (1)).
- Lu, J., Yang, F., Wang, S., Ma, H., Liang, J., & Chen, Y. (2017). Co-existence of rhizobia and diverse non-rhizobial bacteria in the rhizosphere and Nodules of *Dalbergia odorifera* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, rhizobium multihospitium-like and burkholderia pyrrocinia-like strains. *Frontiers in microbiology*, 8, 2255.
- Madoui M.A., Bertrand-Michel J., Gaulin E., Dumas B. (2009). Sterol metabolism in the oomycete *Aphanomyces euteiches*, a legume root pathogen. *New Phytol*. 183(2):291-300.
- Malvick, D. K., Grau, C. R., & Percich, J. A. (1998). Characterization of *Aphanomyces euteiches* strains based on pathogenicity tests and random amplified polymorphic DNA analyses. *Mycological Research*, 102(4), 465-475.
- Manning, M. A., & Menzies, S. A. (1980). Root rot of peas in New Zealand caused by *Aphanomyces euteiches*. *New Zealand journal of agricultural research*, 23(2), 263-265.
- Manoharan, L., Rosenstock, N.P., Williams, A. & Hedlund, K. (2017). Agricultural management practices influence AMF diversity and community composition with cascading effects on plant productivity. *Applied Soil Ecology*, vol. 115, pp. 53-59.
- Maróti, G., & Kondorosi, É. (2014). Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Frontiers in Microbiology*, 5, 326.
- Martínez-Hidalgo, P., & Hirsch, A. M. (2017). The nodule microbiome: N<sub>2</sub>-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes*, 1(2), 70-82.
- Martínez-Molina, E., Juanes, F. S., Carro, L., Flores-Félix, J. D., Martínez-Hidalgo, P., Castillo, E. C., ... & Velázquez, E. (2016). Identification of rhizobial strains nodulating *Pisum sativum* in northern Spain soils by MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) analysis. In *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction* (pp. 37-44). Springer, Cham.
- Martinez-Romero, E. (2003). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil*, 252(1), 11-23.
- Massart, S., Martinez-Medina, M., & Jijakli, M. H. (2015). Biological control in the microbiome era: challenges and opportunities. *Biological control*, 89, 98-108.



- Mathre, D. E., Cook, R. J., & Callan, N. W. (1999). From discovery to use: traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. *Plant Disease*, 83(11), 972-983.
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annual review of plant biology*, 68, 485-512.
- Maufras, J.-Y. (1997). Maladies du pois protéagineux. Collection UNIP ITCF.
- Maxted, N., & Bennett, S. J. (Eds.). (2001). *Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean* (Vol. 39). Springer Science & Business Media.
- Mazzola, M., & Freilich, S. (2017). Prospects for Biological Soilborne Disease Control: Application of Indigenous Versus Synthetic Microbiomes. *Phytopathology* 107, 256–263.
- McArdle, A. J., Turkova, A., & Cunnington, A. J. (2018). When do co-infections matter? *Current opinion in infectious diseases*, 31(3), 209.
- McGee, R. J., Eigenbrode, S., Nelson, H., & Schillinger, W. (2017). Re-inventing Austrian winter pea Towards developing food quality winter peas. *Crops & Soils*, 50(4), 4-46.
- Meade, J., Higgins, P., & O'Gara, F. (1985). Studies on the inoculation and competitiveness of a *Rhizobium leguminosarum* strain in soils containing indigenous rhizobia. *Applied and environmental microbiology*, 49(4), 899-903.
- Meier, S., Borie, F., Bolan, N., & Cornejo, P. (2012). Phytoremediation of metal-polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(7), 741-775.
- Mendes, L. W., Raaijmakers, J. M., de Hollander, M., Mendes, R., & Tsai, S. M. (2018). Influence of resistance breeding in common bean on rhizosphere microbiome composition and function. *The ISME journal*, 12(1), 212-224.
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H., ... & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100.
- Mishra, R. K., Chaudhary, S., Kumar, A., & Kumar, S. (2009). Effects of multifoliolate-pinna, afila, tendril-less and unifoliata genes on leafblade architecture in *Pisum sativum*. *Planta*, 230(1), 177-190.
- Mishra, R. P., Singh, R. K., Jaiswal, H. K., Kumar, V., & Maurya, S. (2006). Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). *Current microbiology*, 52(5), 383-389.
- Mitchell, J. E., & Yang, C. Y. (1966). Factors affecting growth and development of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, 56(8), 917.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., & Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411(6840), 948-950.
- Moussart, A., Even, M. N., Lesne, A., & Tivoli, B. (2013). Successive legumes tested in a greenhouse crop rotation experiment modify the inoculum potential of soils naturally infested by *Aphanomyces euteiches*. *Plant pathology*, 62(3), 545-551.
- Moussart, A., Even, M. N., & Tivoli, B. (2008). Reaction of genotypes from several species of grain and forage legumes to infection with a French pea isolate of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *European journal of plant pathology*, 122, 321-333.
- Muehlchen, A. M., Rand, R. E., & Parke, J. L. (1990). Evaluation of crucifer green manures for controlling *Aphanomyces* root rot of peas. *Plant disease*, 74(9), 651-654.

