



**HAL**  
open science

# Pourritures racinaires du pois potager : Caractérisation et biocontrôle du complexe parasitaire d'origine tellurique incluant *Aphanomyces euteiches*

Simon Gibert

## ► To cite this version:

Simon Gibert. Pourritures racinaires du pois potager : Caractérisation et biocontrôle du complexe parasitaire d'origine tellurique incluant *Aphanomyces euteiches*. Sciences agricoles. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCK060 . tel-03662204

**HAL Id: tel-03662204**

**<https://theses.hal.science/tel-03662204>**

Submitted on 9 May 2022

**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.

# THÈSE DE DOCTORAT DE L'ÉTABLISSEMENT UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

Préparée à l'UMR 1347 Agroécologie

Ecole doctorale n°554  
Environnement Santé

Doctorat en biologie des populations et écologie microbienne

Par

**Simon GIBERT**

## Les pourritures racinaires du pois potager : caractérisation et biocontrôle du complexe parasitaire d'origine tellurique incluant *Aphanomyces euteiches*

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 25 novembre 2021

### Composition du jury :

---

<b>Claire PRIGENT-COMBARET</b>	Directrice de Recherche, CNRS Villeurbanne	Rapporteuse
<b>Christophe LE MAY</b>	Maitre de Conférence, INRAE Rennes	Rapporteur
<b>Mélanie BRESSAN</b>	Chargée de Recherche, UniLasalle, Mont-Saint-Aignan	Examinatrice
<b>Sylvain JEANDROZ</b>	Professeur, Agrosup Dijon	Président du Jury
<b>Laurent NIVET</b>	Ingénieur Régional, UNILET	Invité
<b>Arnaud BARDON-DEBATS</b>	Ingénieur, Directeur Groupe Performance Agro, Bonduelle	Invité
<b>Rachel GALLAND</b>	PhD, Chargée de Projet, Bonduelle	Co-directrice de thèse
<b>Véronique EDEL-HERMANN</b>	Ingénieure de Recherche, INRAE Dijon	Directrice de thèse
<b>Christian STEINBERG</b>	Directeur de Recherche, INRAE Dijon	Directeur de thèse

---



# REMERCIEMENTS

---

## **Aux membres du jury :**

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury, Claire Prigent-Combaret et Christophe Le May en tant que rapporteurs, Mélanie Bressan, Sylvain Jeandroz et Laurent Nivet en tant qu'examineurs, pour avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail.

## **A mes directeurs de thèse :**

Je remercie vivement mes directeurs de thèse Christian Steinberg et Véronique Edel-Hermann. Je les remercie tout d'abord pour la confiance qu'ils m'ont accordée en me confiant ce projet de thèse et en me permettant de le réaliser dans des conditions matérielles idéales. Je les remercie aussi pour leur disponibilité, leur suivi tout au long de la thèse et pour leurs nombreux conseils et commentaires qui m'ont aidé à réaliser ce projet et à le mener jusqu'à son terme. Merci encore pour votre bienveillance et pour avoir toujours été là pour répondre à mes interrogations. Mes remerciements s'adressent également à Rachel Galland qui, bien qu'à distance, m'a fait part de ses conseils et de ses encouragements.

## **A mes encadrants de Bonduelle :**

Je tiens à remercier tout particulièrement Jean-Marie Sol de m'avoir recruté au sein du Groupe Bonduelle et permis de réaliser ce projet dans de bonnes conditions. Merci également à Géry Capelle d'avoir suivi et encadré mon travail avec intérêt et pour m'avoir donné des conseils pertinents qui ont largement contribué à guider le projet.

Je tiens également à remercier Arnaud Bardon-Debats et Claudine Lambert pour avoir repris la direction de ce projet à la suite des départs successifs de Jean-Marie et de Géry. Merci d'avoir porté un intérêt à mon travail et pour m'avoir permis de prolonger mon financement de thèse de quelques mois post-confinement Covid19.

## **Aux membres de mon Comité de Suivi de Thèse :**

Je remercie les membres de mon Comité de Suivi de Thèse Marie-Laure Pilet-Nayel et Adrien Gautier qui ont évalué l'avancée de mon travail annuellement et m'ont fourni des conseils et des commentaires judicieux qui ont permis d'orienter le projet et les recherches.

## **A l'équipe :**

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe Foxy aux côtés desquels j'ai eu la chance de travailler et j'ai beaucoup appris. Je remercie tout particulièrement Nadine et Elodie pour leur motivation, leur bonne humeur quotidienne, pour leur implication dans mon projet et auprès des étudiants en général, et enfin pour leur aide et leurs conseils précieux pour la réalisation des manips.



Merci aussi à Eric et Joël pour leur aide toujours spontanée, les conversations sympathiques et leur bonne humeur qui rend le travail agréable !

Je remercie également tous les étudiants de l'équipe Foxy que j'ai eu la chance de côtoyer tout au long de ces années de thèse : merci aux autres doctorantes, Marion et Dinia, et à Lucie pour les coups de main, pour votre bonne humeur quotidienne et votre gentillesse.

Merci aussi aux stagiaires qui m'ont apporté une aide précieuse, particulièrement à Rayanti et Madison, mais aussi à Lisa et Zeinab qui ont travaillé durement et que j'ai eu plaisir à côtoyer et à encadrer.

#### **Aux collègues de l'Unité Agroécologie :**

Merci à Fabrice Dessaint et Nicolas Chemidlin Prévost-Bouré pour leurs précieux conseils en statistiques et à Samuel Mondy pour son aide en bioinformatique malgré leurs emplois du temps respectifs surchargés.

Merci aux membres du domaine d'Epoisses, notamment Pierre Mangin et Guillaume Poussou pour leur aide importante à l'organisation des essais au champ.

Je remercie également toutes les personnes qui m'ont accompagné dans mes manip, notamment David pour son aide en qPCR et toute l'équipe GENOSOL pour l'accueil dans leurs locaux et leur précieux conseils.

Merci également à tous les autres membres de l'Unité qui ont participé au bon déroulement de la thèse.

#### **Aux autres étudiants et amis :**

Je remercie de tout cœur toutes les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer dans le cadre de ma thèse et avec qui j'ai partagé de bons moments : Tristan, Clémence, Laurie, Marc, Thomas, Camille, Jérémy, Aline, Damien, Rémy, Karen, Thibaut et j'en oublie sûrement.

#### **A mes proches :**

Je tiens à remercier tout particulièrement ma chérie Audrey pour son soutien sans faille et sa bonne humeur à toute épreuve, tout cela aurait été beaucoup plus difficile sans toi. Je remercie également ma famille et mes amis pour m'avoir toujours soutenu.

## Résumé

---

Les pourritures racinaires du pois sont une préoccupation importante pour les régions productrices à travers le monde. La maladie est causée par un complexe parasitaire composé de nombreuses espèces de champignons et d'oomycètes d'origine tellurique. En France, l'agent pathogène principalement incriminé est l'oomycète *Aphanomyces euteiches*. L'identité des autres composantes du complexe parasitaire et leurs contributions respectives à la maladie n'y ont jamais été recherchées. Aucun moyen de lutte n'est actuellement disponible pour contrôler efficacement la maladie hormis un test biologique prédictif remis en cause par certains utilisateurs. Ce test permet cependant l'évitement des parcelles infestées, ce qui limite la multiplication dans les sols de l'agent pathogène majeur *A. euteiches*.

Dans ce contexte, les objectifs de mon travail de thèse étaient de i) développer un outil de prédiction fiable du risque de pourritures racinaires dues à *A. euteiches* à destination des producteurs de pois ii) caractériser le complexe parasitaire responsable de pourritures racinaires du pois potager en France et iii) identifier des agents de biocontrôle microbiens efficaces pour lutter contre ce complexe parasitaire.

Un outil de quantification moléculaire basé sur la PCR digitale (ddPCR) a été développé afin de quantifier avec précision de faibles densités d'inoculum d'*A. euteiches* dans les sols. L'outil a été validé sur deux cents échantillons de sol prélevés dans quatre parcelles infestées du nord de la France. Une relation significative entre la sévérité de la maladie déterminée par des bio-essais et la densité d'inoculum d'*A. euteiches* dans ces sols a été établie et un modèle est proposé pour prédire la sévérité de la maladie à partir de la densité d'inoculum. L'analyse spatiale de ces deux variables a confirmé la structuration agrégative en foyers de l'inoculum d'*A. euteiches* dans les parcelles infestées. Une analyse statistique basée sur des simulations effectuées à partir de ces données spatialisées a abouti à la définition d'une stratégie d'échantillonnage adaptée à la distribution hétérogène d'*A. euteiches* dans les sols agricoles. Cette stratégie selon deux W tête-bêche permet d'obtenir une mesure représentative de la densité d'inoculum dans des parcelles et ainsi d'améliorer la précision de la prédiction.

La composition du complexe parasitaire a été déterminée par identification moléculaire et test de la pathogénicité d'une collection de 317 isolats de champignons et d'oomycètes issus de racines symptomatiques de pois prélevés dans des champs infestés du nord de la France, en fin de culture et au cours d'une saison culturale. L'analyse a révélé la prévalence des champignons *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, et *F. redolens*, connus dans d'autres pays pour leur implication dans la maladie. Elle a également révélé des agents pathogènes inattendus comme *Clonostachys rhizophaga*, qui n'avait jamais été signalé comme agent pathogène du pois auparavant. En outre, cette analyse a montré que les communautés fongiques et oomycètes associées aux pourritures racinaires évoluent au cours d'une saison culturale. Une analyse moléculaire reposant sur une approche de metabarcoding a été mise en œuvre pour comparer la diversité de ces communautés entre plantes symptomatiques et plantes asymptomatiques.

Enfin, différents agents de biocontrôle ont été testés *in vitro*, en serres et au champ, mais aucun résultat probant n'a été obtenu, mettant en évidence la difficulté de développer des méthodes de biocontrôle d'un complexe parasitaire en grandes cultures.

Pour conclure, ce travail aura permis de fournir aux producteurs de pois une méthodologie fiable pour la prédiction du risque d'apparition de pourritures racinaires dues à *A. euteiches*. Il aura également permis de vérifier l'hypothèse selon laquelle un complexe parasitaire présentant une forte richesse spécifique est impliqué dans la maladie en France, ouvrant des perspectives de recherches quant à son contrôle.

**Mots-clés** : *Pisum sativum*, pourritures racinaires, *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium*, prédiction du risque, biocontrôle.



## Abstract

---

Root rots in peas are a major concern in most growing regions around the world. The disease is caused by a parasitic complex made up of many species of soil-borne fungi and oomycetes. In France, the main pathogen involved until recently was the oomycete *Aphanomyces euteiches*. The identity of the other components of the parasitic complex and their respective contributions to the disease have not been investigated. No control method is currently available to effectively control the disease, apart from a predictive biological test questioned by some users. However, this test allows the avoidance of infested plots, which furthermore limits the multiplication in soils of *A. euteiches*, i.e. the major pathogen.

In this context, the objectives of my thesis work were to i) develop a tool for reliable prediction of the risk of root rots due to *A. euteiches* for pea producers ii) characterize the composition of the parasitic complex responsible for root rots in garden peas in France and iii) identify effective microbial biocontrol agents towards this parasitic complex.

A digital PCR-based molecular quantification tool (ddPCR) was developed to accurately quantify low levels of *A. euteiches* in soils. The tool was validated using two hundred soil samples taken from four infested plots in northern France. A significant relationship between the disease severity and the inoculum density of *A. euteiches* in these soils was established and a model is proposed to predict the disease severity from the inoculum density. A spatial analysis of these two variables (inoculum density and disease severity) confirmed the aggregative structuring of the inoculum of *A. euteiches* in the form of foci in infested plots. A statistical analysis based on simulations carried out from these spatialized data led to the definition of a sampling strategy adapted to the heterogeneous distribution of *A. euteiches* in agricultural soils. This strategy (two W head-to-tail) makes it possible to obtain a representative measurement of the inoculum density in plots up to 12 ha and thus improves the accuracy of the disease risk prediction.

The composition of the parasitic complex was determined by molecular identification and pathogenicity tests of a large collection of 317 isolates of fungi and oomycetes isolated from symptomatic pea roots collected from infested fields in northern France, at the end of cultivation and during a growing season. The analysis revealed the prevalence of fungi belonging to the genus *Fusarium*, including *F. oxysporum*, *F. solani*, and *F. redolens* known in other countries for their involvement in the disease. It also revealed unexpected pathogens like *Clonostachys rhizophaga*, which has never been reported as a pea pathogen before. In addition, this analysis showed that fungal and oomycete communities associated with root rots evolve during the growing season. A molecular analysis based on a metabarcoding approach was implemented to compare the diversity of fungal and oomycetes communities between symptomatic and asymptomatic plants.

Finally, various biocontrol agents have been tested *in vitro*, in greenhouses and in the field, but no convincing results have been obtained, highlighting the difficulty of developing methods for the biocontrol of a parasitic complex in field crops.

To conclude, this work provides the pea producers with a reliable methodology for predicting the risk of the appearance of root rots due to *A. euteiches*. It has also made it possible to verify the hypothesis according to which a parasitic complex with a high specific richness is involved in the disease in France too, opening up research perspectives for its control.

**Keywords:** *Pisum sativum*, pea root rot complex, *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium*, disease risk assessment, biocontrol.



# TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	1
1. Les légumineuses, cultures d'intérêts agronomique, alimentaire et environnemental .	2
2. Le pois ( <i>Pisum sativum</i> L.) .....	4
2.1 Le pois en France et dans le monde .....	4
2.2 Des rendements instables pour une culture sensible aux stress .....	6
3. Les pourritures racinaires du pois et le complexe parasitaire .....	8
3.1 Un consortium d'agents pathogènes alternativement responsables de pourritures racinaires .....	8
3.2 Contrôler un consortium d'agents pathogènes divers et ayant chacun des exigences écologiques particulières : un défi difficile à relever .....	16
4. Les problématiques liées aux pourritures racinaires du pois potager en France .....	17
4.1 Gestion du risque lié à <i>Aphanomyces euteiches</i> .....	17
4.2 Au-delà d' <i>Aphanomyces euteiches</i> , un complexe parasitaire mal connu en France .....	20
4.3 Le biocontrôle, une piste prometteuse pour le contrôle de la maladie.....	21
5. Projet de recherche .....	23
<b>CHAPITRE I : Évaluation du risque de pourritures racinaires dues à <i>Aphanomyces euteiches</i> : quantification de faibles densités d'inoculum dans les sols agricoles en utilisant la PCR digitale</b> .....	25
Avant-propos .....	26
Risk assessment of <i>Aphanomyces euteiches</i> root rot disease: quantification of low inoculum densities in field soils using droplet digital PCR .....	28
Abstract .....	28
1. Introduction.....	29
2. Materials and methods .....	33
2.1 Field characteristics and soil sampling .....	33
2.2 Disease severity assessment .....	35
2.3 Presence of <i>Aphanomyces euteiches</i> in symptomatic roots .....	35
2.4 Isolation and molecular identification of oomycetes, and characterisation of their pathogenicity .....	36
2.5 Optimisation of DNA extraction from field soils .....	37
2.6 Development and optimisation of a droplet digital PCR assay to quantify <i>Aphanomyces euteiches</i> in field soil samples.....	38
2.7 ddPCR analysis.....	41
2.8 Assessment of ITS1 copy numbers <i>per</i> haploid genome of <i>Aphanomyces euteiches</i> .....	41
2.9 Statistical analyses.....	42
3. Results .....	44
3.1 Disease severity measured on field soil samples .....	44
3.2 Pea root rot pathogens.....	45
3.3 Duplex ddPCR on <i>Aphanomyces euteiches</i> genomic DNA.....	47

3.4	Optimisation of field soil DNA extraction and of the ddPCR assay .....	48
3.5	Sensitivity and accuracy of the ddPCR assay on naturally infested field soils .....	51
3.6	Relationship between the inoculum density and the disease severity index in naturally infested fields .....	53
4.	Discussion .....	57
4.1	Droplet digital PCR assay design and optimisation .....	57
4.2	Validation of the optimised ddPCR assay with naturally infested soils .....	60
4.3	Relationship between the inoculum density and the disease severity index in naturally infested field soils.....	61
5.	References.....	65
<b>CHAPITRE II : Prédiction du risque de pourritures racinaires dues à <i>Aphanomyces euteiches</i> : structuration spatiale de la densité d'inoculum de l'agent pathogène et du potentiel nécrotique racinaire des sols de parcelles infestées ; définition d'une stratégie d'échantillonnage adaptée .....</b>		
	Résumé .....	71
1.	Introduction.....	73
2.	Matériels et méthodes .....	77
2.1	Caractéristiques des parcelles étudiées et échantillonnage .....	77
2.2	Mesures des potentiels nécrotiques racinaires et des densités d'inoculum des sols échantillonnés .....	80
2.3	Analyses statistiques .....	80
2.3.1	Estimation statistique du nombre d'échantillons requis pour la mesure de la densité d'inoculum moyenne et du potentiel nécrotique racinaire moyen de chaque parcelle à une précision prédéfinie .....	80
2.3.2	Vérification de la présence d'autocorrélation spatiale de la densité d'inoculum et du potentiel nécrotique racinaire sur les parcelles échantillonnées .....	81
2.3.3	Simulation de 100 parcelles infestées composites de tailles variables.....	81
2.3.4	Estimation des variogrammes et krigeages ordinaires des quatre parcelles échantillonnées et des 100 simulations de parcelles infestées .....	82
2.3.5	Comparaison de la précision et de la reproductibilité de différentes stratégies d'échantillonnage pour la mesure de la densité d'inoculum d' <i>Aphanomyces euteiches</i> et du potentiel nécrotique racinaire .....	83
3.	Résultats .....	84
3.1	Distribution de la densité d'inoculum d' <i>Aphanomyces euteiches</i> et du potentiel nécrotique racinaire dans des parcelles infestées et estimation statistique du nombre d'échantillons requis pour une précision prédéfinie .....	84
3.2	Analyse de la structuration spatiale de la densité d'inoculum d' <i>Aphanomyces euteiches</i> et du potentiel nécrotique racinaire dans les parcelles infestées échantillonnées. ....	84
3.3	Analyse comparative de différentes stratégies d'échantillonnage appliquées aux prédictions par krigeage ordinaire de la densité d'inoculum et du potentiel nécrotique racinaire sur les quatre parcelles échantillonnées.....	91
3.4	Comparaison de la précision de différentes stratégies d'échantillonnage de sol sur 100 simulations de parcelles infestées.....	94
4.	Discussion .....	99

4.1	Structuration spatiale de la densité d'inoculum d' <i>Aphanomyces euteiches</i> et du potentiel nécrotique racinaire du sol de parcelles infestées .....	101
4.2	Estimation statistique du nombre optimal d'échantillons pour une parcelle.....	102
4.3	Comparaison de la précision et de la reproductibilité de différentes stratégies d'échantillonnage pour la mesure de la densité d'inoculum moyenne d' <i>Aphanomyces euteiches</i> et du potentiel nécrotique racinaire moyen du sol de parcelles infestées.....	103
5.	Conclusion .....	105
6.	Références.....	107
<b>CHAPITRE III : Identification, pathogénicité et dynamique des communautés de champignons et d'oomycètes associées aux pourritures racinaires du pois dans le nord de la France .....</b>		<b>111</b>
Avant-propos.....		112
Identification, pathogenicity, and community dynamics of fungi and oomycetes associated with pea root rot in the North of France.....		114
Abstract .....		114
1.	Introduction.....	116
2.	Materials and methods .....	119
2.1	Field characteristics and plant and soil sampling.....	119
2.2	Fungi and oomycetes isolation.....	123
2.3	DNA extraction and molecular identification of fungal and oomycete isolates .	124
2.4	Pathogenicity tests .....	127
2.5	Phylogenetic analysis.....	128
2.6	Statistical analyses.....	129
3.	Results .....	131
3.1	Fungi associated with root rot of peas at the end of the cropping season.....	131
3.2	Fungi and oomycetes associated with root rot of peas at various phenological stages .....	134
3.3	Pathogenicity of fungi and oomycetes isolates.....	139
3.4	Genetic diversity among the isolates of <i>Fusarium solani</i> and <i>Fusarium oxysporum</i> .....	143
4.	Discussion .....	147
5.	References.....	155
First report of <i>Fusarium avenaceum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium redolens</i> and <i>Fusarium solani</i> causing root rot in pea in France .....		162
<b>CHAPITRE IV : Pourritures racinaires du pois dans le nord de la France : analyse comparative de la diversité des communautés fongiques et oomycètes associées aux plantes symptomatiques et asymptomatiques.....</b>		<b>163</b>
1.	Introduction.....	165
2.	Matériels et méthodes .....	168
2.1	Campagnes d'échantillonnage .....	168
2.2	Préparation de communautés microbiennes artificielles .....	169
2.3	Extractions d'ADN.....	169
2.3.1	Extractions d'ADN de sol .....	169
2.3.2	Extractions d'ADN de plantes, champignons et oomycètes .....	170



2.4	Amplification par PCR.....	170
2.5	Séquençage PacBio.....	171
<b>CHAPITRE V</b>	<b>Biocontrôle du complexe parasitaire responsable des pourritures racinaires du pois</b> .....	<b>172</b>
	Avant-propos.....	173
1.	Introduction.....	175
2.	Matériels et méthodes .....	178
2.1	Matériel biologique .....	178
2.1.1	Agents pathogènes.....	178
2.1.2	Agents de biocontrôle .....	178
2.1.3	Variétés de pois .....	178
2.2	Tests de confrontations <i>in vitro</i> .....	180
2.3	Essai en serre .....	180
2.3.1	Préparation des inoculums.....	180
2.3.2	Mise en place et suivi de l'essai .....	181
2.4	Essai au champ .....	183
2.4.1	Préparation des inoculums.....	183
2.4.2	Mise en place de l'essai.....	184
2.4.3	Conduite de l'essai .....	186
2.4.4	Mesures effectuées.....	188
2.5	Analyses statistiques .....	188
3.	Résultats et discussion .....	190
3.1	Tests de confrontations <i>in vitro</i> .....	190
3.2	Essai en serre .....	192
3.3	Essai au champ .....	194
4.	Conclusion .....	198
<b>CHAPITRE VI</b>	<b>Discussion générale et perspectives.....</b>	<b>201</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>	.....	<b>226</b>
<b>ANNEXES</b>	.....	<b>253</b>