- Mueller, U. G., & Sachs, J. L. (2015). Engineering microbiomes to improve plant and animal health. *Trends in microbiology*, 23(10), 606-617.
- Munier-Jolain, N., Biarnès, V., Chaillet, I., Lecoeur, J., & Jeuffroy, M. H. (2005). *Agrophysiologie du pois protéagineux*. Editions Quae.
- Munkvold, G. P., Carlton, W. M., Brummer, E. C., Meyer, J. R., Undersander, D. J., & Grau, C. R. (2001). Virulence of *Aphanomyces euteiches* isolates from Iowa and Wisconsin and benefits of resistance to *A. euteiches* in alfalfa cultivars. *Plant disease*, 85(3), 328-333.
- Murphy, L. A., & Scarth, R. (1994). Vernalization response in spring oilseed rape (*Brassica napus* L.) cultivars. *Canadian journal of plant science*, 74(2), 275-277.
- Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Costas, A. G., Geddes, B. A., Kouri, E. D., ... & Udvardi, M. K. (2016). Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Applied and environmental microbiology*, 82(13), 3698-3710.
- Muthukumar, A., Eswaran, A., Nakkeeran, S., & Sangeetha, G. (2010). Efficacy of plant extracts and biocontrol agents against *Pythium aphanidermatum* inciting chilli damping-off. *Crop Protection*, 29(12), 1483-1488.
- Nadeem, S. M., Naveed, M., Zahir, Z. A., & Asghar, H. N. (2013). Plant–microbe interactions for sustainable agriculture: fundamentals and recent advances. In *Plant microbe symbiosis: fundamentals and advances* (pp. 51-103). Springer, New Delhi.
- Nap, J. P., & Bisseling, T. (1990). Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science*, 250(4983), 948-954.
- Narula, S., Anand, R. C., Dudeja, S. S., & Pathak, D. V. (2013). Molecular diversity of root and nodule endophytic bacteria from field pea (*Pisum sativum* L.). *Legume Research-An International Journal*, 36(4), 344-350.
- Neumann, G., & Römheld, V. (2000). The release of root exudates as affected by the plant's physiological status. *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances in the soil-plant interface*. Eds. R Pinton, Z Varanini and P Nannipieri, 41-93.
- O'Brien, P. A., & Milroy, S. P. (2017). Towards biological control of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*, the causal agent of powdery scab in potato. *Australasian Plant Pathology*, 46(1), 1-10.
- Oehl F, Sieverding E, Mäder P, et al. (2004). Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia*. 138(4):574-583.
- 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(1718), 2698-2703.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125.
- Oyarzun, P., Gerlagh, M., & Hoogland, A. E. (1993). Relation between cropping frequency of peas and other legumes and foot and root rot in peas. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99(1), 35-44.
- Oyarzun, P., Gerlagh, M., Hoogland, A. E., & Vos, I. (1990). Seed treatment of peas with fosetyl-Al against *Aphanomyces euteiches*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 96(5), 301-311.
- Oyarzun, P. J., Dijst, G., Zoon, F. C., & Maas, P. T. (1997). Comparison of soil receptivity to *Thielaviopsis basicola*, *Aphanomyces euteiches*, and *Fusarium solani* f. sp. *pisii* causing root rot in pea. *Phytopathology*, 87(5), 534-541.
- Özkoç, İ., & Deliveli, M. H. (2001). In vitro inhibition of the mycelial growth of some root rot fungi by *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* isolates. *Turkish Journal of Biology*, 25(4), 435-445.

- Paffetti, D., Scotti, C., Gnocchi, S., Fancelli, S., & Bazzicalupo, M. (1996). Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. *Applied and environmental microbiology*, 62(7), 2279-2285.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens.
- Palmer, K. M., & Young, J. P. W. (2000). Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2445-2450.
- Palmieri, D., Vitullo, D., De Curtis, F., & Lima, G. (2017). A microbial consortium in the rhizosphere as a new biocontrol approach against fusarium decline of chickpea. *Plant and soil*, 412(1-2), 425-439.
- Pandya, M., Naresh Kumar, G., & Rajkumar, S. (2013). Invasion of rhizobial infection thread by non-rhizobia for colonization of *Vigna radiata* root nodules. *FEMS microbiology letters*, 348(1), 58-65.
- Papavizas, G. C. (1985). Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual review of phytopathology*, 23(1), 23-54.
- Papavizas, G. C., & Ayers, W. A. (1974). *Aphanomyces species and their root diseases in pea and sugarbeet: a review* (Vol. 1480). Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.
- Papavizas, G. C. (1966). Suppression of *Aphanomyces* root rot of peas by cruciferous soil amendments. *Phytopathology*, 56(9), 1071-1075.
- Parke, J. L., Rand, R. E., Joy, A. E., & King, E. B. (1991). Biological control of *Aphanomyces* root rot and *Pythium* damping-off of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *Pseudomonas fluorescens* applied to seed. *Plant Dis*, 75, 987-992.
- Parniske M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol*. 6(10):763-775.
- Peng, S., Biswas, J. C., Ladha, J. K., Gyaneshwar, P., & Chen, Y. (2002). Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. *Agronomy Journal*, 94(4), 925-929.
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180-201.
- Persson, L., & Olsson, S. (2000). Abiotic characteristics of soils suppressive to *Aphanomyces* root rot. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8-9), 1141-1150.
- Persson, L., Larsson-Wikström, M., & Gerhardson, B. (1999). Assessment of soil suppressiveness to *Aphanomyces* root rot of pea. *Plant disease*, 83(12), 1108-1112.
- Pfender, W. F., Malvick, D. K., Pflieger, F. L., & Grau, C. R. (1984). *Aphanomyces* root rot. *Compendium of pea diseases and pests*, 9-13.
- Pfender, W. F., & Hagedorn, D. J. (1983). Disease progress and yield loss in *Aphanomyces* root rot of peas. *Phytopathology*, 73(8), 1109-1113.
- Pfender, W. F., & Hagedorn, D. J. (1982). *Aphanomyces euteiches* f. sp. *phaseoli*, a causal agent of bean root and hypocotyl rot. *Phytopathology*, 72(3), 306-310.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789-799.
- Picard, K., Tirilly, Y., & Benhamou, N. (2000). Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4305-4314.

- Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SC, Bakker PA. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol.* 52:347-375. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102340
- Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S., & Crecchio, C. (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and Fertility of Soils*, 51(4), 403-415.
- Pilet-Nayel, M., Muehlbauer, F., McGee, R., Kraft, J., Baranger, A., & Coyne, C. (2002). Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(1), 28-39.
- Pilet-Nayel, M. L., Muehlbauer, F. J., McGee, R. J., Kraft, J. M., Baranger, A., & Coyne, C. J. (2005). Consistent quantitative trait loci in pea for partial resistance to *Aphanomyces euteiches* isolates from the United States and France. *Phytopathology*, 95(11), 1287-1293.
- Piotrowska-Długosz A, Wilczewski E. (2014). Assessment of soil nitrogen and related enzymes as influenced by the incorporation time of field pea cultivated as a catch crop in Alfisol. *Environ Monit Assess.* 186(12):8425-8441.
- Pitrat, M., & Faury, C. (2003). *Histoires de légumes: Des origines à l'orée du XXIe siècle*. Editions Quae.
- Pliego, C., Ramos, C., de Vicente, A., & Cazorla, F. M. (2011). Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant and soil*, 340(1-2), 505-520.
- Powers, S. E., & Thavarajah, D. (2019). Checking Agriculture's Pulse: Field Pea (*Pisum Sativum* L.), Sustainability, and Phosphorus Use Efficiency. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1489.
- Pozo MJ, Cordier C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S, Barea JM, Azcón-Aguilar C. (2002). Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J Exp Bot.* 53(368):525-534.
- Prashar, P., & Vandenberg, A. (2017). Genotype-specific responses to the effects of commercial *Trichoderma* formulations in lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*) in the presence and absence of the oomycete pathogen *Aphanomyces euteiches*. *Biocontrol Science and Technology*, 27(10), 1123-1144.
- Preissel, S., Reckling, M., Schläfke, N., & Zander, P. (2015). Magnitude and farm-economic value of grain legume pre-crop benefits in Europe: a review. *Field Crops Research*, 175, 64-79.
- Qualhato, T. F., Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Brandao, R. S., Jesuino, R. S. A., & Ulhoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology letters*, 35(9), 1461-1468.
- Raaijmakers JM, Mazzola M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 50:403-424.
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moëgne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and soil*, 321(1-2), 341-361.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in biotechnology*, 28(3), 142-149.
- Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., ... & Velázquez, E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (= NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(11), 2484-2490.

- Ramirez-Garcés, D., Camborde, L., Pel, M. J., Jauneau, A., Martinez, Y., Néant, I., ... & Gaulin, E. (2016). CRN 13 candidate effectors from plant and animal eukaryotic pathogens are DNA-binding proteins which trigger host DNA damage response. *New Phytologist*, *210*(2), 602-617.
- Reckling, M., Preissel, S., Zander, P., Topp, C. F. E., Watson, C. A., Murphy-Bokern, D., & Stoddard, F. L. (2014). Effects of legume cropping on farming and food systems. Legume Futures Report 1.6.
- Řezáčová, V., Gryndler, M., Bukovská, P., Šmilauer, P., & Jansa, J. (2016). Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi—contributions of PCR primer and host plant selectivity to the detected community profiles. *Pedobiologia*, *59*(4), 179-187.
- Richard B., Jumel S., Rouault F., Tivoli B. (2012). Influence of plant stage and organ age on the receptivity of *Pisum sativum* to *Mycosphaerella pinodes*. *European Journal of Plant Pathology* *132*, 367-379
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and soil*, *321*(1-2), 305-339.
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., Kent, A. D., ... & Triplett, E. W. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME journal*, *1*(4), 283-290.
- Román-Avilés, B., Snapp, S. S., & Kelly, J. D. (2004). Assessing root traits associated with root rot resistance in common bean. *Field crops research*, *86*(2-3), 147-156.
- Rosendahl, S. (1985). Interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. *Journal of Phytopathology*, *114*(1), 31-40.
- Rossmann, M., Sarango-Flores, S. W., Chiaramonte, J. B., Kmit, M. C. P., & Mendes, R. (2017). Plant microbiome: composition and functions in plant compartments. In *The Brazilian Microbiome* (pp. 7-20). Springer, Cham.
- Rumberger, A., & Marschner, P. (2003). 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. *Soil Biology and Biochemistry*, *35*(3), 445-452.
- Russell, P. E., & Jones, D. G. (1975). Variation in the selection of *Rhizobium trifolii* by varieties of red and white clover. *Soil biology and biochemistry*, *7*(1), 15-18.
- Ryan, P. R., Dessaux, Y., Thomashow, L. S., & Weller, D. M. (2009). Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant and Soil*, *321*(1-2), 363-383.
- Salman, A., Tsrur, L., Pomerantz, A., Moreh, R., Mordechai, S., & Huleihel, M. (2010). FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes. *Spectroscopy*, *24*(3-4), 261-267.
- Sánchez-Cañizares, C., Jorrín, B., Poole, P. S., & Tkacz, A. (2017). Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, *38*, 188-196.
- Sanders, I. R. (2003). Preference, specificity and cheating in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Trends in Plant Science*, *8*(4), 143-145.
- Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology letters*, *33*(8), 1523-1538.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, *183*, 92-99.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, *22*(8), 855-872.