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1</b> : Surfaces cultivées en pois protéagineux, féverole et lupin en France.....	4
<b>Figure 2</b> : Diversité des symptômes dues aux agents du complexe parasitaire du pois.....	13
<b>Figure 3</b> : Echelle de notation des symptômes sur pois : indices de nécroses racinaires (INR).....	18
<b>Figure 4</b> : Exemples of distribution diagrams of droplets obtained after duplex digital Taqman PCR assay .....	47
<b>Figure 5</b> : Technical optimisation of the quantification of <i>Aphanomyces euteiches</i> inoculum density in naturally infested soil samples. ....	50
<b>Figure 6</b> : Boxplot representation of the distribution of the coefficients of variation of <i>Aphanomyces euteiches</i> inoculum density measurements based on technical replicates .....	52
<b>Figure 7</b> : Locally weighted scatterplot smoothing regression showing the relationship between disease severity indexes and <i>Aphanomyces euteiches</i> inoculum densities in each of the four fields. ....	53
<b>Figure 8</b> : Linear mixed model representation of the relationship between mean disease severity indexes and <i>Aphanomyces euteiches</i> inoculum densities .....	55
<b>Figure 9</b> : Mapping of root rot disease severity indexes measured and predicted with the linear mixed model of soils sampled in the 1-ha plots of Renescure, Verpillières, Woestyne and Flers fields.....	56
<b>Figure 10</b> : Cartographie de la structuration spatiale et variogrammes de la densité d'inoculum et du potentiel nécrotique racinaire sur les parcelles de Flers, Renescure, Verpillières et Woestyne.....	90
<b>Figure 11</b> : Patterns d'échantillonnage des différentes stratégies testées sur les densités d'inoculum (DI) des parcelles de Flers, Renescure, Verpillières et Woestyne estimées par krigeage ordinaire .....	92
<b>Figure 12</b> : Erreur relative sur l'estimation de la densité d'inoculum moyenne et du potentiel nécrotique racinaire moyen obtenue avec différentes stratégies d'échantillonnage de sol .....	93
<b>Figure 13</b> : Exemples des différentes stratégies d'échantillonnage testées sur les densités d'inoculum sur trois des 100 simulations de parcelles. ....	94
<b>Figure 14</b> : Distribution de l'erreur relative sur l'estimation de la densité d'inoculum moyenne et du potentiel nécrotique racinaire moyen obtenue avec différentes stratégies d'échantillonnage de sol sur 100 simulations de parcelles infestées en fonction du nombre d'échantillons.....	97
<b>Figure 15</b> : Erreur relative, en valeur absolue, de l'estimation de la densité d'inoculum moyenne et de l'estimation du potentiel nécrotique racinaire moyen de différentes stratégies d'échantillonnages .	98
<b>Figure 16</b> : Location of the fields sampled in 2017 and in 2018 .....	120
<b>Figure 17</b> : Relative abundance of fungal species among isolates collected from symptomatic pea roots sampled in 22 fields prospected in 2017 and number of sampled plants infected by each isolated species in each field.....	132
<b>Figure 18</b> : Biplot of nonmetric multidimensional scaling ordination showing differences in communities of fungi and oomycetes isolated from pea roots with rot symptoms at three phenological stages in two different fields in 2018. ....	137
<b>Figure 19</b> : Boxplot representation of the mean relative dry biomass of plants obtained in the <i>in vitro</i> pathogenicity assay for the isolates of each species.....	139
<b>Figure 20</b> : Principal component analysis biplot showing variables measured during pathogenicity tests and isolates of each species .....	142
<b>Figure 21</b> : Phylogenetic tree of <i>Fusarium solani</i> based on Maximum likelihood analysis of partial <i>TEF1</i> sequences.....	144

<b>Figure 22</b> : Phylogenetic tree of <i>Fusarium oxysporum</i> based on Maximun Likelihood analysis of partial <i>TEF1</i> sequences. ....	146
<b>Figure 23</b> : Dispositif de l'essai en serre 5 jours et 7 jours post-semis .....	181
<b>Figure 24</b> : Plan de l'essai de produits de biocontrôle au champ. ....	185
<b>Figure 25</b> : Evolution de l'essai visant à tester des produits de biocontrôle au champ.....	187
<b>Figure 26</b> : Cinétique de croissance radiale des agents pathogènes durant 96 h dans les tests de confrontation entre les agents de biocontrôle sélectionnés et les agents pathogènes du complexe parasitaire du pois. ....	190
<b>Figure 27</b> : Photographies des tests de confrontation à 4 jours, 7 jours et 10 jours post-inoculation entre les agents de biocontrôle et les agents pathogènes du complexe parasitaire du pois.....	191
<b>Figure 28</b> : Résultats de l'essai en serre représentant la biomasse sèche de chaque modalité relativement au témoin non inoculé et scores de pathogénicité .....	193
<b>Figure 29</b> : Essai au champ : comparaison directe des microparcelles traitées de chaque modalité à leurs témoins adjacents non traités pour les deux variétés de pois Crécerelle et Firenze.....	195
<b>Figure 30</b> : Essai au champ : résultats des mesures effectuées à mi-culture sur les demi-parcelles destinées aux prélèvements pour les deux variétés de pois Crécerelle et Firenze .....	196
<b>Figure 31</b> : Essai au champ : résultats des mesures effectuées à la récolte sur les « demi-parcelles rendements » pour les deux variétés de pois Crécerelle et Firenze. ....	197

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1</b> : Principaux agents pathogènes fongiques et oomycètes associés aux pourritures racinaires du pois .....	10
<b>Table 2</b> : Geographic coordinates, areas and historical cropping records of the Renescure, Verpillières, Woestyne and Flers fields. ....	34
<b>Table 3</b> : Field soil textures and main physico-chemical parameters. ....	34
<b>Table 4</b> : Primers and probes used in this study. ....	40
<b>Table 5</b> : Statistical parameters of the distribution of the disease severity index (DSI), molecular biomass, Ae_76bp and Ae_ITS1 copy numbers measured by digital droplet PCR at the field scale, and <i>Aphanomyces euteiches</i> diploid genomes. ....	45
<b>Table 6</b> : Pathogenic oomycetes isolated from disease severity bioassays, estimated ITS1 copy numbers per haploid genome of <i>Aphanomyces euteiches</i> , and pathogenicity scores. ....	46
<b>Table 7</b> : Summary of the estimated unconditional parameters with standards errors, estimated conditional parameters with standard deviations and quality criterion summary of the linear mixed model.....	55
<b>Tableau 8</b> : Coordonnées géographiques et historique cultural des parcelles de Renescure, Verpillières, Woestyne et Flers.....	78
<b>Tableau 9</b> : Texture et principaux paramètres physico-chimiques du sol des quatre parcelles échantillonnées .....	79
<b>Tableau 10</b> : Statistiques générales et taille d'échantillon optimale sans prise en compte de la corrélation spatiale.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Tableau 11</b> : Indice d'autocorrélation spatiale et paramètres des modèles de variogrammes utilisés pour la densité d'inoculum d' <i>Aphanomyces euteiches</i> et pour le potentiel nécrotique racinaire de chacune des parcelles échantillonnées.....	88
<b>Table 12</b> : Geographic coordinates, agronomical parameters and historical cropping records of sampled field.....	121
<b>Table 13</b> : Meteorological data over the pea cropping seasons 2017 and 2018 at the station of Mons-en-chaussée.....	122
<b>Table 14</b> : PCR primers used for fungal and oomycete identifications.....	126
<b>Table 15</b> : Relative frequencies of isolation of fungi and their prevalence among prospected fields and sampled plants in 2017. ....	133
<b>Table 16</b> : Relative frequencies of isolation of fungi and oomycetes, and their prevalence among sampled plants at each sampling time and in total in 2018.....	135
<b>Table 17</b> : Differences in fungi and oomycetes community within fields and phenological stages of pea plants and among fields and phenological stages of pea plants.....	138
<b>Tableau 18</b> : Composition des communautés artificielles de champignons et d'oomycètes utilisées comme témoins dans le séquençage à haut débit.....	169
<b>Tableau 19</b> : Séquences des amorces utilisées pour les amplifications spécifiques de la région « internal transcribed spacer » (ITS) de champignons et d'oomycètes.....	171
<b>Tableau 20</b> : Produits de biocontrôle homologués ou en développement sélectionnés pour être testés <i>in vitro</i> , en serre et au champ .....	179

## LISTE DES ANNEXES

---

**Annexe 1** : Etude bibliographique - Les pourritures racinaires du pois et autres légumineuses.....254

**Annexe 2** : Supplementary data – Chapitre III – Identification, pathogenicity, and community dynamics of fungi and oomycetes associated with pea root rot in the North of France. ....255

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique/Deoxyribonucleic Acid
AIC	Akaike Information Criterion
ANOSIM	Analysis Of Similarities
ANRT	Association Nationale de la Recherche et de la Technologie
ARN/RNA	Acide ribonucléique/Ribonucleic Acid
BIC	Bayesian Information Criterion
BLRV	Bean Leaf Roll Virus
BWYV	Beet Western Yellow Virus
BYMV	Bean Yellow Mosaic Virus
C	Carbone
CaCO <sub>3</sub>	Carbonate de Calcium
CMA	Corn Meal Agar
CMA-MBR	CMA + Metaxyl, Benomyl & Rifampicin
COI, COXI	Cytochrome c oxydase subunit I
CV	Coefficient de Variation
ddPCR	droplet digital PCR/ PCR digitale en gouttelette
DI/ID	Densité d'Inoculum/Inoculum Density
dNTPs	Désoxyribonucléoside triphosphate
DSI	Disease Severity Index
DTAMB	Développement de Techniques et Analyse Moléculaire de la Biodiversité
EAS	Echantillonnage Aléatoire Simple
eDNA	Extracellular DNA
ER	Erreur Relative
FAM	Fluorescein
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FOP	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>
FSSC	<i>Fusarium solani</i> Species Complex
GPS	Global Positioning System
HEX	Hexachlorofluorescein
I de Moran	Indice de Moran
IAGE	Ingénierie et Analyses en Génétique Environnementale
IC95	Intervalle de Confiance à 95 %
INR	Indice de Nécrose Racinaire
INRAE	Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
IP	Inoculum Potential
IR	Incertitude Relative
ISO	International Organisation for Standardisation
ITS	Internal Transcribed Spacer
LSU	Large Subunit
MEA	Malt Extract Agar
MIAE	Microorganismes d'Intérêt Agro-Environnemental
ML	Maximum Likelihood
MLST	Multilocus Sequence Typing
MM	Minimal Medium

MO/OM	Matière Organique/Organic Matter
MP	Mating Population
$n$	Taille de l'échantillon
N	Nitrogen/Nitrogène
NaCl	Chlorure de Sodium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDVI	Normalized Difference Vegetation Index
NF	Norme Française
NMDS	Non-metric Multidimensional Scaling
$n_{opt}$	Nombre Optimal
NPK	Solution Nutritive : teneurs égales en azote, phosphore et potassium
OM	Organic Matter/Matière Organique
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentoxyde de Phosphore
PAC	Politique Agricole Commune
PCA	Principal Component Analysis
PCMV	Pea Common Mosaic Virus
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
PEP gene	Pea Pathogenicity gene
PeLRV	Pea Leafroll Virus
PGB	Peptone Glucose Broth
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PI	Potentiel Infectieux
PMG	Poids de Mille Grains
PNR	Potentiel Nécrotique Racinaire
PSbMV	Pea Seed-borne Mosaic Virus
qPCR	PCR quantitative
QTL	Quantitative Trait Loci
RBa	Relative Dry Biomass of aerial parts
RBp	Relative Dry Biomass of plants
RBr	Relative Dry Biomass of roots
REML	Restricted Maximum Likelihood
$s$	Ecart type
$s^2$	Variance
SIX	Secreted In Xylem
ST	Sequence Types
$s_{\bar{x}}$	Erreur type de la moyenne
T	Témoin
TA	Témoin Adjacent
TEF1	Translation Elongation Factor 1- $\alpha$
$\mu$	Moyenne de la population
$\sigma_{\bar{x}}$	Erreur type de la population
$\bar{x}$	Moyenne de l'échantillon

# INTRODUCTION GÉNÉRALE





# 1. Les légumineuses, cultures d'intérêts agronomique, alimentaire et environnemental

Les Légumineuses appartiennent à la famille des *Fabaceae*, anciennement nommée *Leguminosae*. Celle-ci est traditionnellement divisée en trois sous-familles, les *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Faboideae* (synonyme *Papilionoideae*) qui regroupent plus de 20 000 espèces réparties dans plus de 800 genres (Lewis et al. 2005). Les *Fabaceae* représentent la troisième famille la plus vaste chez les plantes à fleurs et les espèces très diverses qu'elle englobe sont retrouvées dans la plupart des environnements terrestres. Les légumineuses sont caractérisées par un fruit distinct, appelé légume, qui a donné son nom originel à la famille (Smýkal et al. 2015b). Elles possèdent la particularité de s'associer en symbiose avec des bactéries, les *Rhizobia*, capables de fixer l'azote atmosphérique et de le restituer à la plante sous forme d'azote ammoniacal qu'elle peut assimiler (Masson-Boivin & Sachs 2018). Les *Fabaceae* jouent ainsi un rôle important dans le cycle de l'azote et dans les écosystèmes naturels.

Les premières légumineuses ont été domestiquées en même temps que les céréales, dans le Croissant Fertile, il y a près de 10 000 ans. Il s'agissait d'espèces de la sous-famille des *Faboideae* comme le pois (*Pisum sativum* L.), la fève (*Vicia faba*), le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), la lentille (*Lens culinaris*), et le pois chiche (*Cicer arietinum*), qui constituaient alors une composante alimentaire importante des civilisations (Smýkal et al. 2015b). Aujourd'hui, elles sont cultivées pour la production de fourrages, de graines ou de légumes verts et sont désormais la deuxième famille de plantes cultivées la plus importante après les graminées (*Poaceae*) (Smýkal et al. 2015b). La qualité nutritionnelle des graines, riches en protéines et en micronutriments, est particulièrement appréciée pour l'alimentation humaine et animale (Jezierny et al. 2010 ; Hall et al. 2017). Leur consommation est également associée à des bénéfices pour la santé, comme la réduction du risque de maladies cardiovasculaires (Bouchenak & Lamri-Senhadji 2013). Au-delà des avantages nutritionnels, la capacité des légumineuses à fixer l'azote atmosphérique *via* la symbiose avec les *Rhizobia* présente également un intérêt agronomique important. Leur culture permet, grâce à la minéralisation de leurs résidus, de fournir de l'azote disponible pour les cultures suivantes et ainsi de diminuer l'utilisation d'intrants azotés (Jensen et al. 2020). Il en résulte une diminution des

émissions de gaz à effet de serre ( $\text{CO}_2$  et  $\text{N}_2\text{O}$ ), auxquelles la fertilisation azotée est l'un des principaux contributeurs en agriculture (Stagnari et al. 2017). Cette caractéristique est particulièrement utile dans les rotations culturales ou dans les systèmes d'intercultures, notamment en association avec des céréales, afin d'améliorer la productivité globale et de réduire les besoins en fertilisants (Nemecek et al. 2008 ; Peoples et al. 2009). De plus, la présence de légumineuses dans les rotations augmente la diversité des plantes cultivées et permet de rompre les cycles infectieux de certains ravageurs des cultures et d'en réduire la pression (Bailey et al. 2001 ; Ratnadass et al. 2012).

Ces multiples avantages font des légumineuses une culture à promouvoir pour favoriser une agriculture plus durable et une alimentation saine. L'année 2016 a ainsi été déclarée Année internationale des légumineuses par l'Assemblée Générale des Nations Unies sous l'égide de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (résolution 68/231 du 20 décembre 2013). Cette reconnaissance vise avant tout à encourager la production et la consommation de légumineuses pour répondre aux défis liés à la nutrition et à la sécurité alimentaire mondiale, à la santé, aux changements climatiques et à la biodiversité (Calles et al. 2019).

En Europe, dans les années 1970, des subventions ont été mises en place par la Communauté Européenne par l'intermédiaire de la Politique Agricole Commune (PAC), pour diminuer la dépendance vis-à-vis des tourteaux de soja américains. Elles ont eu pour impact d'augmenter très fortement la production, notamment en France, de quelques légumineuses à graines, principalement le pois protéagineux et dans une moindre mesure le lupin et la féverole (Voisin et al. 2013 ; Figure 1). A partir de 1992, le découplage des subventions aux producteurs, principe selon lequel les aides qui leurs sont allouées ne sont plus proportionnelles aux quantités produites, a entraîné une baisse des prix des légumineuses riches en protéines (Voisin et al. 2013). Cette baisse des prix, conjuguée à l'instabilité des rendements liés à la sensibilité aux stress abiotiques et biotiques des cultures de pois notamment, a abouti à une diminution importante des surfaces agricoles utiles cultivées en France et en Europe (Voisin et al. 2013 ; Magrini et al. 2016 ; Zander et al. 2016). La baisse en France et en Europe de la production de protéines végétales nécessaires à l'alimentation du bétail a alors été compensée par des importations, notamment de soja ainsi que par l'introduction de cette culture dans les rotations. Désormais, la production de légumineuses

est à nouveau promue en France par le plan Protéines Végétales (2014-2020) reconduit dans le cadre du plan de relance pour la période 2021-2022. Il vise à renforcer la production nationale afin d'accroître l'indépendance vis-à-vis des importations de protéines végétales pour l'alimentation humaine et animale tout en s'engageant dans le développement d'une agriculture plus durable et notamment de l'agroécologie.

### SURFACES > FRANCE – PROTÉAGINEUX • 1984-2019

Source : Terres Univia d'après SCEES/ONIOL/ONIGC/FranceAgriMer/SSP

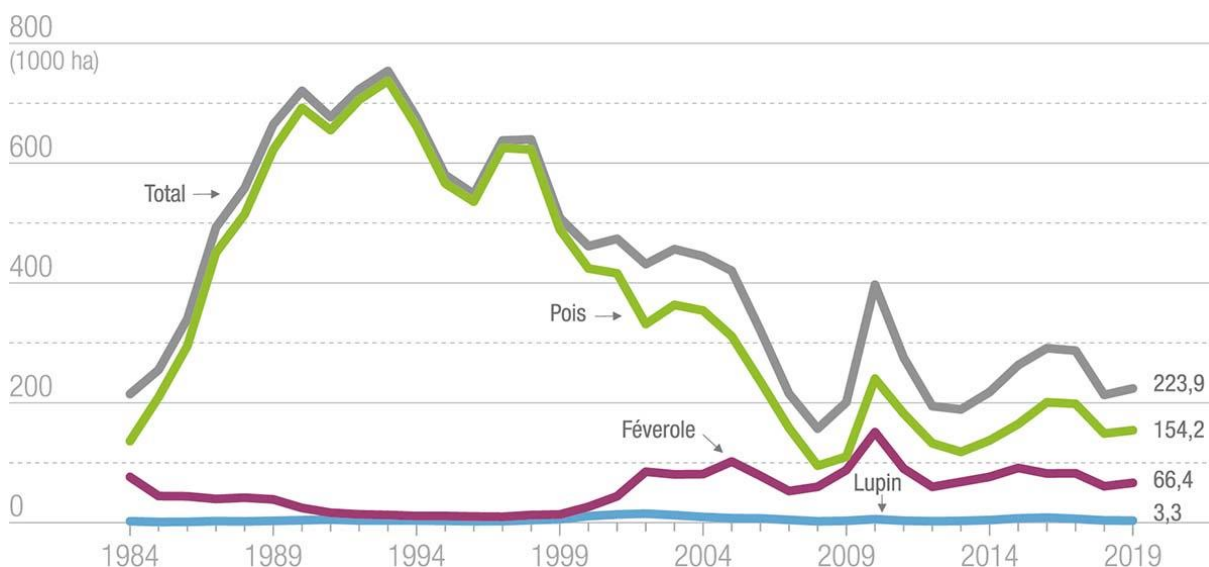


Figure 1 : Surfaces cultivées en pois protéagineux, féverole et lupin en France (Terres Univia 2021).

## 2. Le pois (*Pisum sativum* L.)

### 2.1 Le pois en France et dans le monde

Le genre *Pisum* (sous-famille *Faboideae*, tribu *Fabeae*) réunit trois espèces de pois : *Pisum sativum* L. englobant les deux sous-espèces *sativum* et *eliatius*, *P. fulvum* Sibth & Sm et *P. abyssinicum* Asher & Graebn. Le pois cultivé, *P. sativum* L. résulterait de la sélection opérée à partir d'un ancêtre commun qu'il partage avec la forme sauvage *P. sativum* subsp. *eliatius* (Smýkal et al. 2011, 2015a, 2018). Depuis la domestication du pois par l'Homme il y a près de 10 000 ans, sa culture s'est rapidement étendue en Asie du Sud-Est, dans le bassin méditerranéen et en Europe (Zohary 1999). De nos jours, le pois est cultivé pour la production de fourrage, de graines sèches et de graines fraîches. Les pois fourragers, récoltés verts à la floraison, sont destinés à l'alimentation animale. Les pois récoltés secs peuvent être destinés

à la fois à l'alimentation humaine et à l'alimentation animale. Ainsi en France, le pois protéagineux est récolté sec et environ la moitié de la production est destinée à l'alimentation animale et l'autre moitié est destinée à l'industrie française des ingrédients agroalimentaires et non alimentaires, ou exportée à l'étranger pour l'alimentation humaine (Terres Inovia 2021). Enfin, les pois dont les graines sont récoltées fraîches sont principalement destinés à l'alimentation humaine. On parle de pois potager, petit pois ou pois de conserve. La dénomination « pois de conserve » est cependant réservée aux pois frais destinés à un usage industriel pour les conserves ou les légumes surgelés (Union nationale interprofessionnelle des légumes transformés (UNILET 2021)). Ces derniers dont les graines sont récoltées avant leur pleine maturité sont classés dans les cultures légumières.

Comme pour la plupart des légumineuses, les qualités nutritionnelles de la graine du pois et sa capacité à fixer l'azote atmosphérique lors de sa culture représentent des avantages en faveur de sa production et de sa consommation. Les graines de pois sont ainsi une importante source de protéines et offrent un profil nutritionnel varié dont les qualités nutritives pour l'alimentation humaine sont reconnues (Fabbri & Crosby 2015). On y retrouve de l'amidon (18,6 à 54,1%), des protéines (15,8 à 32,1%), des fibres (5,9 à 12,7%), du sucrose (1,3 à 2,1%), de l'huile (0,6 à 5,5%) mais aussi des minéraux, des vitamines et des micronutriments comme les polyphénols, les saponines, les  $\alpha$ -galactosides ou l'acide phytique dont les effets bénéfiques pour la santé ont été rapportés (Dahl et al. 2012 ; Arnoldi et al. 2015).

Au niveau mondial, le pois est ainsi la deuxième culture de graines de légumineuses (hors soja) après le haricot. Il est principalement cultivé dans les régions tempérées du monde ayant des sols fertiles et bien drainés. En 2019, la production mondiale de pois à graines sèches représentait 14,18 Mt (FAOSTAT 2021). Le Canada est le principal pays producteur (4,24 Mt), suivi par la Russie (2,37 Mt), la Chine (1,46 Mt), les Etats Unis (1,01 Mt), l'Inde (0,81Mt) et la France (0,71 Mt). La production mondiale de pois potager atteignait près de 21,77 Mt en 2019 (FAOSTAT 2021). La Chine (13,40 Mt) et l'Inde (5,56 Mt), où le pois représente une importante source de protéines pour la consommation humaine, sont de très loin les deux principaux pays producteurs mondiaux. La France et les Etats-Unis se situent à la troisième et à la quatrième place avec des productions de pois frais respectives de 0,28 Mt et de 0,23 Mt.

La France fait ainsi partie des principaux pays producteurs de pois protéagineux et potager. Pourtant, après avoir très fortement augmenté dans les années 1980 sous l'effet des subventions de la PAC pour atteindre 700 000 ha cultivés en 1993, la superficie cultivée en pois protéagineux a ensuite fortement décliné pour atteindre 159 200 ha en 2019 (Terres Univia 2021). Comparativement à celles du pois protéagineux, la production et la superficie cultivée en pois potager sont restées stables en France depuis les années 1980. Cette tendance s'explique avant tout par une demande constante pour l'alimentation humaine. Aujourd'hui, les superficies cultivées en pois potager sont d'environ 30 000 ha (UNILET 2021). Les cultures de pois potager sont réparties dans trois grands bassins de production. L'ensemble Nord-Picardie-Centre-Bourgogne représente plus de la moitié des surfaces et produit majoritairement des pois fins et clairs destinés à la mise en conserve. La Bretagne produit majoritairement des pois fonceés adaptés à la surgélation. Enfin, le Sud-Ouest représente environ 8% des surfaces cultivées, principalement en « garden peas », des pois de gros calibre aussi appelés « pois anglais » et destinés à la surgélation.