- Sarma, B. K., Yadav, S. K., Singh, S., & Singh, H. B. (2015). Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*, 87, 25-33.
- Sasse J, Martinoia E, Northen T. (2018). Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends Plant Sci.* 23(1):25-41.
- Sauvage, H., Moussart, A., Bois, F., Tivoli, B., Barray, S., & Laval, K. (2007). Development of a molecular method to detect and quantify *Aphanomyces euteiches* in soil. *FEMS microbiology letters*, 273(1), 64-69.
- Sawada, H., Kuykendall, L. D., & Young, J. M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of general and applied microbiology*, 49(3), 155-179.
- Schenk, H. J., & Jackson, R. B. (2002). Rooting depths, lateral root spreads and below-ground/above-ground allometries of plants in water-limited ecosystems. *Journal of Ecology*, 480-494.
- Scheublin, T. R., & Van Der Heijden, M. G. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi colonize nonfixing root nodules of several legume species. *New Phytologist*, 172(4), 732-738.
- Scheublin, T. R., Ridgway, K. P., Young, J. P. W., & Van Der Heijden, M. G. (2004). Nonlegumes, legumes, and root nodules harbor different arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6240-6246.
- Schippers, B., Bakker, A. W., Bakker, P. A. H. M., & Van Peer, R. (1990). Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. *Plant and Soil*, 129(1), 75-83.
- Schloss PD, Handelsman J. (2006). Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput Biol.* 2(7):e92.
- Schneider, A., & Huyghe, C. (2015). *Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables* (p. 512). Editions Quae.
- Schutter M, Dick R. (2001). Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. *Soil Biology & Biochemistry.* 33(11):1481-1491.
- Schwartz, A. R., Ortiz, I., Maymon, M., Herbold, C. W., Fujishige, N. A., Vijanderan, J. A., ... & DeMason, D. A. (2013). *Bacillus simplex*—a little known PGPB with anti-fungal activity—alters pea legume root architecture and nodule morphology when coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agronomy*, 3(4), 595-620.
- Scott, W. W. (1961). A monograph of the genus *Aphanomyces*. *Technical Bulletin. Virginia Agricultural Experiment Station*, 151.
- Segovia, L., Piñero, D., Palacios, R., & Martínez-Romero, E. (1991). Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 426-433.
- Sekizaki, H., Yokosawa, R., Chinen, C., Adachi, H., & Yamane, Y. (1993). Studies on zoospore attracting activity. II. Synthesis of isoflavones and their attracting activity to *Aphanomyces euteiches* zoospore. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 16(7), 698-701.
- Selim, S., Sanssené, J., Rossard, S., & Courtois, J. (2017). Systemic induction of the defensin and phytoalexin pisatin pathways in pea (*Pisum sativum*) against *Aphanomyces euteiches* by acetylated and nonacetylated oligogalacturonides. *Molecules*, 22(6), 1017.
- Sendek, A., Karakoç, C., Wagg, C., Domínguez-Begines, J., do Couto, G. M., van der Heijden, M. G., ... & Gómez-Aparicio, L. (2019). Drought modulates interactions between arbuscular mycorrhizal fungal diversity and barley genotype diversity. *Scientific reports*, 9(1), 1-15.

- Seymour, M., Kirkegaard, J. A., Peoples, M. B., White, P. F., & French, R. J. (2012). Break-crop benefits to wheat in Western Australia—insights from over three decades of research. *Crop and Pasture Science*, 63(1), 1-16.
- Shang, H., Grau, C. R., & Peters, R. D. (2000). Oospore germination of *Aphanomyces euteiches* in root exudates and on the rhizoplanes of crop plants. *Plant disease*, 84(9), 994-998.
- Sharma, S., Aneja, M. K., Mayer, J., Munch, J. C., & Schloter, M. (2005). Characterization of bacterial community structure in rhizosphere soil of grain legumes. *Microbial Ecology*, 49(3), 407-415.
- Sharma, S., Aneja, M. K., Mayer, J., Schloter, M., & Munch, J. C. (2004). RNA fingerprinting of microbial community in the rhizosphere soil of grain legumes. *FEMS microbiology letters*, 240(2), 181-186.
- Shrestha, A., Park, S. H., Shrestha, B., Kim, K., Chae, J. C., & Lee, K. J. (2014). Biological control of Oomycetous plant pathogens: a review. *Nepal Journal of Science and Technology*, 15(1), 157-166.
- Siddiqui, I., Ehteshamul-Haque, S., Ghaffar, A. (1998). Effect of rhizobia and fungal antagonists in the control of root infecting fungi on sunflower and chickpea. *Pakistan Journal of Botany* 30, 279–286.
- Siddiqui, Z. A., Baghel, G., & Akhtar, M. S. (2007). Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Rhizobium* and plant growth-promoting rhizobacteria on lentil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(3), 435-441.
- Siddiqui, Z. A., & Mahmood, I. (1995). Role of plant symbionts in nematode management: a review. *Bioresource Technology*, 54(3), 217-226.
- Singh, B. K., Nunan, N., & Millard, P. (2009). Response of fungal, bacterial and ureolytic communities to synthetic sheep urine deposition in a grassland soil. *FEMS microbiology ecology*, 70(1), 109-117.
- Singh, R., Adholeya, A., & Mukerji, K. G. (2000). Mycorrhiza in control of soil borne pathogens. In *Mycorrhizal biology* (pp. 173-196). Springer, Boston, MA.
- Singh, R. J., & Jauhar, P. P. (2005). Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. Vol 1: grain legumes. *Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. Vol 1: grain legumes*.
- Slezack, S., Dumas-Gaudot, E., Paynot, M., & Gianinazzi, S. (2000). Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* roots against *Aphanomyces euteiches*? *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2), 238-241.
- Smil, V. (1999). Nitrogen in crop production: An account of global flows. *Global biogeochemical cycles*, 13(2), 647-662.
- Smith, F. A., Jakobsen, I., & Smith, S. E. (2000). Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *The New Phytologist*, 147(2), 357-366.
- Smith, K. P., & Goodman, R. M. (1999). Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annual review of phytopathology*, 37(1), 473-491.
- Smith, S. E., Read, D., Smith, S. E., & Read, D. (2008). The symbionts forming arbuscular mycorrhizas. In 'Mycorrhizal symbiosis'.
- Smolinska, U., Knudsen, G. R., Morra, M. J., & Borek, V. (1997). Inhibition of *Aphanomyces euteiches* f. sp. pisi by volatiles produced by hydrolysis of *Brassica napus* seed meal. *Plant disease*, 81(3), 288-292.
- Smykal, P., Aubert, G., Burstin, J., Coyne, C. J., Ellis, N. T., Flavell, A. J., ... & McPhee, K. E. (2012). Pea (*Pisum sativum* L.) in the genomic era. *Agronomy*, 2(2), 74-115.