La culture du pois potager s'étend sur un cycle qui dure de 75 à 115 jours suivant la variété et les conditions climatiques (UNILET 2021). Ce cycle est divisé en plusieurs phases :

- i) la levée dont la durée peut varier de 10 jours à 1 mois suivant les conditions de semis.
- ii) la croissance végétative correspond à la phase entre la levée et la floraison. Sa durée est déterminée par la précocité (caractéristique variétale) correspondant au rang du nœud de la première fleur. Selon la variété, il peut s'agir du 9<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> nœud. Cette phase peut durer de 35 à 50 jours.
- iii) la phase de développement du fruit, autrement dit du remplissage des gousses et des grains, s'étale sur 25 à 45 jours et est davantage dépendante des conditions climatiques.

## **2.2 Des rendements instables pour une culture sensible aux stress**

Parmi les obstacles à la culture du pois, et à celle de beaucoup de légumineuses, l'adaptabilité limitée et la sensibilité élevée de nombreux cultivars à divers stress biotiques et abiotiques sont déterminants. La sécheresse, les températures trop élevées ou trop basses ainsi qu'une salinité trop élevée sont les principaux stress abiotiques défavorables à la culture du pois (Araujo et al. 2015). L'intensité, la durée et la répartition de ces conditions défavorables peuvent largement influencer l'ampleur des pertes de rendement de la culture

(Araujo et al. 2015). Les stress biotiques sont également d'origine diverses. Les insectes phytophages représentent une contrainte importante à la culture du pois. Selon l'UNILET (<http://unilet.fr/cultures/pois/pois.php?page=Ravageurs>), les principaux ravageurs des cultures de pois potager en France sont la cécidomyie du pois (*Contarinia pisi*), le puceron vert (*Acyrtosiphon pisum*) et le puceron noir (*Aphis faba*), la sitone du pois (*Sitona lineatus*), le thrips du lin et des céréales (*Thrips angusticeps*), la tordeuse du pois (*Cydia nigricana*) et plus occasionnellement la bruche (*Bruchus pisorum*) et le thrips du pois (*Frankliniella robusta*). Ces ravageurs occasionnent des dégâts importants mais variables suivant le contexte cultural et les conditions climatiques. L'institut technique Terres Inovia estime que, dans les cas extrêmes, les pertes de rendement en pois protéagineux occasionnées par la cécidomyie ou les trips peuvent aller jusqu'à 30 q/ha et celles occasionnées par la sitone jusqu'à 12 q/ha, pour un rendement moyen de 45q/ha.

La culture du pois est également sujette à de nombreuses maladies d'origine microbienne intervenant à différentes étapes de son cycle de développement. Certaines pathologies se développent sur les parties aériennes des plants de pois et causent des pertes de rendements importantes. Elles peuvent être d'origine fongique comme l'aschochytose (ou anthracnose), une des maladies les plus problématiques qui est due à un consortium d'agents pathogènes composé de *Didymella pisi* (syn. *Aschochyta pisi*), *Didymella pinodes* (syn. *Aschochyta pinodes*) et *Didymella pinodella* (syn. *Phoma medicaginis* var. *pinodella*), responsable de taches noires et de nécroses sur la tige, les feuilles et les gousses (Tivoli & Banniza 2007 ; Le May et al. 2009). Les semences infectées et les chaumes et/ou les ascospores transportées par l'air sont les principales sources d'inoculum primaire de cette maladie des parties aériennes, les conidies projetées par la pluie représentant une source de dispersion pendant la culture (Tivoli & Banniza 2007). *Botrytis cinerea*, un champignon nécrotrophe à large spectre d'hôtes est également responsable de la pourriture grise qui se développe sur les feuilles, les fleurs et les gousses, entraînant des pertes de rendement de 10 à 15 q/ha lors de fortes attaques (Brauna-Morzevska et al. 2019 ; Terres Inovia 2021). D'autres maladies moins fréquentes peuvent néanmoins être préjudiciables. C'est le cas par exemple de l'oïdium causé par le champignon *Erysiphe pisi*, la rouille causée par *Uromyces pisi*, le sclérotinia causé par *Sclerotinia sclerotiorum* ou encore le mildiou causé par l'oomycète *Peronospora pisi* (Stegmark 1994 ; Barilli et al. 2012 ; Fondevilla & Rubiales 2012 ; Sang et al. 2019). Les maladies

aériennes peuvent également être d'origine bactérienne comme la graisse du pois due à *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Hollaway et al. 2007). Enfin, de nombreuses pathologies virales peuvent affecter les parties aériennes. Il s'agit notamment des jaunisses (Pea Leafroll Virus (PeLRV) ; Beet Western Yellow Virus (BWYV) ; Bean Leaf Roll Virus (BLRV)) et des mosaïques du pois (Pea Common Mosaic Virus (PCMV) ; Pea Enation Mosaic Virus (PEMV) ; Pea Seed-borne Mosaic Virus (PSbMV) ; Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV)) (Chatzivassiliou 2021). Elles sont le plus souvent transmises par différents insectes, souvent les pucerons, ou encore par la graine, le pollen ou par contact (Chatzivassiliou 2021)

Cependant, c'est au niveau racinaire qu'on retrouve les maladies les plus dommageables pour la culture. Ainsi, certains nématodes à galles du genre *Meloidogyne* sont des parasites importants du pois. Il s'agit principalement *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. pisi* et *M. phaseoli* (Fondevilla & Rubiales 2012). Mais les maladies les plus préoccupantes pour la culture de pois sont les fontes de semis et les pourritures racinaires, qui sont dues à un complexe parasitaire de champignons et d'oomycètes. Non seulement elles engendrent des dégâts importants qui impactent les rendements mais surtout, les sols d'une parcelle infestée peuvent rester sensibles à la maladie pendant de nombreuses années. Les pourritures racinaires sont favorisées par la succession des cultures de légumineuses sur les mêmes parcelles, qui aboutissent à l'accumulation de parasites dans les sols (Wille et al. 2019). Ce phénomène est parfois appelé « fatigue des sols », « maladie du sol » ou « syndrome de dépression du rendement des légumineuses » (Bodker et al. 1993 ; Nayyar et al. 2009 ; Huang et al. 2013 ; Fuchs et al. 2014 ; Bainard et al. 2017).

### **3. Les pourritures racinaires du pois et le complexe parasitaire**

#### **3.1 Un consortium d'agents pathogènes alternativement responsables de pourritures racinaires**

Les pourritures racinaires sont des maladies d'origine tellurique et sont les plus dommageables à la culture du pois, qu'il soit potager, fourrager ou protéagineux. Ces maladies se caractérisent par la multiplicité des microorganismes pouvant être impliqués d'une



manière directe ou indirecte dans la pathogenèse et retrouvés au niveau des parties infectées de la plante hôte. Au niveau mondial, on retrouve ainsi plus de vingt espèces appartenant à différents genres d'oomycètes et de champignons (Tableau 1). Les agents pathogènes impliqués sont communément regroupés au sein d'un consortium de microorganismes appelé « complexe parasitaire du pois ». Les oomycètes de ce complexe parasitaire les plus répandus appartiennent aux genres *Pythium* et *Phytophthora* et à l'espèce *A. euteiches* (Chang et al. 2017 ; Gossen et al. 2016 ; Kraft & Pflieger 2001). Concernant les champignons, les principaux agents pathogènes rapportés par différentes études épidémiologiques appartiennent aux genres *Fusarium* et *Didymella* et aux espèces *Rhizoctonia solani* et *Thielaviopsis basicola* (Blume & Harman 1979; Tu 1991 ; Oyarzun et al. 1993 ; Persson et al. 1997 ; Gossen et al. 2011 ; Parker et al. 2013 ; Melzer et al. 2016 ; Šišić et al. 2018 ; Chatterton et al. 2019). Au sein du genre *Fusarium*, les espèces *F. solani*, *F. oxysporum* et notamment leurs formes spéciales *pisi*, ainsi que *F. avenaceum* sont les plus préoccupantes (Persson et al. 1997 ; Gossen et al. 2017 ; Harveson et al. 2021). Cependant, de nombreuses autres espèces comme *F. acuminatum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. redolens*, *F. sambucinum* var. *coeruleum*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum* ou encore *F. torulosum* ont déjà été isolées, plus ou moins fréquemment, de racines de pois symptomatiques (Clarkson 1978 ; Oyarzun et al. 1993 ; Persson et al. 1997 ; Skovgaard et al. 2002 ; Feng et al. 2009 ; Chittem et al. 2015 ; Baćanović-Šišić et al. 2018 ; Taheri et al. 2017 ; Chatterton et al. 2019) (Tableau 1). Enfin, d'autres champignons tels que *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Cylindrocarpon* spp. peuvent être sporadiquement retrouvés dans les tissus infectés mais n'ont jamais été décrits comme ayant un impact important sur le rendement des cultures de pois (Oyarzun et al. 1993 ; Soylu & Dervis 2011). D'une manière générale, les caractéristiques pathogènes des agents de ce complexe parasitaire sont déterminées par la biologie et le cycle infectieux propres à chaque espèce, mais également par la présence éventuelle de facteurs de virulence spécifiques chez certains taxons. Ainsi, dans la plupart des études, les tests de pathogénicité effectués ont montré que la virulence et l'agressivité sur le pois varient largement entre les différentes espèces impliquées, tout comme entre les différents isolats d'une même espèce (Persson et al. 1997 ; Skovgaard et al. 2002 ; Šišić et al. 2018). Les cycles infectieux et les caractéristiques biologiques, écologiques et pathogènes des principaux agents causaux du complexe parasitaire sont présentés plus en détail dans l'Annexe bibliographique adossée à ce document (Annexe 1).

**Tableau 1** : Principaux agents pathogènes fongiques et oomycètes associés aux pourritures racinaires du pois

Origine géographique		Genres								Références
Continent	Pays	<i>Aphanomyces</i>	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Thielaviopsis</i>	<i>Didymellaceae</i>	Autres champignons	
Afrique	Algeria		<i>Pythium</i> spp.		<i>F. oxysporum</i> * <i>F. solani</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.		<i>Ascochyta</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Sclerotinia</i> sp. <i>Stemphylium</i> sp.	Merzoug et al. 2014
	Afrique du Sud		<i>P. dissotocum</i> <i>P. irregulare</i> <i>P. mamillatum</i>							Botha & Coetzer 1996
Asie	Chine				<i>F. solani</i> *					Xiang et al. 2012
	Corée								<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Kim et al. 2006
	Inde		<i>Pythium</i> spp.		<i>F. oxysporum</i> * <i>F. solani</i> *	<i>R. solani</i> *		<i>Didymella pinodella</i> (syn. <i>Phoma medicaginis</i> var. <i>pinodella</i> )*		Sagar & Sugha 1997 ; Sharma 2011
	Iran		<i>P. aphanidermatum</i> * <i>P. ultimum</i> *		<i>F. oxysporum</i>					Kaiser et al. 1971 ; Saremi et al. 2011
	Japon	<i>A. euteiches</i>								Yokosawa et al. 1974
	Pakistan	<i>A. euteiches</i> *				<i>F. oxysporum</i> <i>F. solani</i> *	<i>R. solani</i>			Khan et al. 1998
	Taiwan		<i>P. aphanidermatum</i> <i>P. ultimum</i>			<i>F. oxysporum</i> * <i>F. solani</i> *				Lin et al. 1984 ; Lin et al. 2002
Europe	Allemagne				<i>F. avenaceum</i> * <i>F. oxysporum</i> <i>F. solani</i> *			<i>D. pinodella</i> * (syn. <i>Peyronellaea pinodella</i> ) <i>D. pinodes</i> * <i>D. lethalis</i> *		Baćanović-Šišić et al. 2018 ; Šišić et al. 2018

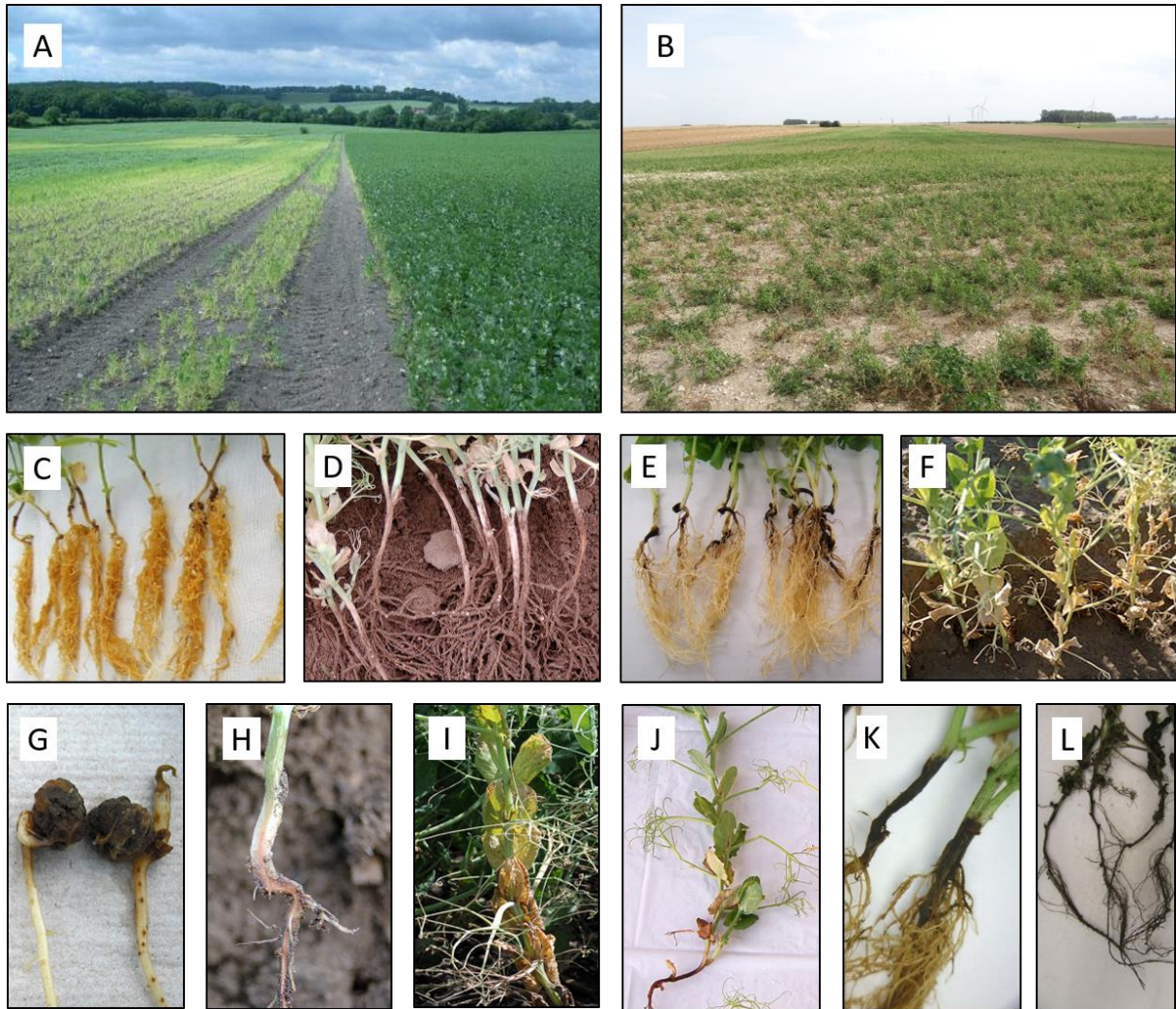
INTRODUCTION GÉNÉRALE

Danemark			<i>F. oxysporum</i> *		<i>T. basicola</i> *			Bødker et al. 1993 ; Skovgaard et al. 2002
Danemark ou Suède	<i>A. euteiches</i> *	<i>P. irregulare</i> * <i>P. sylvaticum</i> *	<i>F. avenaceum</i> * <i>F. culmorum</i> * <i>F. oxysporum</i> * <i>F. redolens</i> * <i>F. solani</i> *		<i>T. basicola</i> (teleomorph <i>Chalara elegans</i> )	<i>D. pinodella</i> (syn. <i>Phoma medicaginis</i> var. <i>pinodella</i> )*	<i>Cylindrocarpon</i> sp. <i>Mycosphaerella pinodes</i>	Persson et al. 1997
France	<i>A. euteiches</i> *							Wicker et al. 2001
Italie						<i>Didymella lethalis</i> *		Šišić et al. 2018
Norvège	<i>A. euteiches</i>							Sundheim & Wiggen 1972
Pays-Bas	<i>A. euteiches</i> *	<i>Pythium</i> spp.	<i>F. solani</i> * <i>F. oxysporum</i> <i>F. avenaceum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. graminearum</i>	<i>R. solani</i>	<i>T. basicola</i> *	<i>D. pinodella</i> (syn. <i>P. medicaginis</i> var. <i>pinodella</i> )	<i>Cylindrocarpon destructurans</i> <i>Mycosphaerella pinodes</i>	Oyarzun & van Loon 1989 ; Oyarzun et al. 1993
Royaume-Uni			<i>F. avenaceum</i> * <i>F. graminearum</i> * <i>F. redolens</i> * <i>F. sambucinum</i> * <i>F. solani</i> * <i>F. oxysporum</i> *		<i>T. basicola</i>			Clarkson 1978 ; Biddle et al. 1988 ; Bywater & Hickman 1989 ; Jenkins et al. 2018, 2021
Suède		<i>P. pisi</i> *						Heyman et al. 2013
Suisse						<i>Didymella lethalis</i> *		Šišić et al. 2018
Turquie		<i>Pythium</i> spp.	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>	<i>T. basicola</i>		<i>S. sclerotium</i>	Soylu & Dervis 2011

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Amérique du Nord	Canada	<i>A. euteiches</i> *	<i>P. ultimum</i> * <i>P. irregulare</i> <i>P. oligandrum</i> <i>P. sylvaticum</i> <i>P. vexans</i> <i>P. hypogynum</i>	<i>P. sansomeana</i> *	<i>F. avenaceum</i> * <i>F. redolens</i> * <i>F. solani</i> * <i>F. acuminatum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. equiseti</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. tricinctum</i> <i>F. torulosum</i>	<i>R. solani</i> *	<i>T. basicola</i>	<i>Ascochyta</i> / <i>Phoma</i> spp. <i>Peyronellaea</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	Jones & Drechsler 1925 ; Basu et al. 1973 ; Blume & Harman 1979 ; Reyes 1980 ; Tu 1991 ; Feng et al. 2010 ; Taheri et al. 2011, 2017 ; Melzer et al. 2016 ; Chatterton et al. 2015 ; Chang et al. 2017 ; Wu et al. 2018
	Etats-Unis	<i>A. euteiches</i> *	<i>P. ultimum</i> * <i>P. debaryanum</i> *		<i>F. acuminatum</i> * <i>F. avenaceum</i> * <i>F. culmorum</i> * <i>F. equiseti</i> * <i>F. graminearum</i> * <i>F. oxysporum</i> * <i>F. redolens</i> * <i>F. solani</i> * <i>F. sporotrichioides</i> *	<i>R. solani</i> *	<i>T. basicola</i> (teleomorph <i>Chalara</i> <i>elegans</i> )*	<i>Mycosphaerella</i> <i>pinodes</i>	Kraft & Roberts 1969 ; Blume & Harman 1979 ; Holub et al. 1991 ; Mathew et al. 2012 ; Chittem et al. 2015	
Océanie	Australie		<i>P. ultimum</i> *		<i>F. oxysporum</i> * <i>F. solani</i> *			<i>Didymella</i> <i>pinodella</i> (syn. <i>Ascochyta</i> <i>pinodella</i> )*	Kerr 1963	
	Nouvelle- Zélande	<i>A. euteiches</i> *							Manning & Menzies 1980	

\* Pathogénicité confirmée par la réinoculation de l'isolat



**Figure 2** : Diversité des symptômes dus aux agents du complexe parasitaire du pois. (A) Champ de pois infesté par *Aphanomyces euteiches* (Source : <https://www.terresinovia.fr/-/le-test-aphanomyces>) ; (B) champ de pois infesté par *Fusarium* spp. ; (C, D) pourriture racinaire causée par *A. euteiches* ; (E, F) Pourriture racinaire causée par *Fusarium* spp. ; (G) pourriture de la graine causée par *Pythium* spp. ; (H, I) flétrissement causé par *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* ; (J) pourriture racinaire causée par *Rhizoctonia solani* ; (K, L) pourriture racinaire causée par *Thielaviopsis basicola* (<https://www.ag.ndsu.edu> Photo: Lyndon Porter USDA-ARS; Lindsey du Toit; S. Markell, NDSU; K. Chang, Alberta Agriculture and Forestry).

La composition du consortium et l'importance relative de chaque espèce peut être variable suivant la zone géographique considérée (Wille et al. 2019). La présence d'inoculum pathogène dans les sols est un facteur déterminant de la composition de ce consortium à l'échelle régionale. Les agents pathogènes peuvent y persister de longues périodes (plus de 10 ans pour *A. euteiches*), sous forme libre ou associés aux résidus de cultures sous la forme d'oospores et de sporanges (*A. euteiches*, *Pythium* spp.), de chlamydospores (*Fusarium* spp. et *T. basicola*) ou encore sous forme d'hyphes ou de sclérotés (*R. solani* et *S. sclerotiorum*). La composition et la densité de cet inoculum sont régulées par les conditions pédoclimatiques ainsi que par la fréquence des espèces hôtes dans les rotations culturales, que ce soit dans les cultures, les couverts végétaux ou les paillis (Moussart et al. 2013 ; Šišić et al. 2018).

Quand l'inoculum est présent dans le sol d'une parcelle, son pouvoir infectieux peut être modulé par certains facteurs environnementaux comme les conditions météorologiques, certains facteurs édaphiques d'origine biotique (communautés microbiennes du sol et de la rhizosphère), abiotiques (paramètres structuraux, composition et physico-chimie du sol) ou anthropiques (pratiques culturales) ainsi que par le niveau de résistance de la plante hôte (Rubiales et al. 2015 ; Taheri et al. 2017 ; Zitnick-Anderson et al. 2020). La diversité taxonomique de ce complexe parasitaire implique des caractéristiques pathogènes et des exigences écologiques variées qui recouvrent de larges gammes d'hôtes et de conditions pédoclimatiques dans lesquelles l'un ou l'autre de ces agents parasites peut se développer et exprimer son pouvoir pathogène. Ainsi, un large spectre de conditions environnementales est favorable au développement de la maladie. Suivant les agents pathogènes impliqués et les conditions environnementales, des pathologies ou des symptômes variés pourront apparaître, souvent à différentes phases de la culture du pois (Figure 2). Certaines espèces de *Fusarium* et de *Pythium* ainsi que *Rhizoctonia solani* peuvent par exemple causer des brûlures ou des fontes de semis (Xi et al. 1995 ; Hwang et al. 2000, 2007 ; Chang et al. 2013 ; Melzer et al. 2016). En plus de pourritures racinaires, *F. oxysporum* f. sp. *pisi* et certains isolats de *F. redolens* sont également responsables de flétrissements du pois, ou fusariose vasculaire (Persson et al. 1997 ; Kraft & Pflieger 2001). Enfin, les pourritures racinaires ou pourritures molles du pois attribuées à *A. euteiches*, se distinguent de celles attribuées aux *Fusarium*, aussi appelées nécroses racinaires, pied noir, pourridié, ou encore jambe noire du pois (Harveson et al. 2021). Dans des conditions climatiques favorables, l'apparition des symptômes sur les

parties aériennes sera généralement précoce dans les parcelles fortement infestées par *A. euteiches*, dont le développement et l'infectiosité sont favorisés par une forte humidité en début de saison culturale. L'apparition des symptômes sera généralement plus tardive avec les *Fusarium* spp., plus adaptées aux conditions chaudes et sèches de fin de saison culturale et dont la manifestation des symptômes est favorisée par le stress hydrique de la plante (Pieczarka & Abawi 1978 ; Tu 1994 ; Wu et al. 2018).

Cependant, les agents pathogènes du complexe parasitaire du pois cohabitent souvent dans les symptômes racinaires (Wille et al. 2019). De manière générale, des lésions causées par un ou plusieurs des agents pathogènes les plus agressifs sont souvent colonisées par des agents pathogènes secondaires et plus largement par une microflore opportuniste. Cette colonisation des lésions est connue pour moduler la sévérité des symptômes (Lamichhane et al. 2017). Le plus fréquemment, des effets additifs ou synergiques entre agents pathogènes augmentent la gravité des symptômes. C'est le cas par exemple quand *A. euteiches* est co-inoculé sur pois avec *F. redolens*, *F. avenaceum* et *F. solani* (Willsey et al. 2018). De manière plus surprenante, la co-inoculation de certaines souches non pathogènes de *F. solani* avec *A. euteiches* peut également aboutir à une augmentation de la gravité des symptômes (Peters & Grau 2002). Des effets antagonistes dus à des phénomènes de compétition entre les agents pathogènes sont également possibles (Jésus Junior et al. 2014). Ils ont par exemple déjà été constatés entre *F. oxysporum* f. sp. *pisi* et *D. pinodella* (Sagar & Sugha 1997). D'une manière générale, les mécanismes impliqués dans ces interactions entre les agents pathogènes du complexe parasitaire du pois ont été peu étudiés et sont encore largement méconnus. Ces interactions sont cependant fondamentales dans le développement de la maladie au cours de la culture du pois.

### **3.2 Contrôler un consortium d'agents pathogènes divers et ayant chacun des exigences écologiques particulières : un défi difficile à relever**

A ce jour, la plupart des stratégies de lutte contre le complexe parasitaire ont des effets limités sur le développement de la maladie. Elles sont présentées plus en détails dans l'annexe bibliographique de ce document (Annexe 1). Certains traitements chimiques, notamment à base de métalaxyl, toxique pour les *Pythium* spp., *F. avenaceum* ou encore *R. solani*, peuvent limiter la fonte des semis et améliorer la levée des plantules de pois, mais ils n'agissent pas sur les pourritures racinaires qui apparaissent à des stades plus avancés du développement du pois (Hwang et al. 2001, 2007 ; Chang et al. 2011 ; Silva et al. 2013).

Dans la plupart des cas, les traitements fongicides restent inopérants contre les oomycètes qui, phylogénétiquement plus proches des algues brunes que des champignons, disposent d'une composition pariétale et de voies biochimiques qui leur sont propres (Wakelin et al. 2002). D'une manière générale, ils sont indésirables en raison de leur toxicité et de leurs impacts négatifs sur l'environnement. La sélection variétale est une des options les plus prometteuses pour lutter contre la maladie. Certaines résistantes d'origine monogénique à différentes races de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* et à *Pythium* spp. sont déjà incluses dans des variétés commerciales de pois, y compris potager (Kraft et al. 1994 ; McPhee et al. 2012 ; Porter et al. 2014 ; Jain et al. 2015b). Plusieurs loci de caractères quantitatifs (QTL) contrôlant des résistances partielles à *F. solani* f. sp. *pisi* et *A. euteiches* ont également été caractérisés (Lavaud et al. 2016 ; Desgroux et al. 2018 ; Coyne et al. 2019 ; Williamson-Benavides et al. 2020). Toutefois, ils ne sont pas encore intégrés dans les lignées commerciales de pois. Enfin, les pratiques culturales, comme le drainage des terres, l'évitement de la compaction, l'ajout d'amendements organiques, et la modulation de la date de semis, peuvent réduire la sévérité de la maladie (Tu 1987, 1991 ; Bockus & Shroyer 1998 ; Pandey et al. 2006 ; Yu et al. 2013). Certaines de ces pratiques peuvent avoir un effet préventif. C'est le cas par exemple de la biofumigation qui consiste à utiliser l'effet fongicide ou fongistatique des isothiocyanates résultant de l'hydrolyse des glucosinolates contenus dans les parties végétatives des *Brassicaceae* (Steinberg et al. 2007). La biofumigation présente l'avantage d'être efficace contre la plupart des pathogènes du complexe parasitaire, mais ses effets toxiques sur la flore fongique indigène peuvent être un facteur limitant (Muehlchen et al. 1990 ; Smolinska et al.



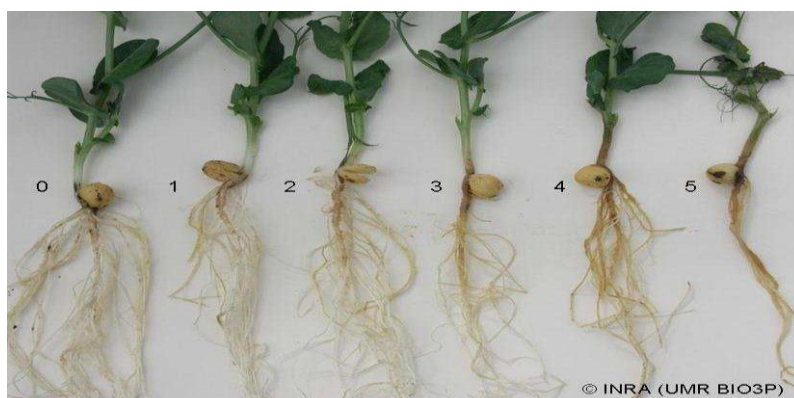
1997 ; Friberg et al. 2009 ; Hossain 2013). Seule la rotation longue des cultures est aujourd'hui utilisée avec efficacité. Elle permet de maintenir la qualité du sol et de prévenir le développement de l'inoculum pathogène (Bodker et al. 1993 ; Nayyar et al. 2009 ; Oyarzun et al. 1993). Elle nécessite toutefois d'utiliser des espèces non hôtes ou des variétés de légumineuses (de vesce ou de féverole) résistantes. Elle n'est par contre pas vraiment adaptée à certains agents pathogènes comme *T. basicola*, *R. solani* ou *F. avenaceum*, qui peuvent infester une gamme d'hôtes très large (Levenfors 2003 ; Fernandez et al. 2008). Ainsi, toutes ces approches, peu efficaces ou nécessitant encore un long travail de recherche, ne sont actuellement pas suffisantes pour assurer la maîtrise de la maladie. Il y a ainsi une réelle attente de la part des producteurs de pois de stratégies de lutte efficaces contre les pourritures racinaires du pois.

## **4. Les problématiques liées aux pourritures racinaires du pois potager en France**

### **4.1 Gestion du risque lié à *Aphanomyces euteiches***

*Aphanomyces euteiches* Drechs, détecté en France dès 1933 (Labrousse 1933), est considéré comme un problème important pour les cultures de pois depuis 1993 (Didelot & Chaillat 1995 ; Wicker & Rouxel 2001). Sous l'effet des subventions de la PAC à la production de pois protéagineux dans les années 1980, les superficies et la fréquence des cultures de pois dans les rotations culturales ont fortement augmenté et ont favorisé le développement de l'inoculum de cet agent pathogène dans les sols (Voisin et al. 2013). *A. euteiches* est depuis considéré comme la principale contrainte à la culture du pois en France. Il peut en effet entraîner des pertes de rendement considérables et la persistance de son inoculum dans les sols a fortement contribué à rendre la culture du pois moins compétitive que d'autres cultures comme les céréales (Gaulin et al. 2007 ; Voisin et al. 2013). Durant les 20 dernières années, il a ainsi retenu l'attention des chercheurs, des sélectionneurs et des producteurs qui ont cherché à développer des solutions pour contrôler la maladie (Wicker et al. 2001 ; Le May et al. 2018 ; Quillévéré-Hamard et al. 2018).

En l'absence d'autres méthodes de lutte efficaces contre *A. euteiches*, l'évitement des parcelles infestées est actuellement la seule option disponible pour éviter la maladie. La persistance des oospores d'*A. euteiches* dans les sols oblige toutefois à faire des rotations culturales de longue durée. En outre, le spectre d'hôtes assez large de cet agent pathogène au sein des légumineuses complique la gestion des rotations. Seules quelques espèces asymptomatiques comme le lupin ou des variétés résistantes de vesce, de féverole, ou de trèfle peuvent être utilisées sans risque important de multiplier l'inoculum d'*A. euteiches* (Moussart et al. 2008, 2013). Cette situation peut poser des problèmes de gestion des surfaces agricoles et notamment imposer leur extension. Ainsi pour être efficace, l'évitement des champs infestés nécessite l'identification des parcelles autorisant la culture du pois. A ce titre, un test permettant de prédire le risque d'apparition de la maladie a été mis au point afin de sélectionner au mieux les parcelles adaptées et ainsi d'optimiser le temps de rotation entre espèces sensibles. Il consiste à faire pousser dans du sol collecté en parcelle agricole des pois d'une variété sensible à *A. euteiches* dans des conditions contrôlées optimales à l'expression de ce pathogène (Moussart et al. 2009 ; Crosson & Moussart 2011). La lecture du test s'effectue après 15 jours de culture d'un pois dans le sol testé. L'importance des symptômes observés sur les racines est notée par un expérimentateur sur une échelle prédéfinie appelée Indice de Nécrose Racinaire (INR) (Figure 3 ; Wicker et al. 2001). La valeur moyenne obtenue entre plantes et répétitions biologiques est comparée à une valeur seuil préalablement définie en dessous de laquelle la culture du pois est possible et au-dessus de laquelle la culture du pois est déconseillée. Ce test est désormais recommandé par les instituts techniques avant de cultiver du pois protéagineux ou du pois potager (Terres Inovia 2021 ; UNILET 2021).



**Figure 3** : Echelle de notation des symptômes sur pois : indices de nécroses racinaires (INR) selon Wicker et al. (2001). 0 = aucun symptôme ; 1 = racines avec quelques lésions décolorées ou de couleur miel sur les radicelles ; 2 = zones décolorées ou de couleur miel couvrant au moins la moitié du système racinaire ; 3 = lésions de couleur miel couvrant au moins la moitié du système racinaire ; hypocotyle ou épicotyle décolorés et parfois imbibés d'eau ; 4 = la majeure partie du système racinaire de couleur miel à brun foncé et épicotyle ramolli ou brun ; 5 = plante morte.

Toutefois, les acteurs de la filière l'ayant adopté constatent souvent des problèmes de reproductibilité des résultats de ce test. La prédiction s'en trouve altérée ce qui amène à ne pas cultiver de pois dans des parcelles avec un état sanitaire satisfaisant ou au contraire à en cultiver dans des parcelles propices au développement de la maladie. Ce problème de reproductibilité pourrait être la conséquence d'un manque de représentativité de l'échantillon de sol utilisé pour effectuer la mesure. La stratégie d'échantillonnage actuellement appliquée consiste à réaliser un échantillon composite à partir de 15 à 20 prises d'environ 1,5 kg de sol prélevées le long d'une diagonale dans une parcelle de 5 ha au maximum (Crosson & Moussart 2011). Cependant, la maladie est connue pour apparaître sous forme de foyers de tailles variables dans les champs de pois (Kraft & Pflieger 2001). Cette distribution hétérogène d'*A. euteiches* dans les sols a été confirmée par des mesures spatialisées de la sévérité de la maladie sur une parcelle de pois (Moussart et al. 2009). L'échantillonnage en diagonale, pouvant passer entre les foyers infectieux, s'avère peu adapté à ce type de distribution hétérogène des agents pathogènes telluriques (Ophel-Keller et al. 2008 ; Poole et al. 2015 ; Wallenhammar et al. 2016). L'identification de stratégies d'échantillonnage représentatives de la distribution d'*A. euteiches* dans les sols est ainsi un axe d'amélioration important de la fiabilité de la prédiction (Gossen et al. 2017).

Une autre axe d'amélioration de la fiabilité de la prédiction concerne le développement de méthodes moléculaires pour la quantification directe de la densité d'inoculum de l'agent pathogène dans le sol (Gossen et al. 2017). Ce type d'outil représenterait une alternative précise, fiable et rapide aux tests biologiques. Cependant, *A. euteiches* ayant la capacité de causer des symptômes importants à de très faibles densités d'inoculum, le seuil de sensibilité de la méthode de quantification est un critère décisif pour sa validité. En se basant sur un test moléculaire ciblant une séquence d'ADN spécifique du génome d'*A. euteiches* développé pour quantifier l'agent pathogène *in planta* (Vandemark et al. 2000, 2002), Sauvage et al. (2007) ont proposé un test de PCR quantitative en temps réel (qPCR) pour quantifier les oospores d'*A. euteiches* dans le sol. Cependant, la limite de détection de cette méthode (200 oospores par gramme de sol), basée sur une séquence présente en copie unique dans le génome d'*A. euteiches*, s'est révélée trop élevée pour être applicable aux sols naturellement infestés. Une approche de qPCR ciblant la région multicopie internal transcribed spacer (ITS) 1 d'*A. euteiches* s'est montrée beaucoup plus sensible pour

atteindre une limite de détection estimée à 10 oospores par gramme de sol artificiellement inoculé (Gangneux et al. 2014). Une relation claire a été observée entre le nombre d'oospores d'*A. euteiches* inoculées et quantifiées par qPCR et la sévérité de la maladie sur pois, venant conforter des observations préalables (Bodker et al. 1993 ; Persson et al. 1999), et donc confirmer le caractère prédictif de la méthode. Cependant, cette relation n'a jamais été validée dans des conditions de terrain. Le développement d'une méthode de quantification suffisamment sensible pour être applicable de façon routinière à partir d'échantillons de sols naturellement infestés est ainsi un axe de travail à développer.

## **4.2 Au-delà d'*Aphanomyces euteiches*, un complexe parasitaire mal connu en France**

De manière étonnante, hormis *A. euteiches*, les autres composantes du complexe parasitaire du pois ont été négligées en France. Peu de recherches ont été effectuées au niveau national sur ces autres composantes du complexe parasitaire ainsi que sur leurs contributions respectives dans l'apparition et la gravité de la maladie. La présence d'autres symptômes, notamment de nécroses racinaires ou de flétrissements typiques de la présence de *Fusarium*, est pourtant fréquente dans les champs de pois. En outre, la présence d'agents parasites autres qu'*A. euteiches* et préjudiciables à la culture est connue des instituts techniques et des producteurs (Terres Inovia 2021). Dans les autres zones de cultures de pois à l'échelle mondiale, la composition du complexe parasitaire est bien plus étudiée (Tableau 1). En Europe du Nord notamment (Suède, Danemark et Pays-Bas), outre *A. euteiches*, plusieurs espèces de *Fusarium* telles que *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, et *F. avenaceum* sont reconnues comme des préoccupations importantes pour la production de pois (Oyarzun & Loon 1989 ; Oyarzun et al. 1993 ; Persson et al. 1997). En Allemagne, *D. pinodella*, *D. pinodes*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. redolens* et *F. avenaceum* ont été isolés avec une prévalence importante (Baćanović-Šišić et al. 2018 ; Šišić et al. 2020). Au Royaume-Uni, le complexe parasitaire serait limité à *F. oxysporum*, *F. solani* et *F. redolens* (Clarkson 1978 ; Jenkins 2018). En Amérique du Nord, *Fusarium solani*, *F. avenaceum* et *A. euteiches* semblent être les principales menaces pour la production de pois de grande culture (Feng et al. 2010 ; Chittem et al. 2015 ; Zitnick-Anderson & Pasche 2016 ; Taheri et al. 2017 ; Wu et al. 2018 ; Chatterton et al. 2019 ; Zitnick-Anderson et al. 2020). Ces travaux sur la connaissance de la composition du complexe parasitaire ont ouvert la voie à des recherches plus généralistes sur

les stratégies de management des pourritures racinaires, prenant en compte l'ensemble de ces différents agents pathogènes (Chang et al. 2013 ; Gossen et al. 2016). Une meilleure connaissance de la composition du complexe parasitaire en France serait aussi un prérequis pour pouvoir proposer des stratégies durables de gestion intégrée des pourritures racinaires du pois.

### **4.3 Le biocontrôle, une piste prometteuse pour le contrôle de la maladie**

Parallèlement à la gestion culturale et au développement de cultivars résistants aux différents agents pathogènes du complexe parasitaire du pois, la lutte biologique est une piste prometteuse. De par leur grande diversité taxonomique et fonctionnelle, les microorganismes du sol participent à de nombreuses régulations biologiques, y compris celles qui impliquent des agents phytopathogènes telluriques (Kibblewhite et al. 2008). C'est le cas en particulier de certains sols qualifiés de sols « résistant ». Si des paramètres abiotiques comme le calcium contribueraient à la résistance à *A. euteiches* de certains sol répertoriés en Suède, (Persson et al. 1999 ; Persson & Olsson 2000 ; Heyman 2008), des paramètres biotiques sont également impliqués dans la résistance des sols au développement des pourritures racinaires dues à *A. euteiches*, à *F. solani* f. sp. *pisi* ou à *T. basicola* (Castejon-Munoz & Oyarzun 1995 ; Worku & Gerhardson 1996 ; Oyarzun et al. 1997). Certains microorganismes isolés de ces sols, appartenant notamment à *Acremonium* spp., *F. oxysporum*, *Clonostachys rosea* (syn. *Gliocladium roseum*), *Penicillium* spp., et *Pseudomonas* spp. fluorescents, permettent de diminuer la sévérité de la maladie due à l'un ou l'autre des agents pathogènes du complexe (Castejon-Munoz & Oyarzun 1995 ; Oyarzun et al. 1998). Il apparaît donc intéressant d'identifier plus largement les communautés associées à la résistance de ces sols et les facteurs d'origine abiotique, dont les paramètres édaphiques et plus largement les pratiques culturales, modulant l'expression de la maladie. Ces informations permettraient d'une part d'identifier de nouveaux taxons candidats en biocontrôle mais également de définir des systèmes de culture plus aptes à prévenir le développement du complexe parasitaire.

Au-delà des sols résistants, de nombreux agents de biocontrôle microbiens d'origine fongique ou bactérienne, ont également montré des effets bénéfiques en réduisant les symptômes de pourritures racinaires du pois, en agissant contre un ou plusieurs agents du

complexe parasitaire. Ces agents de biocontrôle et leurs modes d'actions antagonistes sont décrits de façon plus exhaustive dans l'annexe 1. Ils comprennent notamment des bactéries dites « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » (PGPR) comme *R. leguminosarum*, qui promeuvent la croissance du pois et élicitent ses réactions de défenses. Ces bactéries PGPR sont des antagonistes connues de composantes du complexe parasitaire comme *Pythium* spp. (Bardin et al. 2004 ; Huang & Erickson 2007) et *F. solani* f. sp. *pisi* (Chakraborty & Chakraborty 1989) et représentent une piste intéressante pour le biocontrôle. De nombreuses bactéries des genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et de l'espèce *Burkholderia cepacia*, qui agissent par des mécanismes de compétition, d'antibiose, d'élicitation des défenses et de promotion de la croissance de la plante, ont également montré des effets positifs sur l'émergence du pois et la réduction de la pourriture des racines liée à *A. euteiches*, *Pythium* spp. ou *F. solani* f. sp. *pisi* (Parke 1991 ; Bowers & Parke 1993 ; Wakelin et al. 2002 ; Wang et al. 2003 ; Negi et al. 2008 ; Pieta & Pastucha 2008 ; Godebo et al. 2020 ; Riaz et al. 2021). Parmi les agents fongiques de biocontrôle, les champignons mycorhiziens à arbuscules du genre *Glomus* comme *G. mossae*, *G. fasciculatum* et *G. claroideum*, sont non seulement bénéfiques pour la nutrition de la plante, mais sont également des antagonistes connus d'*A. euteiches* chez le pois (Rosendahl 1985 ; Kjoller & Rosendahl 1996 ; Slezack et al. 2000 ; Thygesen et al. 2004). Des souches non pathogènes de *F. oxysporum*, qui élicitent la réponse immunitaire de la plante et entrent en compétition pour les ressources et pour la colonisation racinaire avec des souches pathogènes de *Fusarium*, sont également de bons candidats pour la lutte biologique (Alabouvette et al. 2009). Certaines souches se sont notamment révélées efficaces contre *F. solani* f. sp. *pisi* et *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, même dans les champs fortement infestés, ce qui a permis de diminuer la sévérité de la maladie et d'augmenter les rendements (Mandeeel 2006 ; Oyarzun et al. 1994). D'autres champignons appartenant aux genres *Trichoderma*, *Aspergillus*, et *Gliocladium* et à l'espèce *Clonostachys rosea* agissent généralement par plusieurs modes d'action comme la compétition, l'antibiose ou le mycoparasitisme et présentent l'avantage d'être antagonistes de nombreux agents du complexe parasitaire. Certaines souches de *T. harzianum*, *T. viride*, *A. niger* ou de *G. virens*, seuls, en association entre eux, ou en association avec des fongicides, ont ainsi montré des effets positifs contre différents agents pathogènes du complexe parasitaire du pois (Kumar & Dubey 2001 ; Jha & Jalali 2006 ; El-Mohamedy & El-Baky 2008 ; Hamid et al. 2012 ; Dandurand & Knudsen 1993 ; Hwang & Chakravarty 1993 ; Kapoor et al. 2006 ; Kim & Knudsen 2013 ; Ali et al. 2014 ; Jain et al. 2015a).

Enfin, certaines souches de *C. rosea*, notamment la souche ACM941, sont déjà commercialisées en Amérique du Nord pour leurs effets bénéfiques sur l'émergence du pois et la gravité des symptômes en cas d'infection par *A. euteiches* mais aussi par *F. solani* f. sp. *pisi* et *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Castejon-Munoz & Oyarzun 1995 ; Xue 2003a, 2003b).

Ce large panel de microorganismes et la diversité de leurs modes d'actions antagonistes apparaissent particulièrement bien adaptés à la gestion d'un complexe parasitaire composé d'espèces diverses aux caractéristiques physiologiques et écologiques variées. La colonisation des niches écologiques que constituent la rhizosphère, le rhizoplan et les racines du pois par un microorganisme antagoniste ou un consortia de microorganismes antagonistes des agents du complexe parasitaire laisse envisager la possibilité de les contrôler pour atténuer la sévérité de la maladie (Mazzola & Freilich 2017). Cependant, peu de ces organismes de biocontrôle ont dépassé le stade de la recherche et aucun n'est à ce jour homologué pour cet usage et commercialement disponible en France (DGAL/SASPP/2021-200).

## 5. Projet de recherche

Mon projet de thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe d'Ecologie des champignons phytopathogènes d'origine tellurique de l'UMR Agroécologie d'INRAE à Dijon et le Groupe Bonduelle. Il bénéficie pour cela d'un financement de la part de l'entreprise Bonduelle et d'une subvention de type CIFRE de l'ANRT (CIFRE n°2017/0852). Il a pour objectif de caractériser le complexe parasitaire composé de champignons et d'oomycètes d'origine tellurique responsables de pourritures racinaires chez le pois potager et de proposer des solutions de contrôle de cette maladie préoccupante dans le nord de la France, principale région productrice de pois. Mon projet de thèse s'articule pour cela autour de trois axes majeurs :

- Le premier axe est d'intérêt prophylactique. Il vise à développer un outil prédictif d'aide à la décision à destination des producteurs de pois quant aux risques de pourritures racinaires liés à *A. euteiches*. Il est divisé en deux objectifs complémentaires. Le premier est de développer une technique moléculaire pour la quantification de la Densité d'Inoculum (DI) d'*A. euteiches* dans les sols de parcelles

infestées (Chapitre I). Le deuxième objectif est de définir une stratégie d'échantillonnage adaptée à la distribution hétérogène d'*A. euteiches* dans les sols agricoles afin d'obtenir une méthode fiable de prédiction de son expression pathogène (Chapitre II).