- Smykal, P., Kenicer, G., Flavell, A. J., Corander, J., Kosterin, O., Redden, R. J., ... & Ellis, N. T. (2011). Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus.
- Snapp, S., Kirk, W., Román-Avilés, B., & Kelly, J. (2003). Root traits play a role in integrated management of *Fusarium* root rot in snap beans. *HortScience*, *38*(2), 187-191.
- Srivastava, S., Sinha, V., Vaishnavi, A., Kunwar, T., & Tigga, R. S. (2012). Regulation of Antibiotics Production in Biocontrol Strains of *Pseudomonas* spp. In *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology* (pp. 197-225). Springer, Dordrecht.
- 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*(1), 2.
- Steyaert, J. M., Ridgway, H. J., Elad, Y., & Stewart, A. (2003). Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, *31*(4), 281-291.
- Stockwell, V. O., Johnson, K. B., Sugar, D., & Loper, J. E. (2011). Mechanistically compatible mixtures of bacterial antagonists improve biological control of fire blight of pear. *Phytopathology*, *101*(1), 113-123.
- Streeter, J., & Wong, P. P. (1988). Inhibition of legume nodule formation and N<sub>2</sub> fixation by nitrate. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *7*(1), 1-23.
- Streeter, J. G. (1985). Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity: I. Long term studies with a continuous supply of nitrate. *Plant Physiology*, *77*(2), 321-324.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., & Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical reviews in plant sciences*, *19*(1), 1-30.
- Sukumar, P., Legue, V., Vayssières, A., Martin, F., Tuskan, G. A., & Kalluri, U. C. (2013). Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions. *Plant, cell & environment*, *36*(5), 909-919.
- Talukdar, N. C., & Germida, J. J. (1993). Occurrence and isolation of vesicular–arbuscular mycorrhizae in cropped field soils of Saskatchewan, Canada. *Canadian journal of microbiology*, *39*(6), 567-575.
- Tatsukami, Y., & Ueda, M. (2016). Rhizobial gibberellin negatively regulates host nodule number. *Scientific reports*, *6*, 27998.
- Temp, M. V., & Hagedorn, D. J. (1967). Influence of cropping practices on *Aphanomyces* root rot potential of Wisconsin pea fields. *Phytopathology*, *57*(7), 667.
- Thomashow, L. S., Bonsall, R. F., & Weller, D. M. (2008). Detection of antibiotics produced by soil and rhizosphere microbes in situ. In *Secondary metabolites in soil ecology* (pp. 23-36). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Thygesen, K., Larsen, J. & Bødker, L. (2004). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Reduce Development of Pea Root-rot caused by *Aphanomyces euteiches* using Oospores as Pathogen Inoculum. *European Journal of Plant Pathology* *110*, 411–419.
- Tokala, R. K., Strap, J. L., Jung, C. M., Crawford, D. L., Salove, M. H., Deobald, L. A., ... & Morra, M. J. (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and environmental microbiology*, *68*(5), 2161-2171.
- Tronsmo, A., & Hjeljord, L. G. (1998). Biological control with *Trichoderma* species. *Plant-microbe interaction and biological control*. Marcel Dekker Inc., New York, 111-126.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Biagiatti, S., & Aziz, A. (2008). Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*, *64*(1), 21-32.