- Le second axe de ma thèse vise à caractériser le complexe parasitaire responsable des pourritures racinaires du pois dans le nord de la France. Le premier objectif est d'identifier les agents pathogènes responsables de pourritures racinaires du pois dans le nord de la France via des isollements microbiologiques à partir de racines symptomatiques issues de larges campagnes d'échantillonnage conduites dans plus d'une vingtaine de parcelles de pois potager infestées (Chapitre III). Le second objectif, complémentaire au premier, est d'identifier plus largement les communautés de champignons et d'oomycètes associées aux racines de pois en utilisant une approche moléculaire de type metabarcoding (Chapitre IV). L'analyse comparative du rhizobiome de plantes symptomatiques et asymptomatiques dans chaque parcelle permettra de caractériser la diversité microbienne de façon plus exhaustive que via des isollements et d'identifier potentiellement d'autres taxons associés aux symptômes. De plus, la caractérisation des communautés microbiennes préférentiellement associées aux pois asymptomatiques ouvrira des pistes de recherches portant sur les taxons susceptibles d'héberger des candidats utilisables en lutte biologique.
- Le troisième axe porte sur une approche de lutte biologique par introduction d'agents de biocontrôle sélectionnés (Chapitre V). Il n'existe pas pour l'instant sur le marché de produits (microorganismes ou extraits végétaux) alléguant d'une action contre le complexe parasitaire des racines du pois, ni même d'agents de biocontrôle d'*A. euteiches*. C'est pourquoi la démarche consistera à choisir parmi les produits de biocontrôle actuellement disponibles sur le marché, ceux ayant des activités de bio-protection des plantes contre les oomycètes et les autres champignons du complexe parasitaire du pois. Les produits seront testés i) *in vitro* en boîtes de Petri pour leur aptitude à inhiber le développement d'agents pathogènes du complexe parasitaire, ii) en serre pour leur aptitude à prévenir l'infection du pois par les agents pathogènes du complexe parasitaire et iii) au champ en microparcelles expérimentales.





## CHAPITRE I

Évaluation du risque de pourritures racinaires dues  
à *Aphanomyces euteiches* : quantification de  
faibles densités d'inoculum dans les sols agricoles  
en utilisant la PCR digitale



## Avant-propos

---

*Aphanomyces euteiches* Drechs est un oomycète d'origine tellurique responsable de pourritures racinaires du pois. Cet agent pathogène, qui possède un large spectre d'hôtes parmi les légumineuses, est particulièrement préjudiciable pour les producteurs. La maladie qu'il cause conduit à des pertes de rendements importantes dans les cultures de pois et l'inoculum de cet agent pathogène peut persister dans les sols sur de longues périodes, parfois supérieures à 10 ans, rendant la parcelle impropre à la culture de légumineuses sensibles. Actuellement, il n'existe aucun pesticide efficace ni aucun cultivar de pois résistant à cet agent pathogène et l'évitement des parcelles infestées est la seule option envisageable. Un outil prédictif de gestion du risque d'apparition de la maladie, appelé « test *Aphanomyces* », a été développé afin de sélectionner au mieux les parcelles adaptées à la culture du pois et d'optimiser le délai de retour d'une espèce sensible à la maladie dans la rotation. Ce test est basé sur des bio-essais consistant à faire pousser, en conditions contrôlées optimales au développement de la maladie, des pois sensibles sur du sol collecté en parcelle. Ce test biologique, qui détermine un indice nécrotique racinaire (INR), est relativement long (15 jours), lourd à mettre en œuvre, non spécifique d'un agent pathogène donné et la variabilité autour des résultats proches de la valeur seuil d'aide à la décision de semer ou pas invite à rechercher un test plus précis. La mise en évidence d'une relation entre l'INR et la densité d'inoculum (DI) d'*A. euteiches* augure qu'un outil moléculaire rapide et spécifique, capable de mesurer la DI avec précision pourrait fournir un indicateur du risque approprié. L'objectif des travaux décrits dans ce chapitre est de développer cet outil de quantification moléculaire de la DI d'*A. euteiches* dans les sols de parcelles agricoles.

Un travail important visant au développement d'une technique de PCR quantitative en temps réel (qPCR) pour la quantification de la DI d'*A. euteiches* a initialement été réalisé (travail non présenté). Ce travail a été entrepris avec un jeu d'amorces ciblant de manière spécifique la région internal transcribed spacer (ITS) 1 d'*A. euteiches*. Ces amorces avaient été développées et testées avec succès lors d'une étude préalable sur des ADN de sols artificiellement inoculés en oospores (Gangneux et al. 2014). Malgré plusieurs mois de développement, les résultats obtenus par qPCR à partir d'ADN de sols de parcelles agricoles naturellement infestées par *A. euteiches* sont apparus peu reproductibles. Sont en cause un inoculum dispersé de manière trop hétérogène et d'une densité trop faible, flirtant avec la limite de détection de la méthode, ainsi qu'une sensibilité trop importante de la qPCR aux inhibitions de réaction PCR induites par des contaminants (acides humiques, composés phénoliques, argiles, etc) extraits du sol avec les ADN. Nous avons alors orienté notre travail vers le développement d'une méthode de quantification alternative à la qPCR, la PCR digitale (droplet digitale

PCR, ddPCR), réputée plus adaptée à la quantification de cibles rares et moins sujette aux inhibitions de réactions PCR. Nous avons tout d'abord mis au point la méthode de quantification par ddPCR sur ADN génomique d'*A. euteiches* et ADN de sols en utilisant en duplex deux jeux d'amorces et sondes ciblant respectivement la séquence multicopie ITS1 et une séquence unique spécifique d'*A. euteiches*. Nous avons également optimisé la méthode d'extraction d'ADN de sol afin de pouvoir obtenir une quantification reproductible de la séquence multicopie ITS1. Enfin, la méthode a été validée avec 200 échantillons de sol prélevés dans quatre parcelles naturellement infestées provenant du principal bassin de production de pois situé dans le nord de la France. L'analyse comparative de la densité en inoculum et de la sévérité de la maladie des 50 échantillons de sol de chacune des quatre parcelles a révélé une distribution non homogène de la population d'*A. euteiches* dans les sols, ce qui explique l'apparition de la maladie sous la forme de foyers dans les champs de pois. Une relation significative entre la sévérité des symptômes de pourriture racinaire déterminée *via* les bio-essais et la densité en inoculum d'*A. euteiches* quantifiée par ddPCR a été mise en évidence. Sur la base de cette relation significative, un modèle linéaire mixte a été proposé pour prédire la sévérité de la maladie à partir de la densité en inoculum.

Les résultats de ces travaux sont présentés dans ce chapitre. Ils ont également fait l'objet d'une publication dans la revue *European Journal of Plant Pathology* (<https://doi.org/10.1007/s10658-021-02325-5>).

## Risk assessment of *Aphanomyces euteiches* root rot disease: quantification of low inoculum densities in field soils using droplet digital PCR

(Article publié dans *European Journal of Plant Pathology*, doi : 10.1007/s10658-021-02325-5)

S. GIBERT<sup>1,2</sup>, V. EDEL-HERMANN<sup>1</sup>✉, R. MOUSSA MCOLO<sup>1</sup>, E. GAUTHERON<sup>1</sup>, J. MICHEL<sup>1</sup>, E. BERNAUD<sup>1</sup>, N. GAUTHERON<sup>1</sup>, J.-M. SOL<sup>2</sup>, G. CAPELLE<sup>2</sup>, R. GALLAND<sup>2</sup>, A. BARDON DEBATS<sup>2</sup>, C. LAMBERT<sup>2</sup>, C. STEINBERG<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Agroécologie, AgroSup Dijon, INRAE, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

<sup>2</sup> Société BONDUELLE SAS, Rue Nicolas Appert - BP 17, 59653 Villeneuve d'Ascq – CEDEX, France

✉ Corresponding author's e-mail address: [veronique.edel-hermann@inrae.fr](mailto:veronique.edel-hermann@inrae.fr)

### **Abstract**

*Aphanomyces euteiches* Drechs is a pathogenic soil-borne oomycete that causes root rot of legumes, one of the most serious diseases affecting legume production worldwide. There is currently no registered pesticide and no available resistant pea cultivar. Avoidance of infested fields based on disease risk assessment prior to pea sowing remains the main method available to manage the disease, but time-consuming bioassays are required to assess disease severity on susceptible plants grown in field soil samples. Direct quantification of *A. euteiches* inoculum in the soil by targeting multicopy genomic sequences of the internal transcribed spacer 1 with a qPCR-based method has been proposed as a rapid alternative for disease prediction. However, the method lacks sensitivity to accurately quantify low inoculum levels from naturally infested fields. We developed a suitable methodology based on droplet digital PCR (ddPCR) to quantify low *A. euteiches* inoculum levels in naturally infested soils. The methodology was validated on 200 soil samples taken from four naturally infested fields in the main pea cropping area in the north of France. The comparative analysis of inoculum density and disease severity of the 50 samples within each of the four fields revealed a non-homogeneous distribution of the *A. euteiches* population; this explains why the disease is visible in the form of foci. A significant relationship between pea root rot disease severity determined by bioassays and *A. euteiches* inoculum density was highlighted, and a linear mixed model is proposed to predict disease severity from inoculum density.

**Keywords:** *Aphanomyces euteiches*; droplet digital PCR; pea root rot; disease risk assessment; oospore; soil; inoculum density

## 1. Introduction

Root rot of legumes caused by the pathogenic soil-borne oomycete *Aphanomyces euteiches* Drechs is one of the most serious diseases in legume production worldwide. This pathogen is present in many legume-growing areas including North America (Holub et al., 1991; Wu et al., 2018), Europe (Oyarzun & van Loon 1989; Persson et al., 1997; Quillevere-Hamard et al., 2018), Oceania (Abbo & Irwin 1990; Manning & Menzies 1980) and Asia (Yokosawa et al., 1974).

*A. euteiches* infects different legume species such as pea (*Pisum sativum* L.; Jones & Drechsler 1925), lentil (*Lens culinaris*; Vandemark & Porter, 2010), alfalfa (*Medicago sativa*; Delwiche et al., 1987), green bean (*Phaseolus vulgaris*; Pfender & Hagedorn, 1982), faba bean (*Vicia faba*; Lamari & Bernier, 1985), subterranean clover (Greenhalgh et al., 1988), red clover (*Trifolium pratense*; Tofte, 1990) and common vetch (*Vicia sativa*; Tsvetkova & Guseva 1980). Its impact is particularly devastating on pea crops where it causes considerable yield losses (Gaulin et al., 2007).

The pathogen infects pea plants at any growth stage (Kraft & Pflieger, 2001). Initial symptoms appear in the form of yellowed to honey-brown spots on the roots. Lesions rapidly grow as the pathogen colonises the cortical tissues and then spreads through the taproot to the epicotyl that appears either softer or water-soaked. Other opportunistic organisms and root pathogens of the pea root rot complex such as *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Didymella* spp., *Rhizoctonia solani* or *Thielaviopsis basicola* may invade the lesions. This increases disease severity and leads to root darkening (Chang et al., 2017; Gossen et al., 2016; Kraft & Pflieger, 2001; Willsey et al., 2018). The destruction of the plant root cortex and feeding rootlets generally results in plant chlorosis, withering and sometimes premature death before pods are formed (Kraft and Pflieger 2001). In favourable conditions, oospores are formed in infested roots by sexual reproduction a few days after infection (Cunningham & Hagedorn, 1962). After plant death, oospores are dispersed heterogeneously *via* decomposing host tissues and are released in the soil. *A. euteiches* mycelium does not live as a saprophyte within dead plants, and oospores are the persistent form of the pathogen in the soil where they serve as primary inoculum (Kjoller & Rosendahl, 1998; Kraft & Pflieger, 2001; Schren, 1960). Their thick wall makes them resistant to drought and temperature fluctuations and allows them to survive more than 10 years in the soil (Papavizas & Ayers, 1974). Oospores germinate under the influence of root exudates from a nearby host plant, and form a zoosporangium. The

zoosporangium releases more than 300 motile zoospores that reach the host roots by chemotactic attraction and get encysted on the rhizoplane, and a new infection cycle starts (Gaulin et al., 2007). Environmental conditions such as high soil moisture, poor drainage or soil compaction increase disease proliferation by favouring the movement of the motile zoospores toward plant roots in the moisture film surrounding soil particles (Wu et al., 2018).

Disease management is difficult because no effective option for *A. euteiches* control is presently available. Only a few pesticides are effective but they are either prohibited or undesirable in most pea-growing areas because of their toxicity and negative environmental impacts (Gaulin et al., 2007; Wu et al., 2018). Some biocontrol agents such as arbuscular mycorrhizal fungi, *Clonostachys rosea*, *Pseudomonas fluorescens*, and species belonging to the *Burkholderia cepacia* complex associated or not with seed treatment have shown interesting effects on pea emergence and root rot severity (Wu et al., 2018), but their large-scale use under field conditions remains hypothetical. Genetic selection of resistant pea varieties is a promising control option. Several quantitative trait loci (QTL) controlling partial resistance and valuable in pea breeding programs have been reported, but no resistant pea cultivar is available yet (Desgroux et al., 2016; Lavaud et al., 2015).

Avoidance of infested fields and crop rotation remain the only ways to manage the disease to date. Due to the *A. euteiches* life cycle, the frequency of susceptible legume crops is directly correlated to the inoculum increment in the soil and in turn to the increased incidence and severity of root rot disease on the next susceptible crop (Bodker et al., 1993; Chan & Close, 1987; Oyarzun et al., 1993). Rotations replacing susceptible plants by non-host species or resistant cultivars belonging to vetch or faba bean species contribute effectively to decrease the soil inoculum potential (IP) (Moussart et al., 2013). However, a limitation of this cropping management practice is the need for long-term rotations due to the survival of *A. euteiches* oospores in the soil for years coupled to the broad range of host species and susceptible cultivars that should be excluded from the rotation. This results in an increasing need for new cropping areas with a sufficiently safe low infestation level, a hard task for pea producers.

To be effective, avoidance of infested fields requires identifying suitable plots for pea cropping. Several methods based on disease severity indexing or IP measurements from field soil samples have been proposed (Chan & Close, 1987; Malvick et al., 1994; Pfender et al., 1981; Reiling et al., 1960; Sherwood & Hagedorn, 1958). In France, a specific test has been



developed; this test uses bioassays to measure disease severity in optimal conditions for its expression on susceptible pea plants grown in field soil samples has been developed. Due to a linear relationship between the bioassay results and disease severity in the field, this test is now recommended by most stakeholders of the sector (Moussart et al., 2009).

Bioassay-based methods are technically simple and predictive, but they are also burdensome, time consuming and not specific to a single pathogen. The direct quantification of *A. euteiches* inoculum in the soil by a molecular method could be a specific, accurate, reliable and faster alternative for disease prediction. Sauvage et al. (2007) proposed a real-time quantitative PCR (qPCR) assay to quantify *A. euteiches* oospores in the soil. However, this method originally developed for *in planta* quantification (Vandemark et al., 2002; 2000) was based on the detection of a DNA sequence specific to *A. euteiches* but present in a single copy in its genome, so that the limit of detection was 200 oospores *per* gram of soil. Gangneux et al. (2014) developed a more sensitive qPCR approach by targeting the multicopy ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) region of *A. euteiches*. This multicopy DNA target allowed for the detection of 10 oospores *per* gram of artificially inoculated soil (Gangneux et al., 2014). A clear relationship between disease severity on susceptible pea plants and oospore density was established in both approaches conducted in artificially inoculated soils, and was proposed to predict disease severity using oospore quantification. However, this relationship was not validated in field conditions.

Considering the heterogeneous distribution of *A. euteiches* in naturally infested agricultural bulk soils and its ability to trigger severe infection from very low inoculum levels, the sensitivity threshold of the method is decisive for a routine use of molecular quantification to predict pea root rot disease. The sensitivity of a qPCR approach with a detection limit of 10 oospores *per* gram of soil is insufficient to obtain a reliable measure from low infested field soil samples (Heyman, 2008). Moreover, qPCR is subject to inhibition by soil substances such as humic acids, phenolic compounds, heavy metals or clay particles that are difficult to get rid of during DNA extraction and purification (Albers et al., 2013; Matheson et al., 2010).

Droplet digital PCR (ddPCR) is a highly sensitive and well adapted accurate tool for quantifying rare DNA targets (Hindson et al., 2011). This method is based on the partitioning of the PCR mixture into 20,000 individual droplets that randomly distribute the targets and the background DNA among them. An endpoint PCR amplification occurs in each positive

droplet containing the target. Poisson calculation of the ratio between the positive and negative droplets gives an accurate and absolute target quantification without requiring an external standard curve. Moreover, ddPCR is less subject to PCR inhibition by soil residues compared to qPCR (Racki et al., 2014; Wood et al., 2019). This way, the quantity of soil DNA matrix in the PCR mix can be increased, and this significantly improves the sensitivity of the method. Thus, quantification accuracy and resistance to PCR inhibitors make ddPCR a good candidate for the quantification of low microbial inocula in the soil (Gossen et al., 2019; Liu et al., 2020; Maldonado-Gonzalez et al., 2020; Wen et al., 2020).

The objective of the present study is to propose a suitable method to quantify *A. euteiches* inoculum density (ID) in naturally infested field soils to improve risk assessment of *A. euteiches* root rot disease. This work was carried out in three steps: (a) we developed an accurate and sensitive duplex ddPCR approach to quantify multicopy ITS1 and single-copy *A. euteiches* sequences in soil DNA; (b) we optimised the DNA extraction method (soil quantity and homogenisation) to obtain a reproducible measure; (c) we validated the suitability and the predictivity of the ddPCR method by characterising the relationship between the ID measured by ddPCR and disease severity in naturally infested soil samples.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Field characteristics and soil sampling

The study focused on the legume production basin of the Haut-de-France region (France). Four fields were chosen based on the established presence of *A. euteiches*-infected peas in the recent historical cropping record. Two highly infested fields, named Renescure and Verpillieres, are located in the north and in the south of the production basin, respectively, and were sampled in October 2017 (Table 2). Two low infested fields named Woestyne and Flers are located in the north and in the south of the production basin, respectively, and were sampled in November 2018. The historical cropping record of each plot was recorded with the farmers, and their respective GPS coordinates were scored with grower's agreement (Table 2). A 1-ha plot divided into 50 contiguous 14.14 m by 14.14 m quadrats was georeferenced in each of the four fields. Four L of soil were collected systematically with a spade at the centre of each quadrat at -5 cm to -20 cm depth and transferred into plastic boxes. The spade was cleaned with absorbent paper and disinfested with 70% ethanol between two samplings. The soil samples were brought to the laboratory and air dried at room temperature (20 °C) for at least eight days. The dried samples were sieved through a 4 mm mesh and mixed by hand to homogenise them. Subsamples made of 60 mL of each sieved soil intended for molecular analyses were lyophilised and stored at -20 °C. The remaining sieved samples intended for bioassays and physico-chemical analyses were temporarily stored in plastic boxes in a room at 18 °C.

Soil physico-chemical properties were determined on ten soil samples out of the 50 samples from each field by the accredited INRAE Soil Analysis Laboratory (Arras, France) according to international (ISO) or French (NF) standardised methods. The samples were first ground to particle sizes < 250 µm and prepared, and particle-size distribution, pH in water, total calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>), organic carbon (C), organic matter (OM), nitrogen (N) and phosphorus (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - Olsen method) were analysed. The mean value of each physico-chemical parameter of the ten soil samples *per* field was calculated (Table 3).

**Table 2** : Geographic coordinates, areas and historical cropping records of the Renescure, Verpillieres, Woestyne and Flers fields.

Field name	Geographic coordinates	Field area (ha)	Sampling date	Tillage	Historical cropping record						
					2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Renescure	50°44'34.4"N 2°21'45.2"E	18.1	oct-17	No till	Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	Bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )*	Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	Flax ( <i>Linum usitatissimum</i> )	Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	Pea cv. Firenza ( <i>Pisum sativum</i> )*	/
Verpilliere	49°39'52.7"N 2°47'42.6"E	4.85	oct-17	Till	Spring barley ( <i>Hordeum vulgare</i> )	Corn ( <i>Zea mays</i> )	Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	Sugar beet ( <i>Beta vulgaris</i> )	Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	Pea cv. Style ( <i>Pisum sativum</i> )*	/
Woestyne	50°44'55.7"N 2°23'04.1"E	29	nov-18	No till	Bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )*	Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	Sugar beet ( <i>Beta vulgaris</i> )	Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	Flax ( <i>Linum usitatissimum</i> )	Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	Pea cv. Messenger ( <i>Pisum sativum</i> )*
Flers	50°03'17.5"N 2°48'52.7"E	12	nov-18	Till	Corn ( <i>Zea mays</i> )	Pea cv. Messenger ( <i>Pisum sativum</i> )*	Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	Sugar beet ( <i>Beta vulgaris</i> )	Potato ( <i>Solanum tuberosum</i> )	Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )

\*Legume species susceptible to *Aphanomyces euteiches*.

**Table 3** : Field soil textures and main physico-chemical parameters.

Field name	Texture				Physico-chemistry						
	Type	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	pH	C (g · Kg <sup>-1</sup> )	N (g · kg <sup>-1</sup> )	C/N	OM (g · Kg <sup>-1</sup> )	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg · Kg <sup>-1</sup> )	CaCO <sub>3</sub> (g · Kg <sup>-1</sup> )
Renescure	Silty clay loam	30	62	8	5.7	25.7	2.9	8.8	44.4	75	< 1
Verpilliere	Silt loam	17	67	16	7	11.4	1.14	9.9	19.7	61	< 1
Woestyne	Silt loam	22	67	11	7.1	19.1	2.1	8.9	33.1	218	< 1.2
Flers	Silt loam	19	74	7	7.4	10.1	1.1	8.9	17.5	108	< 1.4

## 2.2 Disease severity assessment

Disease severity was assessed for each soil sample in a greenhouse bioassay using an *A. euteiches*-susceptible pea cultivar (cv. Kayanne, KWS, France) and optimal conditions to favour infection according to Moussart et al. (2009). One-L pots containing 700 mL of sieved soil were used. Pea seeds were disinfected in a sodium hypochlorite solution (1.5 g.L<sup>-1</sup> of available Cl<sub>2</sub>) for 20 min, rinsed three times with sterile deionised water, and hydrated in sterile deionised water for 12 h before sowing. Nine seeds were sown *per pot* and *per soil* for the soils collected in 2017 (Renescure and Verpillieres fields). For the two naturally low infested soils collected in November 2018 (Woestyne and Flers fields), the protocol was modified to improve the sensitivity of detection and quantification of a low level of root rot disease. Five pea seeds were sown in each pot *per soil sample*, in triplicate. All pots were placed in a greenhouse for 14 days and were watered daily to maintain a high soil moisture. Greenhouse conditions were 80 ± 10% humidity, with a thermoperiod of 25 °C day/23 °C night and a photoperiod of 16 h light (with extra light intensity of 160 μE s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>) / 8 h dark. Plants were removed from the pots after 14 days, and the roots were delicately washed under running tap water. A disease severity score was determined for each plant by visual assessment of root symptoms evaluated on a 0-5 scale (Moussart et al., 2009): 0 = no symptom; 1 = roots with a few discoloured to honey-coloured lesions on rootlets; 2 = discoloured to honey-brown zones covering at least half of the root system; 3 = honey-brown lesions covering at least half of the root system; hypocotyl or epicotyl discoloured and water-soaked in some cases; 4 = most of the root system honey-brown to dark brown and epicotyl softened or brown; 5 = dead plant. Aborted plants were considered as non-available (NA) values. A disease severity index (DSI) was defined as the mean value of the disease severity scores of all plants in one pot. For the Woestyne and Flers field soil samples, the mean value of the three pots was calculated for each soil sample.