- Tsukanova, K. A., Meyer, J. J. M., & Bibikova, T. N. (2017). Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *South African Journal of Botany*, *113*, 91-102.
- Turner, T. R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., ... & Poole, P. S. (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME journal*, *7*(12), 2248-2258.
- Tyler, B. M. (2001). Genetics and genomics of the oomycete–host interface. *TRENDS in Genetics*, *17*(11), 611-614.
- Unestam, T. (1966). Chitinolytic, cellulolytic, and pectinolytic activity in vitro of some parasitic and saprophytic oomycetes. *Physiologia Plantarum*, *19*(1), 15-30.
- Unkovich, M. J., Baldock, J., & Peoples, M. B. (2010). Prospects and problems of simple linear models for estimating symbiotic N<sub>2</sub> fixation by crop and pasture legumes. *Plant and Soil*, *329*(1-2), 75-89.
- Uren, N. C. (2007). Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, *2*, 1-21.
- Valverde, A., Velázquez, E., Cervantes, E., Igual, J. M., & van Berkum, P. (2011). Evidence of an American origin for symbiosis-related genes in *Rhizobium lusitanum*. *Applied and environmental microbiology*, *77*(16), 5665-5670.
- Van Der Heijden, M. G., Bardgett, R. D., & Van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, *11*(3), 296-310.
- Vandenkoornhuyse, P., Husband, R., Daniell, T. J., Watson, I. J., Duck, J. M., Fitter, A. H., & Young, J. P. W. (2002). Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology*, *11*(8), 1555-1564.
- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, *206*(4), 1196-1206.
- Vandenkoornhuyse, P., Ridgway, K. P., Watson, I. J., Fitter, A. H., & Young, J. P. W. (2003). Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology*, *12*(11), 3085-3095.
- Vanderlinde, E. M., Hynes, M. F., & Yost, C. K. (2014). Homoserine catabolism by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 requires a plasmid-borne gene cluster that also affects competitiveness for nodulation. *Environmental Microbiology*, *16*(1), 205-217.
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J. F., Jacques, M. A., Lebrun, M. H., ... & Candresse, T. (2014). Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *4*, 29.
- Venkatesh, M.S., Hazra, K.K., Ghosh, P.K., Praharaj, C.S., Kumar, N. (2013). Long-term effect of pulses and nutrient management on soil carbon sequestration in Indo-Gangetic plains of India. *Revue canadienne de la science du sol*, *93*(1): 127-136.
- Victorino, Í. M. M., Berruti, A., Orgiazzi, A., Voyron, S., Bianciotto, V., & Lumini, E. (2020). High-Throughput DNA Sequence-Based Analysis of AMF Communities. In *Arbuscular Mycorrhizal Fungi* (pp. 99-116). Humana, New York, NY.
- Vidal-Dominguez, M. T., Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (1994). Preferential sporulation of *Glomus fasciculatum* in the root nodules of herbaceous legumes. *Symbiosis*.
- Vierheilig, H., Garcia-Garrido, J. M., Wyss, U., & Piché, Y. (2000). Systemic suppression of mycorrhizal colonization of barley roots already colonized by AM fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, *32*(5), 589-595.

- Vierheilig, H., & Piche, Y. (2002). Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. In *Flavonoids in cell function* (pp. 23-39). Springer, Boston, MA.
- Vierheilig, H., Steinkellner, S., Khaosaad, T., & Garcia-Garrido, J. M. (2008). The biocontrol effect of mycorrhization on soilborne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: one mechanism, two effects?. In *Mycorrhiza* (pp. 307-320). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Voisin, A. S., Munier-Jolain, N. G., & Salon, C. (2010). The nodulation process is tightly adjusted to plant growth. An analysis using environmentally and genetically induced variation of nodule number and biomass in pea. *Plant and Soil*, 337(1-2), 399-412.
- Von Linne, C. (1800). *Species plantarum*.
- Wadhwa, K., Dudeja, S. S., & Yadav, R. K. (2011). Molecular diversity of native rhizobia trapped by five field pea genotypes in Indian soils. *Journal of basic microbiology*, 51(1), 89-97.
- Wakelin, S. A., Walter, M., Jaspers, M., & Stewart, A. (2002). Biological control of *Aphanomyces euteiches* root-rot of pea with spore-forming bacteria. *Australasian Plant Pathology*, 31(4), 401-407.
- Walters, D. (2011). *Plant defense: warding off attack by pathogens, herbivores and parasitic plants*. John Wiley & Sons.
- Weller, D. M. (2007). Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2), 250-256.
- Weller, D. M., & Thomashow, L. S. (1993). Use of rhizobacteria for biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*, 4(3), 306-311.
- Weller D. M., Raaijmakers JM, Gardener BB, Thomashow LS. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*. 40:309-348.
- Whipps, J. M. (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian journal of botany*, 82(8), 1198-1227.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 52(suppl\_1), 487-511.
- Wicker, E., Hullé, M., & Rouxel, F. (2001). Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology*, 50(4), 433-442.
- Wicker, E., Moussart, A., Duparque, M., & Rouxel, F. (2003). Further contributions to the development of a differential set of pea cultivars (*Pisum sativum*) to investigate the virulence of isolates of *Aphanomyces euteiches*. *European Journal of Plant Pathology*, 109(1), 47-60.
- Wielbo, J., Podleśna, A., Kidaj, D., Podleśny, J., & Skorupska, A. (2015). The diversity of pea microsymbionts in various types of soils and their effects on plant host productivity. *Microbes and environments*, ME14141.
- Wiesel, L., Newton, A. C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E. M., Birch, P. R., & Hein, I. (2014). Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in plant science*, 5, 655.
- Williams-Woodward, J.L., Pflieger, F., Fritz, V.A. *et al.* (1997). Green manures of oat, rape and sweet corn for reducing common root rot in pea (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Plant and Soil* 188, 43–48.
- Worku, Y., & Gerhardson, B. (1996). Suppressiveness to clubroot, pea root rot and Fusarium wilt in Swedish soils. *Journal of Phytopathology*, 144(3), 143-146.
- Wu, L., Chang, K. F., Conner, R. L., Strelkov, S., Fredua-Agyeman, R., Hwang, S. F., & Feindel, D. (2018). *Aphanomyces euteiches*: A threat to Canadian field pea production. *Engineering*, 4(4), 542-551.