## 2.3 Presence of *Aphanomyces euteiches* in symptomatic roots

The presence of *A. euteiches* in symptomatic roots recovered from the bioassay was determined with a duplex PCR test using the *A. euteiches*-specific primer pairs Ae\_ITS1\_39F / Ae\_ITS1\_167R and Ae\_76bp\_136\_F / Ae\_76bp\_211\_R designed by Gangneux et al. (2014) and Vandemark et al. (2000), respectively (Table 4). Symptomatic roots of five soil samples *per soil*

were chosen so that a large DSI range from 0.58 to 4.25 was represented. Asymptomatic roots (DSI = 0) from two soil samples from the Woestyne and Flers fields were used as negative controls, and DNA from *A. euteiches* reference strain RB84 (Wicker et al., 2001) was used as a positive control. DNA was extracted from 50 mg of root tissue or from 50 mg of mycelium of strain RB84 using a FastDNA® SPIN kit (MP Biomedicals, Eschwege, Germany) according to the manufacturer's recommendations. DNA extracts were stored at -20 °C until PCR analyses. Duplex PCRs were performed in 25- $\mu$ L reaction mixtures containing 150  $\mu$ M of dNTPs, 0.3  $\mu$ M of each primer, 3 U of *Taq* polymerase (MP Biomedicals), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ L of DNA, and PCR buffer. The reactions were initiated with a 3 min incubation at 95 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 60 °C, 1 min at 72 °C, and a final extension of 10 min at 72 °C. PCR products were checked by agarose gel electrophoresis.

## **2.4 Isolation and molecular identification of oomycetes, and characterisation of their pathogenicity**

Oomycetes were isolated from one pea root bunch showing typical *A. euteiches* honey-brown symptoms *per* soil sample. Symptomatic roots were disinfected in 70 % ethanol for 10 s, rinsed in sterile deionised water, and dried on sterile filter paper. Three 10-mm root fragments were excised and plated onto semi-selective corn meal agar medium (CMA, 10 g.L<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) added with agar (10 g.L<sup>-1</sup>, Conda, Madrid, Spain), metalaxyl (30 mg.L<sup>-1</sup>), benomyl (5 mg.L<sup>-1</sup>) and rifampicin (25 mg.L<sup>-1</sup>) (CMA-MBR, Malvick et al., 1994), and incubated at 25 °C for 48 h. One colony *per* morphotype showing cœnocytic hyphae was subcultured onto CMA medium. All the cultures were maintained at 4 °C on CMA and in tubes containing 10 sterilised hemp seeds and 10 mL of deionised water for long-term storage in the Microorganisms of Interest for Agriculture and Environment (MIAE) collection (INRAE Dijon, France). Isolates from each field were chosen so as to be representative of morphotype diversity for further identification and pathogenicity assessment. Each isolate was cultured at 25 °C on potato dextrose agar (PDA, 39 g.L<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich) plates for 15 days, and the mycelium was scraped directly from the agar plates. Fifty mg of mycelium were used for DNA extraction using a FastDNA® SPIN kit according to the manufacturer's recommendations. DNA extracts were stored at -20 °C until PCR analyses. The ITS region was amplified by PCR using primers ITS-6 and ITS-4 (Cooke et al., 2000; White et al., 1990; Table 4). The mitochondrial encoded gene cytochrome c oxidase subunit I (COI, *COX1*)

was used to further identify *Pythium* isolates at the species level using the OomCoxI-Levup and Fm85mod primers (Robideau et al., 2011, Table 4). PCRs were performed in 25- $\mu$ L reaction mixtures with the same composition as above. PCRs were initiated with a 3-min incubation at 94 °C followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 50 °C for ITS amplification or 1 min at 55°C for COI amplification, 1 min at 72 °C, and a final extension of 10 min at 72 °C. PCR products were visualised on 2 % agarose gels, and sent to Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Germany) for Sanger sequencing in forward and reverse directions using the PCR primers as sequencing primers. For each PCR product, sequences from both strands were assembled using SEQMAN 6.0 (DNASTAR Lasergene, GATC Biotech). Sequence identities were determined using BLAST analysis from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Taxonomic identification was based on the sequence similarity of the amplified ITS or COXI region with sequences available in the database and associated with a publication. The sequences were deposited in GenBank (GenBank accession numbers MZ027692 to MZ027703 and MZ054442 to MZ054448).

The pathogenicity of the identified isolates was assessed *in vitro*. The *A. euteiches* RB84 reference strain was used as a positive control. Pea seeds (cv. Firenza, Vilmorin, France) were disinfected in a sodium hypochlorite solution (1.5 g.L<sup>-1</sup> available Cl<sub>2</sub>) for 20 min, rinsed three times in sterile deionised water, and plated onto PDA until germination. Germinated seeds without apparent contamination symptoms were transferred into sterile glass tubes (20 cm deep, 3 cm diameter) containing 30 mL of Hoagland's No.2 Basalt salt mixture (1.6 g.L<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) added with 8 g.L<sup>-1</sup> agar (Conda) and inoculated at t = 7 days post germination with a total of 10<sup>5</sup> zoospores using a water-zoospore suspension. Eight tubes *per* isolate were prepared. Symptoms were assessed 14 days later using the previously described scale.

## 2.5 Optimisation of DNA extraction from field soils

Homogenisation of field soil samples and different soil quantities for DNA extraction were assessed to obtain reproducible ddPCR measurements from naturally infested soil samples. Two hundred and fifty g of two naturally infested soil from Verpillieres (sample V141) and Renescure (sample R63) were sieved (4 mm mesh), or sieved and mechanically milled with a blender (Waring Laboratory Blender, Sigma) using 4 runs of 5 s at maximum speed separated

by 10 s breaks. Soil DNA extractions were performed using an adapted procedure of the GnS-GII protocol described by Plassart et al. (2012) on 1 g, 2 g and 5 g of sieved soil samples, and 1 g, 2 g and 5 g of sieved and milled soil samples, with 6 replicates in each case. A lysing matrix containing 4 g of 0.1-mm diameter silica beads (Lysing matrix B bulk, MP-Biomedicals, New York, USA), 5 g of 1.4-mm diameter ceramic beads (Lysing matrix D bulk, MP-Biomedicals), four 4-mm diameter glass beads and 8 mL of lysis buffer containing 100 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM EDTA (pH 8), 100 mM NaCl, 2 % SDS and ultra-pure water were added to each 1-g soil sample. The quantities of lysing matrix and lysis buffer were increased proportionally to the soil quantity for the 2-g and 5-g soil samples. Total DNA was extracted by mechanical lysis using FastPrep-24™ Classic Instrument (MP-Biomedicals). DNA was purified with a NucleoSpin® Soil kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's recommendations. DNA samples were eluted in 60 µL of SE elution buffer of the NucleoSpin® Soil kit and stored at -20 °C until analyses. Purified DNA samples were quantified by fluorometry using a QuantiFluor staining kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) and a TECAN system according to the manufacturer's instructions. DNA samples were analysed using the optimised ddPCR conditions described below, in the presence or in the absence of *EcoRI*. The optimised procedure was used to extract DNA from the 200 soil samples, in triplicate.

## **2.6 Development and optimisation of a droplet digital PCR assay to quantify *Aphanomyces euteiches* in field soil samples**

A duplex TaqMan approach was used to quantify two *A. euteiches*-specific DNA fragments. The first target was a 132-bp sequence of *A. euteiches* ITS1 (Ae\_ITS1) present in multicopy in the genome of *A. euteiches* and appropriate to quantify low inoculum levels in the soil (Gangneux et al., 2014). PCR primers Ae\_ITS1\_39F and Ae\_ITS1\_167R proposed by Gangneux et al. (2014) were used to amplify this target (Table 4). A TaqMan fluorogenic probe (Ae\_ITS1\_39T) was designed to be specific to this sequence. The specificity and identity of the probe with the targeted sequence were verified using BLASTN program (NCBI). Blast results with 100 % of similarity with the probe corresponded exclusively to *A. euteiches* ITS sequences. Sequences of organisms other than *A. euteiches* that matched the probe had only 96 % of similarity or less with the probe. The second target was a 76-bp fragment (Ae\_76bp) present in a single copy in the haploid genome of *A. euteiches* (Vandemark et al., 2000; 2002).



It was used to approximate the ITS1 copy number in *A. euteiches* genomic DNA. PCR primers Ae\_76bp\_136\_F and Ae\_76bp\_211\_R (Vandemark et al., 2000; 2002) and probe Ae\_76bp\_161T (Sauvage et al., 2007) were used to target and quantify this fragment (Table 4).

The ddPCR assay was optimised by testing different amounts of soil, whether milled or not (see above), different amounts of DNA, and in the presence or absence of restriction enzymes in the ddPCR mixture. Total DNA was extracted from 2 g of milled samples from Verpillieres soil (sample V45) and Renescure soil (sample R125) infested by *A. euteiches*, using the procedure described above. Fifty ng, 100 ng and 200 ng of DNA from these two soil samples were tested for ddPCR, with five replicates *per* sample. The *EcoR1* and *Sal1* restriction enzymes were tested on three replicates of the same DNA samples and quantities in order to cut *A. euteiches* DNA between the tandem repeats of operons of ribosomal RNA-encoding genes and allow for a random distribution of the Ae ITS1 target among the droplets. The absence of *EcoR1* and *Sal1* restriction sites inside the Ae ITS1 and Ae\_76bp sequences was previously checked.

ddPCR were performed in 22- $\mu$ L mixtures containing 11  $\mu$ L of ddPCR supermix for probes (no dUTP) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 900 nM of each primer, 250 nM of each probe, 1 U of restriction enzyme *EcoRI* or *SalI* or no restriction enzyme, and variable quantities of template DNA. Twenty  $\mu$ L of the PCR mixture were pipetted into the sample chambers of a Droplet Generator DG8 Cartridge (Bio-Rad, cat no. 1864008), added with 60  $\mu$ L of droplet generation oil (Bio-Rad, Cat No. 1863005) and placed in the QX100 Droplet Generator (Bio-Rad) for droplet generation. Forty  $\mu$ L of created droplets were transferred into a 96-well ddPCR plate (Bio-Rad, cat no. 12001925), sealed with a heat seal foil for PCR plates (Bio-Rad, cat no. 1814040), and transferred to a T100 thermal cycler (Bio-Rad) for amplification. For each ddPCR plate run, at least two no-template controls (containing DNA-free water instead of soil DNA) and two positive controls (containing 5 ng of *A. euteiches* genomic DNA) were used. Thermal cycling conditions consisted of initial denaturation and DNA polymerase activation at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s for denaturation and 60 °C for 1 min for hybridisation and elongation (ramp 2 °C s<sup>-1</sup>), and a final step at 98 °C for 10 min for droplet stabilisation. ddPCR were performed using the Bio-Rad QX100 ddPCR system at the DTAMB platform of Claude Bernard Lyon 1 University (Développement de Techniques et Analyse Moléculaire de la Biodiversité, Villeurbanne, France). The optimised ddPCR assay was

performed on DNA extracts from the 200 soil samples in triplicate.

**Table 4** : Primers and probes used in this study.

Target (use)	Primer/probe	Nucleotide sequence	Reference
Ae_ITS1 specific of <i>A. euteiches</i> (ddPCR - 132bp multicopy sequence per haploid genome)	Forward primer Ae_ITS1_39F	5'- TGAGGCTTGTGCTCTTTTCA - 3'	Gangneux et al., 2014
	Reverse primer Ae_ITS1_167R	5'- GAAAGTTGATAGAATTGACAAGCT-3'	Gangneux et al., 2014
	Probe Ae_ITS1_39T	5' - /56 FAM/GCAAGGAAC/ZEN/CGATGTAATTTTTAATCCCT/3IABkFQ/- 3'	This study
Ae_76bp sequence specific of <i>A. euteiches</i> (ddPCR - 76bp single copy sequence per haploid genome)	Forward primer Ae_76bp_136_F	5'- GACTGCAATGTCGTCGAAGACTT - 3'	Vandemark et al., 2000, 2002
	Reverse primer Ae_76bp_211_R	5' - ACAAGCTGAGATGAAGAGA TCGA - 3'	Vandemark et al., 2000, 2002
	Probe Ae_76bp_161T	5'-/5Hex/CAACCACCG/ZEN/AGCGAGCCGC/3IABkFQ/-3'	Sauvage et al., 2007
Internal transcribed spacer 1 (oomycete identification)	Forward primer ITS-6	5'- GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3'	Cooke et al., 2000
	Reverse primer ITS-4	5'-TCCTCCG CTTATTGATATGC - 3'	White et al., 1990
Cytochrome c oxidase subunit I (COI) (oomycete identification)	Forward primer OomCoxI-Levup	5'-TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC-3'	Robideau et al., 2011
	Reverse primer Fm85mod	5'-RRHWACKTGACTDATRATACCAAA-3'	Robideau et al., 2011

## 2.7 ddPCR analysis

QuantaSoft Analysis Pro software version 1.0.596 (Bio-Rad) was used to analyse ddPCR results. The threshold for the classification of droplets as positive or negative was set manually above the cluster of negative partitions for all DNA samples at amplitudes around 900 for the Ae\_ITS1 target (Channel 1, fluorescein [FAM]) and around 1450 for the Ae\_76bp target (Channel 2, hexachlorofluorescein [HEX]). Results were obtained as number of targeted copies *per*  $\mu\text{L}$  of reaction mixture and were first converted into number of copies *per* ng of soil DNA. To standardise and compare *A. euteiches* abundance in the fields, results were then converted into number of diploid genomes *per* gram of dry field soil based on the quantity of extracted DNA and on the mean number of Ae\_ITS1 copies *per* haploid genome in the *A. euteiches* population of each field (see below).

## 2.8 Assessment of ITS1 copy numbers *per* haploid genome of *Aphanomyces euteiches*

The number of ITS1 copy numbers *per* haploid genome was assessed for one or two *A. euteiches* isolates collected from each field. *A. euteiches* genomic DNA was extracted and quantified using the previously described protocols. Duplex ddPCRs were performed using the primer sets and methodology described above on a dilution series from 2.5 ng to 0.625 ng of genomic DNA, in triplicate. A dilution level inside the recommended dynamic range from 1 to 120,000 copies of each target *per* 20- $\mu\text{L}$  reaction mixture (Digital Droplet PCR Application Guide, Bio-Rad) was selected for each isolate. The ratio of the mean copy number of Ae\_ITS1 to the mean copy number of Ae\_76bp was calculated for each isolate. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation following three independent measurements.

The mean number of Ae\_ITS1 sequences *per* *A. euteiches* haploid genome was estimated for each field directly from the ddPCR results, following the analysis of the DNA extracted from the 200 field samples. For each field and for each replicate, the ratio of the sum of Ae\_ITS1 copies to the sum of Ae\_76bp copies detected in all samples (n=50) was calculated according to the formula:

$$N_{\text{ITS1}} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{\sum_{i=1}^n Y_i}$$

where  $N_{ITS}$  is the mean number of Ae\_ITS1 sequences *per* haploid genome in the *A. euteiches* field population,  $n$  is the number of soil samples analysed by duplex ddPCR,  $x$  is the number of Ae\_ITS1 copies detected in each sample, and  $y$  is the number of Ae\_176bp copies detected in each sample. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of the three replicates.

## 2.9 Statistical analyses

All statistical analyses were conducted and visualised using R statistical software version 4.0.1 for Windows (R Core Team 2020, Online Resource 1). The readxl package V1.3.1 and the tidyverse package v1.3.0 were used to import and to analyse the dataset (Wickam & Brian, 2019; Wickham et al., 2019). The packages ggplot2 v3.3.2, cowplot v1.1.0 and lemon v0.4.5 were used for data visualisation and graphic constructions (Edward, 2020; Wickham, 2016; Wilke, 2020). Variability among conditions was compared graphically using coefficients of variation (CVs) and tested using the Brown-Forsythe test with the leveneTest function of the package lawstat v3.4 (Gastwirth et al., 2020) to optimise DNA extraction and ddPCR.

To compare our results with previous studies and with pea-producing stakeholder practices, the bounded pseudo-quantitative DSI variable defined by Moussart et al. (2009) was treated as a quantitative variable. Spearman Rho coefficient was calculated, and non-parametric locally weighted scatterplot smoothing regression (LOESS) was used to illustrate the monotonic relationship between DSI and *A. euteiches* soil-borne ID in each field. Due to their heavy influence on LOESS regression results, 2 points above 125 diploid genomes.g<sup>-1</sup> of dry field soil, corresponding to soil samples R1 and W5, were considered as outliers and removed from this analysis.

The lmer function in R package lme4 (Bates et al., 2015) was used to apply linear mixed models to test the effect of *A. euteiches* ID on the DSI response variable measured on the field soils. Models were fitted using the restricted maximum likelihood (REML) method and compared based on Akaike information criterion (AIC) and Bayesian information criterion (BIC) using the maximum likelihood (ML) estimation method. The selected model was under the form:

$$\text{logit} ( \text{DSI} / 5 ) = ( b_{\text{intercept}} + b_{\text{field}} ) + b_{\text{ID}} \cdot \log_{10} ( \text{ID} + 1 ) + \epsilon$$

where DSI and ID represent the mean DSI values and ID values within technical replicates,

respectively,  $b_{\text{intercept}}$ ,  $b_{\text{ID}}$  and  $b_{\text{field}}$  represent the coefficients of the model (the intercept, the slope and the field random-effects coefficients, respectively), and  $\epsilon$  represents the model residuals with  $\epsilon \sim N(0, \sigma)$ .

DSI and ID were logit and log-10 transformed, respectively, for linearisation. DSI values of 0 were adjusted to 0.025 using the logit function in the car package (Fox & Weisberg, 2019). Outlier data were removed from the dataset based on Cook's distance. The model residuals were tested for assumptions of independency, homogeneity of variance and normality using Shapiro test and graphical analyses. The r.squaredLR function of the Mumin package (Barton, 2020) was used to calculate the pseudo- $R^2$  of the model (Nagelkerke adjusted). The model parameters and quality criteria were formatted using the stargazer package v5.2.1 (Hlavac, 2018). The predict function of the lme4 package was used for DSI predictions (with the re.form argument set to NULL for predictions conditional on field random-effects, and set to NA for predictions made at the field population level (i.e. unconditional)) (Bates et al., 2015). The predict and bootMer functions of the lme4 package were used to define the confidence interval of the model (Bates et al., 2015).

## 3. Results

### 3.1 Disease severity measured on field soil samples

Typical *A. euteiches* symptoms were observed on pea seedlings grown on soil samples from each field. However, symptoms sometimes turned darker, indicating that other pathogens potentially colonised the root systems. A high proportion of seedlings grown on the Woestyne (27.1 %) and Flers (20.7 %) soil samples underwent damping-off or aborted before emergence. These damping-off symptoms were likely caused by fly larvae that were observed in the fields at the time soils were collected. The proportion of aborted plants was only 3.1 % in the Verpillieres soil samples and 2.1 % in the Renescure soil samples. Two Woestyne samples and one Flers sample did not provide enough plants to assess the DSI.

As expected, the infestation levels of the Renescure and Verpillieres samples collected in 2017 were higher than those of Woestyne and Flers sampled in 2018. The DSIs measured on the Renescure soil samples ranged from 0.1 to 4.3 (median value 3.0) (Table 5). The DSIs measured on the Verpillieres soil samples ranged from 1.1 to 4.3 (median value 3.2). No disease was observed on the pea seedlings grown in 5 Woestyne soil samples and 14 Flers soil samples. The DSIs measured on the Woestyne soil samples ranged from 0 to 3.3 (median value 1.1). The DSIs measured on the Flers soil samples ranged from 0 to 4.0 (median value 1.3).

**Table 5** : Statistical parameters of the distribution of the disease severity index (DSI), molecular biomass, Ae\_76bp and Ae\_ITS1 copy numbers measured by digital droplet PCR at the field scale, and *Aphanomyces euteiches* diploid genomes. Results are expressed as mean values of technical replicates  $\pm$  standard deviation.

Parameter	Statistics	Renescure (n = 50)	Verpilliere (n = 50)	Woestyne (n = 50)	Flers (n = 50)
DSI	Median	3.0	3.2	1.1	1.3
	Range (min. - max.)	(0.1 - 4.3)	(1.1 - 4.3)	(0 - 3.3 $\pm$ 0.8)	(0 - 4.0 $\pm$ 0.4)
	Mean	2.7 $\pm$ 0.9	3.2 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 1.0	1.5 $\pm$ 1.4
Molecular biomass ( $\mu\text{g}$ DNA . $\text{g}^{-1}$ dry soil )	Median	74.7	38.4	57.9	41.2
	Range (min. - max.)	(49.2 $\pm$ 3.4 - 86.6 $\pm$ 5.3 )	(33.4 $\pm$ 2.0 - 43.5 $\pm$ 1.9)	(47.12 $\pm$ 5.7 - 69.8 $\pm$ 1.0 )	(32.8 $\pm$ 4.4 - 49.3 $\pm$ 4.0 )
	Mean	73.3 $\pm$ 8.3	38.5 $\pm$ 2.5	58.9 $\pm$ 4.5	41.0 $\pm$ 4.0
Ae_ITS1 ( $10^{-3}$ copies . $\text{ng}^{-1}$ soil DNA)	Median	164.3	128.5	125.0	46.6
	Range (min. - max.)	(34.9 $\pm$ 19.9 - 689.2 $\pm$ 208.5 )	(24.6 $\pm$ 42.6 - 357.6 $\pm$ 185.0)	(0 - 882.3 $\pm$ 27.2 )	(0 - 188.1 $\pm$ 109.4)
	Mean	185.9 $\pm$ 142.3	145.0 $\pm$ 82.9	186.9 $\pm$ 215.3	61.5 $\pm$ 60.3
Ae_76bp ( $10^{-3}$ copies . $\text{ng}^{-1}$ soil DNA)	Median	0	0	0	0
	Range (min. - max.)	(0 - 6.1 $\pm$ 5.4 )	(0 - 14.1 $\pm$ 12.3)	(0 - 7.1 $\pm$ 12.3 )	(0 - 7.5 $\pm$ 12.9 )
	Mean	1.1 $\pm$ 1.8	1.6 $\pm$ 2.9	1.1 $\pm$ 2.1	8.2 $\pm$ 1.9
Mean number of ITS1 copies <i>per A. euteiches</i> haploid genome in field populations		184 $\pm$ 43	105 $\pm$ 44	181 $\pm$ 16	81 $\pm$ 15
<i>A. euteiches</i> diploid genomes . $\text{g}^{-1}$ dry soil	Median	31.0	24.4	21.9	12.0
	Range (min. - max.)	(4.9 $\pm$ 11.2 - 141.1 $\pm$ 208.5 )	(4.8 $\pm$ 8.2 - 59.2 $\pm$ 11.8)	(0 - 145.9 $\pm$ 3.9 )	(0 - 51.8 $\pm$ 2.5)
	Mean	36.7 $\pm$ 27.3	16.8 $\pm$ 14.5	32.7 $\pm$ 37.3	15.6 $\pm$ 15.5

### 3.2 Pea root rot pathogens

The involvement of *A. euteiches* in the observed symptoms was confirmed by amplification of the Ae\_ITS1 and Ae\_76bp targets. Duplex PCR performed on the DNA extracted from *A. euteiches* strain RB84 and from symptomatic pea roots yielded PCR products of the expected sizes (132 bp and 76 bp for Ae\_ITS1 and Ae\_76bp, respectively). No amplification occurred when the DNA extracted from asymptomatic pea roots was used (not shown).

*A. euteiches* was isolated from symptomatic pea roots from the DSI bioassays of the four fields (Table 6). The *in vitro* pathogenicity tests confirmed that all *A. euteiches* isolates were pathogenic on pea. Based on pathogenicity scores, there was no significant difference in aggressiveness among all *A. euteiches* isolates (Table 6). Five other oomycetes isolated from symptomatic pea roots were identified as *Pythium terrestris* using the additional COI marker, and were isolated from the four fields (Table 6). The pathogenicity of all five isolates on pea

was confirmed by the *in vitro* pathogenicity tests. They caused slight honey-brown coloured rot symptoms on pea roots that looked similar to the symptoms caused by *A. euteiches* strains at the early stage of infection (not shown). However, the *in vitro* pathogenicity test confirmed that *A. euteiches* had the highest level of virulence among the isolated taxa (Table 6). Other isolates belonging to phytopathogenic species such as *Pythium intermedium* (syn. *Globisporangium intermedium*) and *P. conidiophorum* were also isolated from symptomatic pea roots but with a low frequency, so their pathogenicity on pea was not assessed.

**Table 6** : Pathogenic oomycetes isolated from disease severity bioassays, estimated ITS1 copy numbers per haploid genome of *Aphanomyces euteiches*, and pathogenicity scores. Results are expressed as means of the replicates  $\pm$  standard deviation.

Field of origin	Species	MIAE accession number <sup>a</sup> (original code)	ITS1 copy number <i>per</i> haploid genome of <i>Aphanomyces</i> <i>euteiches</i> <sup>b</sup>	Pathogenicity score
Renesecure	<i>Aphanomyces euteiches</i>	MIAE07676 (R83a)	42.3 $\pm$ 3.5	5.0 $\pm$ 0.0
	<i>A. euteiches</i>	MIAE07677 (R185b)	8.5 $\pm$ 0.3	5.0 $\pm$ 0.0
	<i>Pythium terrestris</i>	MIAE07678 (R143c)	ND	0.9 $\pm$ 0.7
Verpillieres	<i>A. euteiches</i>	MIAE07679 (V105c)	204.9 $\pm$ 40.8	5.0 $\pm$ 0.0
	<i>A. euteiches</i>	MIAE07680 (V181b)	167 $\pm$ 4.4	5.0 $\pm$ 0.0
	<i>P. terrestris</i>	MIAE07681 (V143a)	ND	1.3 $\pm$ 1.0
Woestyne	<i>A. euteiches</i>	MIAE07682 (W65a)	239.1 $\pm$ 45.1	5.0 $\pm$ 0.0
	<i>A. euteiches</i>	MIAE07683 (W163a)	149.7 $\pm$ 46.7	5.0 $\pm$ 0.0
	<i>P. terrestris</i>	MIAE07684 (W29a)	ND	0.9 $\pm$ 1,2
Flers	<i>A. euteiches</i>	MIAE07685 (F85a)	10.6 $\pm$ 0.7	5.0 $\pm$ 0.0
	<i>P. terrestris</i>	MIAE07686 (F47a)	ND	1.6 $\pm$ 0.8
	<i>P. terrestris</i>	MIAE07687 (F49a)	ND	1.7 $\pm$ 1.1
Reference strain	<i>A. euteiches</i>	MIAE01625 (RB84)	21.5 $\pm$ 3.1	5.0 $\pm$ 0.0

<sup>a</sup> MIAE: Microorganisms of Interest for Agriculture and Environment, INRAE Dijon, France

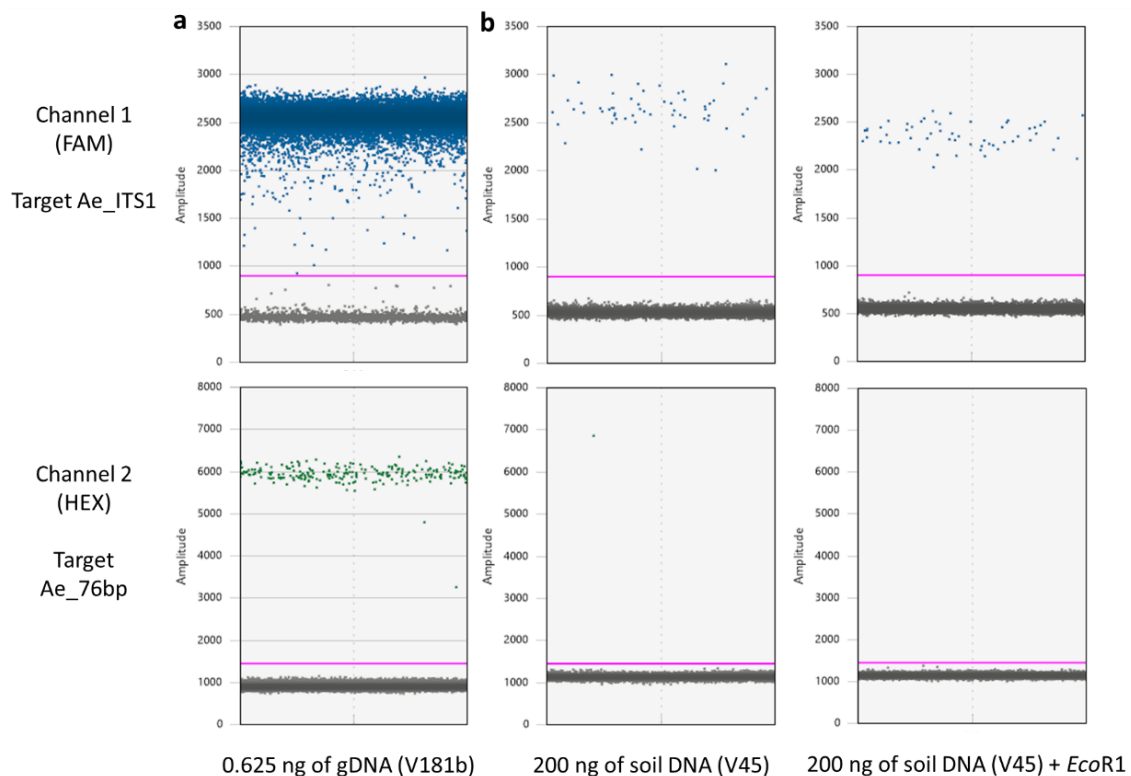
<sup>b</sup> ND: not determined



### 3.3 Duplex ddPCR on *Aphanomyces euteiches* genomic DNA

The ddPCR assay was performed on genomic DNA of *A. euteiches* isolates from the DSI bioassays and on the reference strain RB84. The two targets were suitably quantified at the selected dilution (i.e. inside the recommended ddPCR dynamic range from 1 to 120,000 copies of each target *per* 20- $\mu$ L reaction mixture) from all genomic DNAs (not shown). The cluster of positive droplets exhibited a greater fluorescence amplitude and was clearly distinguishable from the cluster of negative droplets for both the Ae\_ITS1 (FAM positive, Channel 1) and Ae\_76pb (HEX positive, Channel 2) targets (Figure 4a). However, some rain droplets were detected at an amplitude in-between the clusters of positive and negative droplets; they were mainly considered positive owing to the positioning of the threshold (Figure 4a).

The ITS1 copy number *per* haploid genome was calculated from the ddPCR results for all *A. euteiches* isolates from the DSI bioassays. This number varied from  $8.5 \pm 0.3$  copies *per* haploid genome for isolate R185b from the Renescure field to  $239 \pm 45$  copies *per* haploid genome for isolate W65a from the Woestyne field (Table 6).



**Figure 4** : Examples of distribution diagrams of droplets obtained after duplex digital Taqman PCR assay performed on (a) *Aphanomyces euteiches* strain V181b genomic DNA or (b) dry soil DNA from sample V45 in the absence or in the presence of the EcoR1 restriction enzyme. Blue and green dots above the threshold (pink line) represent positive droplets for the PCR amplification of the Ae\_ITS1 target (Channel 1, [FAM]) and of the Ae\_76bp target (Channel 2, [HEX]), respectively. Black dots represent negative droplets

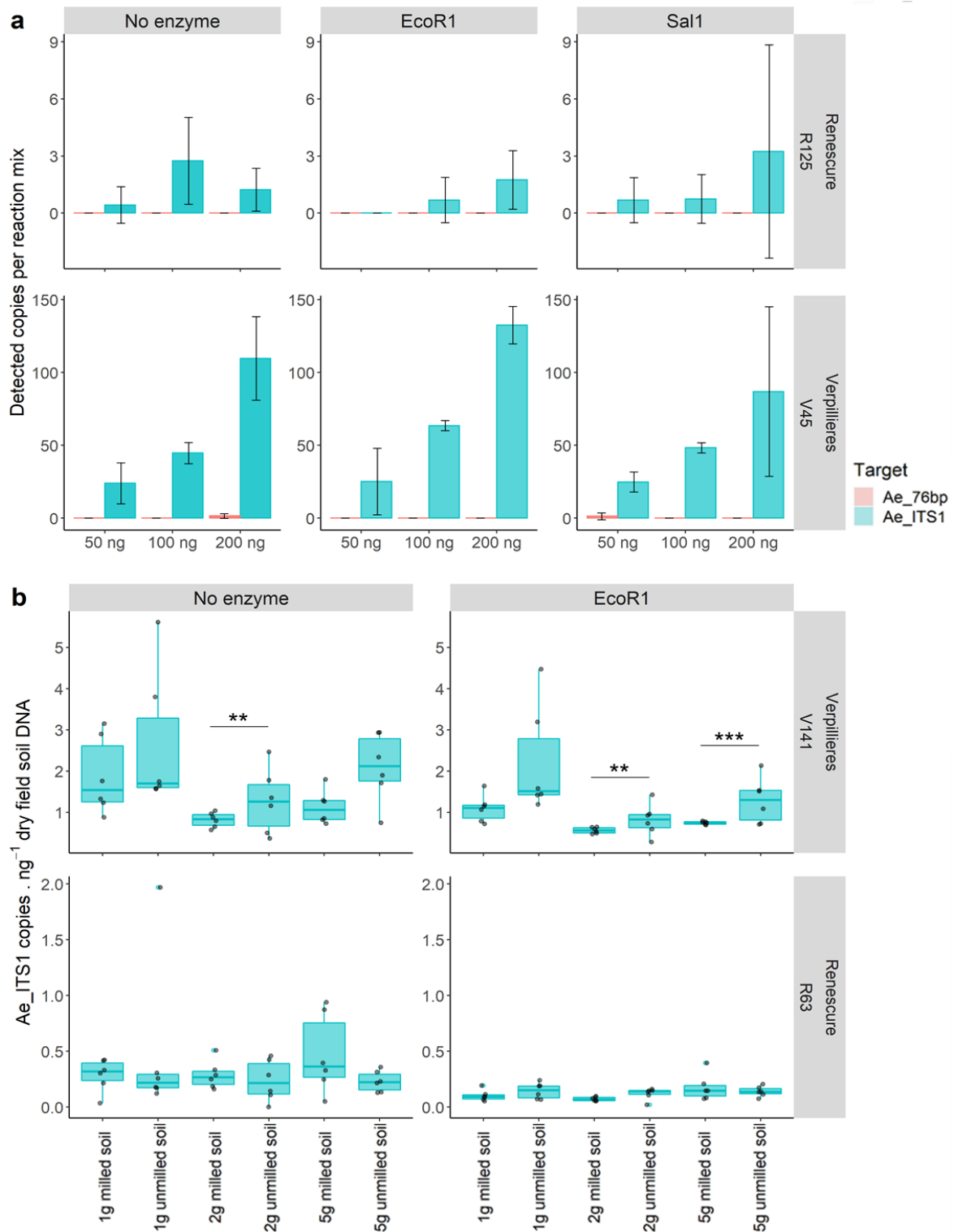
### 3.4 Optimisation of field soil DNA extraction and of the ddPCR assay

The ddPCR assay was optimised with repeated measures performed on 50 ng, 100 ng and 200 ng of DNA from the infested soil samples of Verpillieres (V45) and Renescure (R125) in the presence or in the absence of the restriction enzymes *EcoR1* or *Sal1* in the ddPCR mixture (Figure 5a, Online Resource 2). As for ddPCR performed on *A. euteiches* genomic DNA, the fluorescence amplitude of the positive droplets was clearly distinguishable from the cluster of negative droplets for both the Ae\_ITS1 (Channel 1) and Ae\_76pb (Channel 2) targets (Figure 4b). However, the targets were at low concentrations, and Ae\_76bp was only detected at very low levels ( $< 2 \cdot 10^{-2}$  copies *per* ng of DNA) from the infested soil of Verpillieres using 200 ng of DNA in the absence of a restriction enzyme and 50 ng of DNA in the presence of the restriction enzyme *Sal1* (Figure 5a). The detection limit of the ddPCR assay was thus too high to accurately and reproducibly quantify this single copy *per* genome target with one measurement performed on the soil DNA quantities we tested. However, the multicopy Ae\_ITS1 target was detected in all conditions in the two naturally infested soils samples using 100 ng and 200 ng of DNA (Figure 5a). Less than 1 copy of this target *per* ng of dry soil DNA was detected in all measurements. The use of the restriction enzyme *EcoR1* improved measurement repeatability and fitted with the proportions of matrix DNA quantities compared to the *Sal1* or no-enzyme conditions.

The field soil quantity and homogenisation required for DNA extraction and the use of the restriction enzyme *EcoR1* during ddPCR influenced the variability of quantifications in the two Renescure (R63) and Verpillieres (V141) soils (Figure 5b, Online Resource 3). Quantifications after DNA extraction from only 1 g of soil showed the greatest variability for the Verpillieres soil. The measurements were more reproducible when DNA from 2 g and 5 g of soil matrix was used. Soil homogenisation also greatly reduced the variability of the results for each Verpillieres soil quantity. This was highly significant when 2 g (Brown-Forsythe test,  $p = 0.041$ ) and 5 g of dry soil (Brown-Forsythe test,  $p = 0.003$ ) were used. Lastly, the improved reproducibility of quantification by adding the *EcoR1* enzyme in the ddPCR mixture was confirmed for the two soil samples whatever the condition compared to ddPCR in the absence of a restriction enzyme (Figure 5b). This reduced variability was significant for 2 g of unmilled soil from Renescure (Brown-Forsythe test;  $p = 0.009$ ) and 5 g of milled soil from Verpillieres

(Brown-Forsythe test;  $p = 0.006$ ). Finally, variability among replicates was low when DNA extracted from 2 g and 5 g of milled dry soil was amplified in the presence of *EcoR1*. For these conditions, CV values were 13.1 % and 5.4 % for 2 and 5 g of the Verpillieres soil, respectively, and 25.9 % and 67.6 % for 2 and 5 g of the Renescure soil, respectively.

Thus, DNA extracted from 2 g of milled dry soil and amplified in the presence of the *EcoR1* enzyme was effective for a reproducible quantification of *A. euteiches* inoculum in naturally infested field soil and was the best compromise in terms of cost and efficiency. This optimised procedure was applied in triplicate to extract total DNA from the 200 soil samples and quantify *A. euteiches* inoculum by ddPCR.



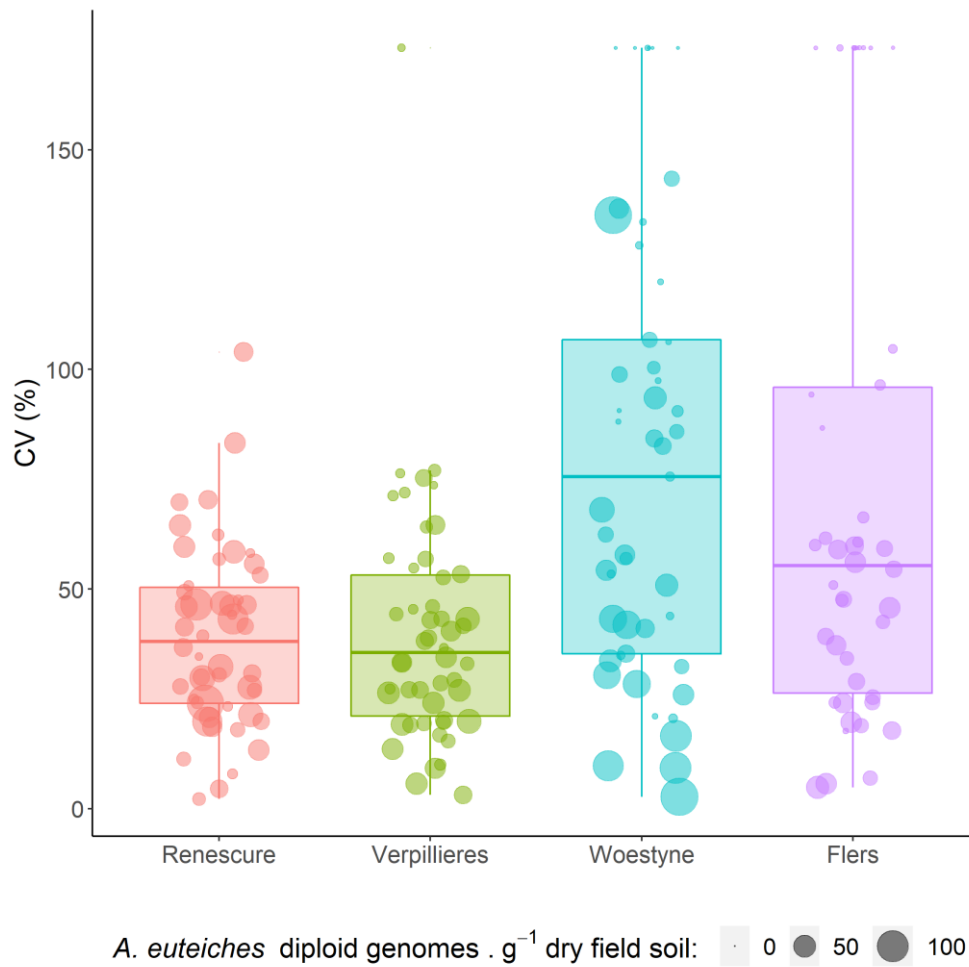
**Figure 5** : Technical optimisation of the quantification of *Aphanomyces euteiches* inoculum density in naturally infested soil samples. **a** - Evaluation of the quantity of dry field soil DNA needed for a reproducible quantification with the multicopy Ae\_ITS1 and single copy Ae\_76bp targets ( $n = 5$  for the no-enzyme condition;  $n = 3$  for the EcoR1 and Sal1 conditions). **b** - Impact on measured reproducibility of i) dry soil quantities and milling before DNA extraction, and ii) the use of the EcoR1 restriction enzyme during Ae\_ITS1 quantification by droplet digital PCR. Measurements were performed in the presence or in the absence of EcoR1 on six DNA extract replicates from a sieved soil or a sieved and milled soil from Renesecure and Verpillieres fields. Brown-Forsythe test was used to test the pairwise equality of variance of the milled and unmilled conditions (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )

### 3.5 Sensitivity and accuracy of the ddPCR assay on naturally infested field soils

The soil DNA extractions revealed a higher molecular biomass level in the field soils rich in OM of the north of the pea production basin (Woestyne and Renescure) than in those with a lower level of OM of the south of the pea production basin (Verpillieres and Flers) (Table 5). The mean molecular biomass of the 50 samples from each field ranged from  $38.5 \pm 2.5$   $\mu\text{g}$  of DNA *per* gram of dry soil for Verpillieres to  $73.3 \pm 8.3$   $\mu\text{g}$  of DNA *per* gram of dry soil for Renescure.

The multicopy Ae\_ITS1 target was detected in most of the 200 samples (Online Resource 4). The target was accurately quantified from 0 to  $882 \pm 27 \cdot 10^{-3}$  copies *per* ng of dry field soil DNA from the four soils (Table 4). This low rate below one copy *per* ng of dry soil DNA confirmed the low inoculum levels of naturally infested field soils and the sensitivity of ddPCR. However, ddPCR was not sensitive enough to quantify the single copy marker of *A. euteiches* in field soil samples with these low inoculum levels. The Ae\_76bp target was detected in only 52 of the 200 soil samples, at very low densities from  $2.2 \cdot 10^{-3}$  to  $1.4 \cdot 10^{-2}$  copies *per* ng of dry soil DNA (Table 5). However, the sum of the detected copies of this target in the 50 soil DNA samples analysed *per* field corresponded to a 50-fold increase of the quantity of matrix DNA compared to a single soil DNA sample, so it was usable to obtain a representative value of the inoculum level at the field scale. Based on this mean value calculated for each target, the mean copy number of Ae\_ITS1 sequences *per* haploid genome in the *A. euteiches* population of each field was calculated. This number varied from  $81 \pm 15$  in Flers to  $184 \pm 43$  in Renescure (Table 5). These mean copy numbers were used to convert IDs expressed as Ae\_ITS1 copies *per* ng of dry field soil DNA to IDs expressed as *A. euteiches* diploid genomes *per* gram of dry field soil (Table 5).

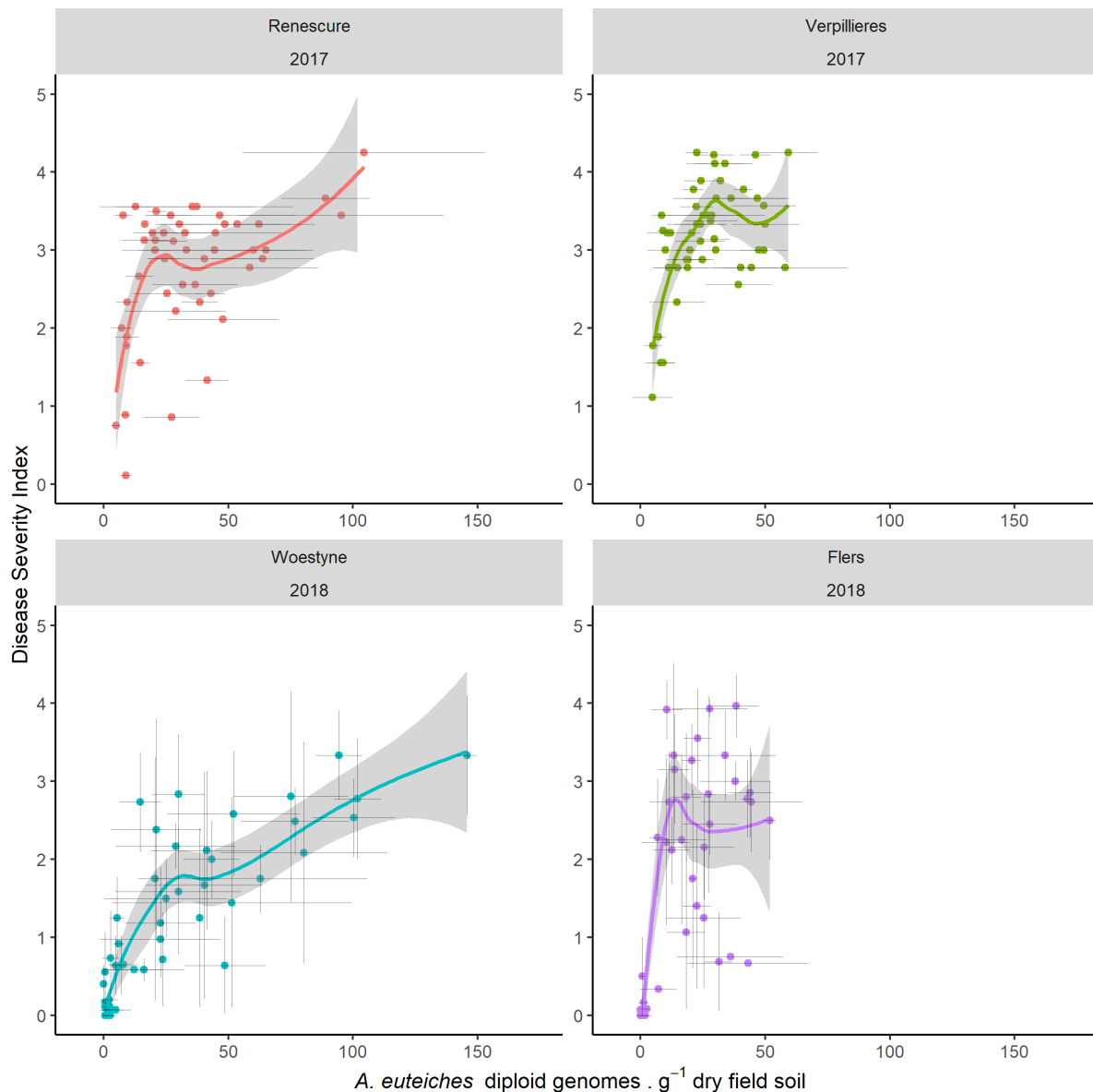
The converted IDs data ranged from 0 to  $146 \pm 4$  *A. euteiches* diploid genomes *per* gram of dry field soil. The CVs of the measured IDs ranged from 2 % to 173 % in all datasets, with a median value of 44 %. The CVs were higher in the low infested fields of Woestyne and Flers, with median values of 71.8 % and 55.3 % compared to 39.4 % and 35.5 % for Renescure and Verpillieres, respectively (Figure 6). This difference was partly due to the presence of several CVs greater than 150% in these two fields, which corresponds to inoculum densities less than 5 *A. euteiches* diploid genomes *per* gram of dry field soil.