- Wu, L., Chang, K. F., Hwang, S. F., Conner, R., Fredua-Agyeman, R., Feindel, D., & Strelkov, S. E. (2019). Evaluation of host resistance and fungicide application as tools for the management of root rot of field pea caused by *Aphanomyces euteiches*. *The Crop Journal*, 7(1), 38-48.
- Xavier, L. J., & Boyetchko, S. M. (2004). Arbuscular mycorrhizal fungi in plant disease control. *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*, 183-194.
- Xue, A. G. (2003). Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology*, 93(3), 329-335.
- Xue, A. G. (2002). *U.S. Patent No. 6,495,133*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Xue, Q. Y., Chen, Y., Li, S. M., Chen, L. F., Ding, G. C., Guo, D. W., & Guo, J. H. (2009). Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control*, 48(3), 252-258.
- Yang, C., Yang, J., Li, Y., & Zhou, J. (2008). Genetic diversity of root-nodulating bacteria isolated from pea (*Pisum sativum*) in subtropical regions of China. *Science in China Series C: Life Sciences*, 51(9), 854-862.
- Yanni Y. G., Rizk R.Y., El-Fattah F. K. A., Squartini A., Corich V., Giacomini A., de Bruijn F., Rademaker J., Maya-Flores J., *et al.* (2001). The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Functional Plant Biology* 28, 845-870.
- Yao, Z., Lei, Y., & He, D. (2019). Early visual detection of wheat stripe rust using visible/near-infrared hyperspectral imaging. *Sensors*, 19(4), 952.
- Yu, L., Nicolaisen, M., Larsen, J., & Ravnskov, S. (2012). Succession of root-associated fungi in *Pisum sativum* during a plant growth cycle as examined by 454 pyrosequencing. *Plant and soil*, 358(1-2), 225-233.
- Zander, P., Amjath-Babu, T. S., Preissel, S., Reckling, M., Bues, A., Schläfke, N., ... & Murphy-Bokern, D. (2016). Grain legume decline and potential recovery in European agriculture: a review. *Agronomy for sustainable development*, 36(2), 26.
- Zhalnina, K., Louie, K. B., Hao, Z., Mansoori, N., da Rocha, U. N., Shi, S., ... & Firestone, M. K. (2018). Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nature microbiology*, 3(4), 470-480.
- Zhang, C., Feng, X., Wang, J., Liu, F., He, Y., & Zhou, W. (2017). Mid-infrared spectroscopy combined with chemometrics to detect *Sclerotinia* stem rot on oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. *Plant Methods*, 13(1), 1-9.
- Zhao, H., Li, X., Zhang, Z., Zhao, Y., Yang, J., & Zhu, Y. (2017). Species diversity and drivers of arbuscular mycorrhizal fungal communities in a semi-arid mountain in China. *PeerJ*, 5, e4155.
- Zohary, D., Hopf, M., & Weiss, E. (2012). *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*. Oxford University Press on Demand.

---

## **Publications et communications**

---



### Articles publiés

Vidal, T., Saint-Jean, S., **Lusley, P.**, Leconte, M., Ben Krima, S., Boixel, A. L., ... & de Vallavieille-Pope, C. (2020). Cultivar mixture effects on disease and yield remain despite diversity in wheat height and earliness. *Plant Pathology*.

Vidal, T., **Lusley, P.**, Leconte, M., de Vallavieille-Pope, C., Huber, L., & Saint-Jean, S. (2017). Cultivar architecture modulates spore dispersal by rain splash: A new perspective to reduce disease progression in cultivar mixtures. *PloS one*, 12(11), e0187788.

### Communications avec acte dans un congrès international ou national

**Lusley P.**, Bressan M., Trinsoutrot-Gattin I., Gauthier A., Laval K. Soil and crop: a potential resource of biocontrol agents against pea root rot caused by *Aphanomyces euteiches*. Conférence internationale sur les maladies des plantes à Tours, 2018.

Tiphaine Vidal, **Pauline Lusley**, Christophe Gigot, Marc Leconte, F. Suffert, et al. Effects of wheat varietal resistance level and rainfall characteristics on splash dispersal of *Septoria tritici* blotch. Annual American Phytopathology Society Meeting, American Phytopathological Society, Aug 2015, Pasadena, California, United States.

S. Saint-Jean, T. Vidal, **P. Lusley**. Innovation pour mieux produire et faire face aux changements climatiques : les associations de variétés. SIA 2015.

### Communications orales sans acte dans un congrès international ou national

**Lusley P.**, Gauthier A., Lakehal L., Bressan M., Laval K., Trinsoutrot-Gattin I. Phenotype and MIR leaves spectra comparison between healthy and infected pea cultivars with *Aphanomyces euteiches*. Journée Scientifique de la Fédération de la Recherche NORVEGE, Rouen, 2019.



---

## Abstract

---

Pea, well-adapted to the Normandy pedoclimatic context, represents an important nutritional source of plant proteins. At present, protein crops are among the promoting crops in view of their many agronomical, economic, and environmental interests. Despite their multiple advantages, the cultivation of protein peas is not as successful, mainly due to strong attacks by various phytopathology. The most damaging is pea root rot caused by *Aphanomyces euteiches* leading to a significant drop in yield and thus can penalize farmers. As there is no effective treatment to date, numerous focus researches are in progress to develop efficient control methods, which requires a holistic understanding of the pathobiome.

In this thesis, studies were focused on the understanding of some direct and indirect resistance mechanisms of pea root rot caused by *A. euteiches*. The contribution of biotic factors in this disease were studied, specifically the influence of varietal genotype and its associated phytobiome, and so the establishment of multiple interactions with microorganisms.

The comparative analysis of disease severity and induced architectural modifications, showed a differential expression according to their affiliation to winter or spring group. The two winter pea cultivars characterized by a high cold tolerance presented two features of interest: a delayed impact on aerial part despite significant root damage and an increased growth of root system in response to infection. In addition, the study of intra-nodule bacterial diversity in these same cultivars showed that the diversity of their nodule microbiome varies according to varietal genotype. This study highlighted the strong biocontrol potential of intra-nodule bacterial endophytes, with a higher relative abundance of known antagonistic bacterial genera towards *A. euteiches* for two winter pea cultivars. The varietal genotype therefore constitutes a direct and indirect lever by the establishment of interactions with beneficial microorganisms, to fight against pea root rot. The last research line has demonstrated the strong influence of plant cultivated species on the microbial associations in the rhizosphere, specifically a modulation of the assemblage of beneficial populations. Shaping the microbial community composition through the cultivation of crops to the benefit of the next crop represents an additional argument in favor of crop rotation use as a lever against phytopathology.

Several interesting alternatives were highlighted in this research work to effectively and efficiently manage *A. euteiches*: at the cultivar scale, by specific characteristics in relation to varieties' genotype and their ability to select protective endophytes, and at the scale of crop rotation, by shaping microbiome in favor of pea. Great research perspectives are emerging, especially the efficiency of protection resulting from all potential isolated biocontrol agents, which would allow the development and implementation of beneficial consortia adapted to Normandy soils and to pea cultivars specificities.



---

## Résumé

---

Le pois protéagineux, dont la culture est bien adaptée au contexte pédoclimatique normand, représente une source nutritive importante en protéines végétales. A l'heure actuelle, les cultures protéagineuses font partie des cultures d'avenir aux vues de leurs nombreux intérêts agronomique, économique et environnemental. Malgré ses multiples atouts, la culture du pois protéagineux n'a pas autant de succès, principalement en raison d'une forte atteinte par diverses phytopathologies, dont le plus préjudiciable est la pourriture racinaire du pois causée par *Aphanomyces euteiches*. Les dégâts occasionnés peuvent conduire à une baisse importante du rendement et ainsi pénaliser les agriculteurs. Ne disposant d'aucun traitement efficace à ce jour, il est donc important de focaliser les recherches sur le développement de moyens de contrôle, ce qui passe par une compréhension holistique du pathobiome.

Dans cette thèse, les travaux se sont concentrés sur la compréhension de certains mécanismes de résistance directs ou indirects à la pourriture racinaire du pois causée par *A. euteiches*, en se focalisant sur l'étude de la contribution des facteurs biotiques, à savoir, le génotype variétal, seul ou accompagné de son phytobiome, et donc la mise en place de multiples interactions avec les microorganismes. L'analyse comparée de l'expression de la maladie et des modifications architecturales induites a montré une expression différentielle de la maladie selon leur appartenance au groupe hiver ou printemps. Les variétés d'hiver caractérisées par une grande tolérance au froid présentent 2 traits d'intérêt : un retard d'impact sur les parties aériennes malgré une atteinte racinaire et un accroissement du système racinaire en réponse à l'infection. De plus, l'étude de la diversité bactérienne intra-nodules chez ces mêmes variétés de pois d'hiver et de printemps, a montré que la diversité de ce microbiome endophyte varie en fonction du génotype variétal. Cette étude a permis de déceler le fort potentiel biocontrôle des endophytes bactériens intra-nodulaires, avec une abondance relative observée des genres bactériens connus pour leurs effets antagonistes envers *A. euteiches* plus importante chez deux variétés de pois d'hiver. Le génotype variétal constitue donc un levier, direct et indirect *via* l'établissement d'interactions avec des microorganismes bénéfiques, pour lutter contre la pourriture racinaire du pois. Le dernier axe de recherche a démontré la forte influence des espèces cultivés sur les associations microbiennes au sien de la rhizosphère, en particulier sur l'assemblage des populations bénéfiques. La manipulation de la composition des communautés microbiennes par les couverts végétaux au bénéfice de la culture suivante représente un argument de plus en faveur de l'utilisation des rotations des cultures comme levier contre les phytopathologies.

Plusieurs pistes intéressantes ressortent donc de ce travail, pour une lutte efficiente et globale contre *A. euteiches* : à l'échelle de la variété, par ses caractéristiques propres en lien avec son génotype et sa capacité à sélectionner des endophytes protecteurs, et à l'échelle de la rotation, par la manipulation du microbiome en faveur du pois. De belles perspectives de recherche se profilent, notamment la réalisation de tests d'efficacité de protection de tous les potentiels agents de biocontrôles isolés, qui permettraient la mise en œuvre de consortia bénéfiques adaptés au terroir normand et aux spécificités variétales du pois.