**Figure 6** : Boxplot representation of the distribution of the coefficients of variation (CVs) of *Aphanomyces euteiches* inoculum density measurements based on technical replicates

### 3.6 Relationship between the inoculum density and the disease severity index in naturally infested fields

Spearman rank correlation coefficients showed a significant positive correlation between DSIs and *A. euteiches* soil-borne IDs in Woestyne ( $\rho = 0.85$ ;  $p < 0.001$ ), Flers ( $\rho = 0.76$ ;  $p < 0.001$ ), Verpillieres ( $\rho = 0.45$ ;  $p < 0.001$ ) and Renescure ( $\rho = 0.38$ ;  $p < 0.01$ ). Locally weighted regression (LOESS) was used to illustrate the relationship between IDs and DSIs in each of the four fields (Figure 7).

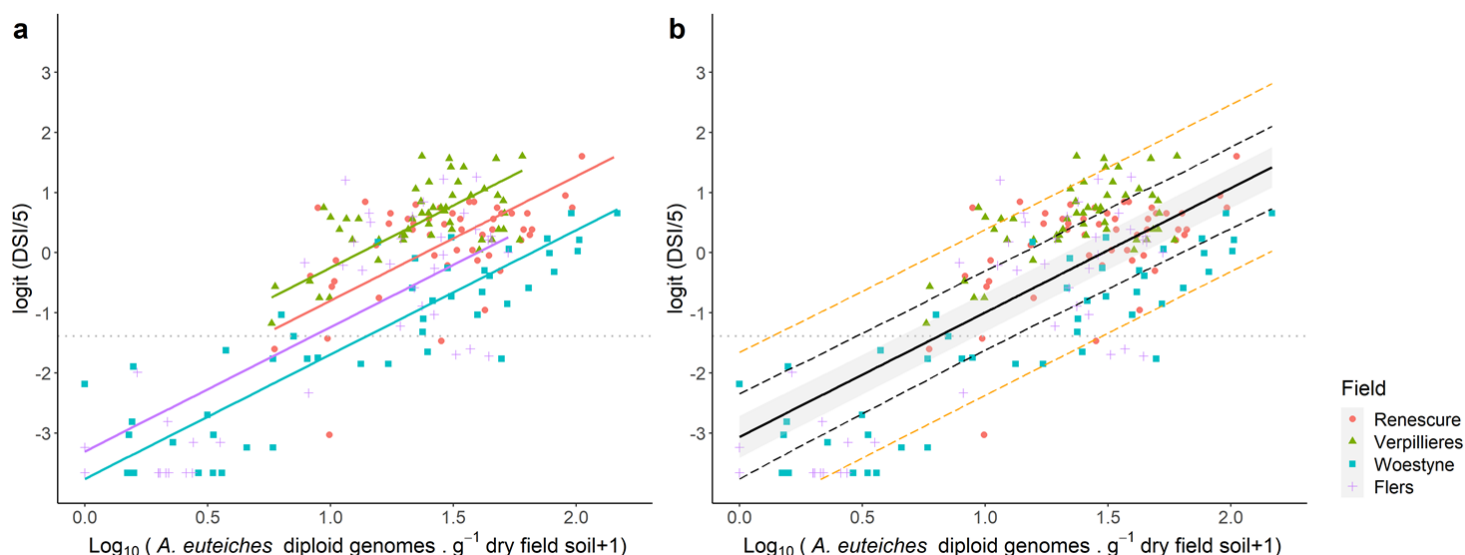


**Figure 7** : Locally weighted scatterplot smoothing regression (LOESS) showing the relationship between disease severity indexes (DSIs) and *Aphanomyces euteiches* inoculum densities (IDs) in each of the four fields. Soil *A. euteiches* IDs were measured by droplet digital PCR targeting *Ae\_ITS1* sequences. Shaded ribbons represent 95% pointwise confidence intervals. Vertical and horizontal error bars represent standard errors of the mean values of the technical replicates

The linear mixed regression analysis showed a significant linear relationship between  $\text{Log}_{10}$ -transformed *A. euteiches* IDs and logit-transformed DSIs, with a pseudo- $R^2$  equal to 0.77 (Figure 8). The model fixed effects corresponding to the effects of *A. euteiches* IDs in the soil samples on the DSIs measured on susceptible pea plants were significant ( $p < 0.001$ ). Similarly, the random effects due to specificities of each field were significant ( $p < 0.001$ ). The field random effects, i.e. the random effects linked to the biotic and abiotic properties of each field, explained approximately 42 % of the total variance of the model. A summary of the estimated conditional and unconditional parameters and of the quality criteria of the model is presented in Table 7. A 95% confidence interval of unconditional predicted values (i.e. taking the ID effect uncertainty and field random effect variance into account) is represented in Figure 8b. Considering the model unconditional equation, the DSI threshold of 1, considered as the value not to be exceeded in France for an acceptable risk for pea cropping, corresponded to an ID of 5 ranging between 2 and 13 diploid genomes *per* gram of dry field soil.

A graphical mapping of the spatial distribution of the measured DSIs and of the model conditional and unconditional predicted DSI values reflects the diversity of situations (Figure 9). The four field soils showed different levels of expression of the disease, but they also showed a heterogeneous distribution of foci as measured by the DSIs (Figure 9a). The heterogeneity of this distribution of disease foci, estimated by measuring *A. euteiches* ID by ddPCR, is represented by both the conditional (Figure 9b) and unconditional model predictions (Figure 9c). However, the conditional model reflects the risk of pea root rot more strongly than the unconditional model does.



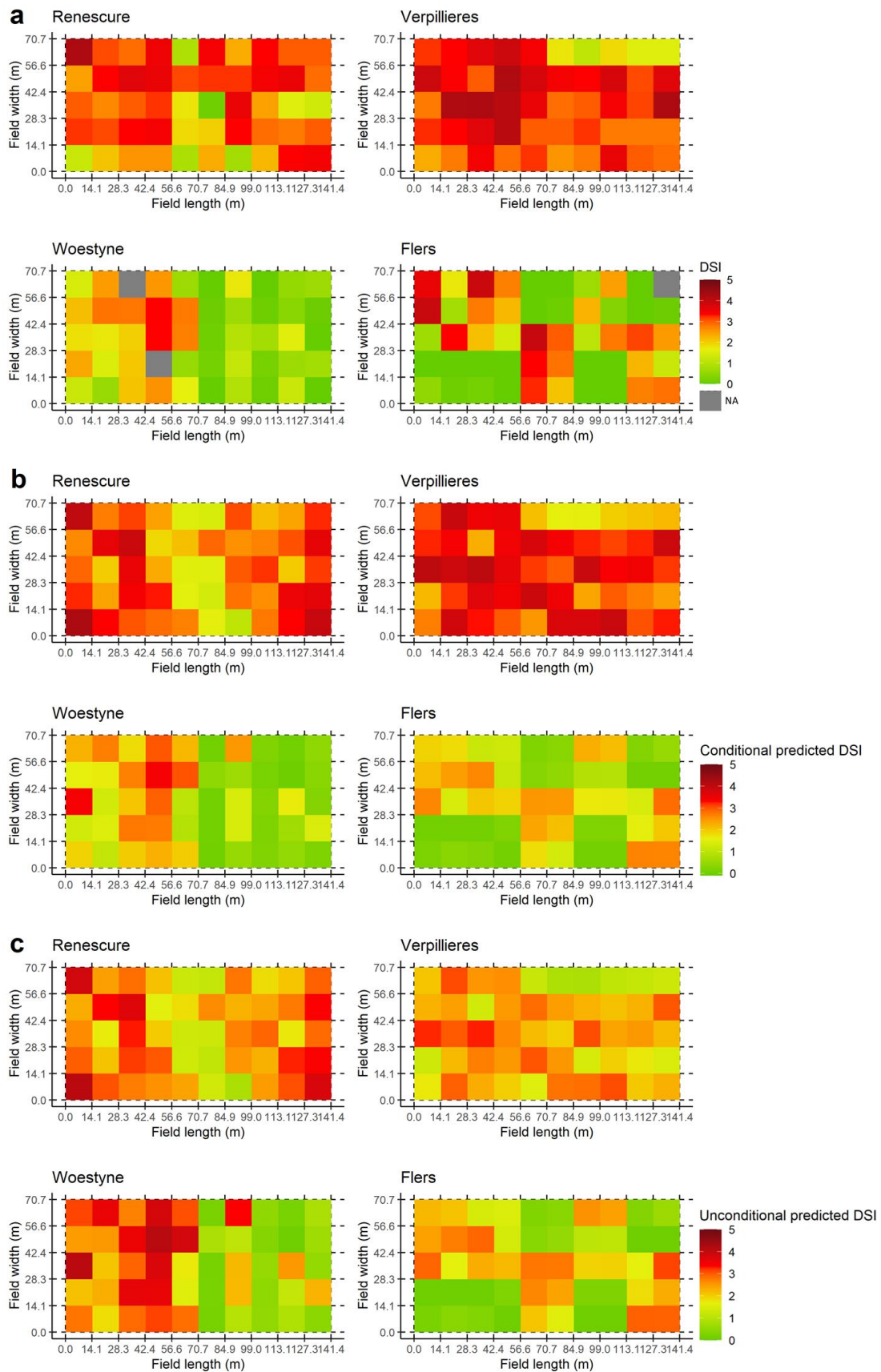


**Figure 8** : Linear mixed model representation of the relationship between mean disease severity indexes (DSIs) and *Aphanomyces euteiches* soil-borne inoculum densities (IDs). **a** - Lines are predicted values of mean DSIs conditional on the mean random effect of each field. **b** - Grey shaded ribbons and black dashed lines represent the standard error and the 95% confidence intervals of the predicted mean DSIs based on inoculum densities fixed-effects uncertainty, respectively. Orange dashed lines represent the 95% confidence intervals of the predicted mean DSI values based on inoculum densities fixed-effects uncertainty and field random-effects variance. In each graph, *A. euteiches* IDs are represented by the  $\text{Log}_{10}$  of the mean number of *A. euteiches* diploid genomes per gram of dry field soil measured in triplicate from each soil sample. Field effects were considered as random. Dotted lines represent the recommended risk threshold for pea cropping in France. Outlier values were excluded from the analyses

**Table 7** : Summary of the estimated unconditional parameters with standards errors, estimated conditional parameters with standard deviations and quality criterion summary of the linear mixed model.

Parameter	Dependent variable
	Mean DSI
Inoculum Density ( $\text{Log}_{10}(\text{A. euteiches diploid genome} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry field soil} + 1)$ )	2.07* (0.11)
Constant	- 3.06* (0.35)
Field random effects	
Renescure	0.19 (0.10)
Verpillieres	0.75 (0.10)
Woestyne	- 0.70 (0.11)
Flers	- 0.24 (0.10)
Observations	195
Log Likelihood	-226.12
Akaike Inf. Crit.	460.25
Bayesian Inf. Crit.	473.34
Pseudo- $R^2$ (Nagelkerke adjusted)	0.77

\*  $p < 0.001$



**Figure 9** : Mapping of root rot disease severity indexes (DSIs) measured and predicted with the linear mixed model of soils sampled in the 1-ha plots of Renescure, Verpillieres, Woestyne and Flers fields. Each coloured square represents (a) a measured value or (b and c) predicted values for one soil sample. a - Mapping of the mean DSIs measured by bioassays. b - Mapping of the predicted DSIs conditional on the mean random effect of each field. c - Mapping of the unconditional predicted DSIs

## 4. Discussion

This study validates a whole methodology based on ddPCR to accurately and reproducibly quantify low and heterogeneously distributed *A. euteiches* inoculum present in naturally infested field soils. A linear mixed model was built to predict disease severity from *A. euteiches* inoculum densities, which highlighted the importance of field random effects on disease expression.

### 4.1 Droplet digital PCR assay design and optimisation

The objective of this study was to develop a rapid and sensitive molecular quantification tool as an alternative to DSI bioassays commonly used for pea root rot disease risk assessment in naturally infested pea fields (Moussart et al., 2009). In this perspective, an important work was achieved by Sauvage et al. (2007) and Gangneux et al. (2014) using qPCR quantification tools. In both cases, the designed primers and their targeted DNA markers proved to be *A. euteiches* specific and made it possible to successfully and accurately quantify oospores from artificially inoculated soils (Gangneux et al., 2014; Sauvage et al., 2007). An encouraging limit of detection of 10 oospores *per* gram of dry soil was obtained by Gangneux et al. (2014) by targeting the multicopy ITS1 marker of *A. euteiches*. This greatly improved sensitivity compared to a test based on single-copy sequences. Therefore, we focused our efforts on the development of a ddPCR methodology based on these two previously used targets to quantify *A. euteiches* inoculum in naturally infested field soils.

However, numerous biological and technical barriers need to be overcome for reproducible and accurate quantification from naturally infested soils. The first one is that ITS1 copy numbers vary among *A. euteiches* isolates, which questions the choice of this target for a quantification method. A previous study reported a distribution range from 49 to 145 copies *per* haploid genome, with a mean number of  $95 \pm 22$  copies among 40 *A. euteiches* isolates from different countries (Gangneux et al., 2014). According to the authors, this observation leads to an inherent error margin of 52 % for each quantification, and calls for a direct assessment of ITS1 copy number variation for each quantification. To this end, the two

primer/probe sets were used in a duplex TaqMan ddPCR assay targeting the multicopy Ae\_ITS1 and the single copy Ae\_79bp DNA fragments. The concomitant measurement of the two targets from the same samples and the compartmentalisation of DNA copies in ddPCR preserved their respective proportions and their amplifications without creating any competition between the targets (Denis et al., 2018). Due to the tandem repeated structure of the operon of ribosomal RNA-encoding genes within eukaryotes, a restriction enzyme was also required to cut Ae\_ITS1 so as to release each copy from its neighbours and to allow for their random distribution among droplets (Droplet Digital PCR Applications Guide, Bio-Rad). Restriction enzymes are also adapted to the use of large amounts of DNA in PCR by digesting DNA and thereby promoting accessibility by *Taq* polymerase (Denis et al., 2018). The use of the restriction enzyme *EcoR1* in this study greatly improved the reproducibility of ddPCR quantification.

The two targets of our study were suitably quantified from genomic DNA of all tested *A. euteiches* isolates. However, with considerably different copy numbers for each target, an adequate dilution of genomic DNA had to be determined for each *A. euteiches* isolate to remain within the recommended ddPCR dynamic range (1 to 120,000 copies *per* 20  $\mu$ L reaction - Digital Droplet PCR Application Guide, Bio-Rad). ITS1 copy numbers varied from 9 to 239 copies *per* haploid genome among *A. euteiches* isolates from the different fields. This 26-fold factor range was much greater than previously reported (Gangneux et al., 2014). This supports the need to take this parameter into account for disease prediction. Furthermore, ITS1 copy numbers also varied among *A. euteiches* isolates from a given field. This result confirms the absence of a relationship between geographical origin and ITS copy numbers, and supports the relevance of an estimation of mean values of *A. euteiches* populations at the field scale rather than of a single *A. euteiches* isolate. However, because this method remains limited by the scarcity of the single copy target, a large soil sampling size is necessary in each field to obtain an accurate estimation.

A second biological barrier is the presence of *A. euteiches* at very low inoculum levels in field soils and its capacity to cause severe symptoms on pea crops from IDs less than 10 oospores *per* gram of soil (Heyman, 2008). Therefore, it is necessary to accurately quantify inoculum levels below the qPCR limit of detection obtained by Gangneux et al. (2014). Unfortunately, qPCR is subject to soil inhibitors that impede the improvement of its sensitivity threshold on soil DNA (Albers et al., 2013; Matheson et al., 2010). The presence of PCR-

inhibiting substances after soil DNA extraction and purification commonly requires a sufficient DNA sample dilution before proceeding to a qPCR assay, and this results in a limited sensitivity for rare target detection (Albers et al., 2013). The richness of several soils in PCR inhibitors coupled with the low inoculum levels of *A. euteiches* in field soils have been described as a cause of unsuccessful qPCR quantification (Heyman, 2008). ddPCR, which is based on the PCR mix partition in up to 20,000 droplets and on the endpoint reading of the PCR, is less affected than qPCR by soil PCR inhibitors (Racki et al., 2014). It allows for high amounts of soil matrix DNA to be used, hence a major gain in sensitivity compared to qPCR. In our study, up to 200 ng of soil matrix DNA *per* PCR mixture were required for an accurate and reproducible quantification of the multicopy Ae\_ITS1 target. As discussed, soils rich in organic matter like Renescure or Woestyne were the most limiting ones for determining the sensitivity threshold of the method. The large amounts of clay, humic acids and phenolic compounds they contain can inhibit the PCR. In addition, their large content in soil DNA, resulting from an important biological activity, leads to a greater dilution of the DNA samples and consequently of the targets. Thus, for the same ID level and for an equivalent number of ITS copies *per A. euteiches* genome, these soils required a greater DNA quantity in the ddPCR mixture for target detection than the siltier Verpillieres and Flers soils did. If necessary, ddPCR offers the flexibility to increase the matrix DNA quantity up to 1 µg *per* reaction mixture, which could theoretically enhance the method sensitivity by a factor of 5 (Droplet Digital PCR Applications Guide, Bio-Rad). However, improving the method sensitivity is required for robust quantification of the single copy Ae\_76pb target in naturally infested soil samples. More numerous soil DNA extracts and the merging of the ddPCR results before the Poisson calculation is a potential option but requires far more DNA extractions and induces a higher analysis cost than the multicopy target Ae\_ITS1 does. For example, we had to analyse DNA from 50 soil samples from each field to obtain a representative value of ID from the quantification of the single copy marker. Recovery of and enrichment in soil oospores before DNA extraction using density flotation or wet sieving could be alternative strategies to enhance sensitivity but they are time consuming (Debode et al., 2011; Kraft, 1990; Wang et al., 2006). Therefore, the gain in sensitivity provided by the use of multicopy ITS1 sequences is essential for the quantification method.

A third barrier to be overcome to obtain representative and reproducible measurements is the heterogeneous distribution of *A. euteiches* inoculum in naturally infested soils. Its

propagules are mainly dispersed in plant debris of heterogeneous sizes from previous host legume crops (Schren, 1960). The soil is altogether a complex matrix, and special attention to soil homogenisation, particle size and quantity is needed to minimise sampling errors (Petersen et al., 2005). We made an important effort by carefully determining the appropriate amount of dry soil and the best milling procedure to optimise these parameters before DNA extraction. These improvements are in accordance with i) a decrease of the fundamental sampling errors, related to the variability of particle size and compositional distribution within each sample, and ii) a decrease of the grouping and segregation error, which arises from heterogeneity within a given sample (Gerlach & Nocerino, 2003; Petersen et al., 2005). Our study shows that DNA extraction from 2 g of milled dry soil followed by a ddPCR quantification of the targeted sequence in the presence of *EcoR1* provides an efficient and reproducible procedure to quantify *A. euteiches* ID in naturally infested soil. It is also a better compromise in terms of cost and efficiency compared to DNA extractions with higher soil quantities requiring greater lysing matrix and buffer quantities.

## **4.2 Validation of the optimised ddPCR assay with naturally infested soils**

Despite the efforts to reduce the sampling and measurement errors by overcoming the biological and technical barriers of the molecular quantification of *A. euteiches* inoculum in naturally infested soil, CV values were high when we validated the optimised ddPCR assay on naturally infested soil samples. An overall median CV of 44 % was observed in the measurements carried out in triplicate on 200 soil samples, i.e. 600 soil homogenisations, DNA extractions/purifications, and ddPCR analyses. Considering the previously discussed technical barriers, CV values reflect the accumulation of errors at each step of the process, from soil sampling to target quantification. Thus, they encompass the representativeness of the sample replicates after homogenisation, the technical errors linked to the analysis steps such as dilution and pipetting, DNA extraction, purification, and quantification steps, and the potential errors of the ddPCR assay. Robotising the process could reduce the technical errors related to the analysis steps. Finally, a large part of these CVs is due to the scarcity of the *Ae\_ITS1* target in soil DNA, in the order of a few molecules *per* ng of soil DNA. For example, the CV was particularly high, sometimes greater than 150 %, in low infested soil samples from the Flers

and Woestyne fields with IDs less than 5 *A. euteiches* diploid genomes *per* gram of dry field soil. Apart from these extreme values, these CVs were quite consistent with those observed in soils artificially inoculated with *A. euteiches* oospores (Gangneux et al., 2014): they ranged from 0.5 % to 78.6 % with median values of 20, 26, and 46 % for inocula of 10, 100, and 1,000 oospores *per* gram of soil, respectively. Other assays for plant pathogen quantification in artificially inoculated soil samples showed inter-sample repeatability only slightly lower than that of the ddPCR applied on naturally infested soil samples presented in this study (Almquist et al., 2016; Wallenhammar et al., 2012).

### **4.3 Relationship between the inoculum density and the disease severity index in naturally infested field soils**

A logarithmic relationship between potential disease severity and *A. euteiches* ID was previously established in disinfected soil artificially inoculated with oospores (Gangneux et al., 2014; Malvick et al., 1994; Persson et al., 1999; Sauvage et al., 2007). We established a significant relationship between pea root rot disease severity and *A. euteiches* ID in naturally infested soils. Thus, we demonstrated the predictive value of *A. euteiches* inoculum quantification in naturally infested soils *via* our method. In addition, the *A. euteiches* DNA we detected in naturally infested soils probably originated from viable and active resting oospores – the primary inoculum and the pathogenic disease units. Extracellular DNA (eDNA) released from *A. euteiches* dead cells, DNA from non-pathogenic mycelial propagules or DNA from non-viable cells were probably present but in limited quantities. The mycelial form of the pathogen is only active on living plants and does not grow as a saprophyte on dead plant material (Kjoller & Rosendahl, 1998). Moreover, the degradation rates of fungal or oomycete eDNA is quite high in moist soils favourable to biotic and DNase activity (Herdina et al., 2004; Kunadiya et al., 2020; Pietramellara et al., 2008). For example, *Phytophthora cinnamoni* eDNA has a half-life of only 2 to 7 days and rarely persists up to 90 days in wet soils, but it could persist for up to 378 days in dry soil conditions (Kunadiya et al., 2020). The soils of Renescure, Verpillieres, Woestyne, and Flers were sampled in autumn, four to five months after the last pea crop, and they were subjected to daily and seasonal fluctuations in humidity and temperatures. Thus, *A. euteiches* eDNA should have been mainly degraded since the last mycelial development within its host. Soil sampling during a dry summer right after the cultivation of a sensitive

legume may lead to an overestimation of the viable pathogenic inoculum and should be avoided.

The significant relationship between  $\log_{10}$ -transformed *A. euteiches* IDs and logit-transformed DSIs of the linear mixed regression made it possible to predict pea root rot disease severity from very low inoculum densities. This relationship highlighted the very low inoculum levels required to induce severe root rot symptoms. In France, a DSI measured on composite soil samples must be below 1 to grow peas without risking yield losses. We reached this threshold at a mean ID of only 5 *A. euteiches* diploid genomes *per* gram of dry soil. Models established on artificially inoculated soils predicted similar inoculum levels to reach this threshold (Gangneux et al., 2014; Persson et al., 1999; Sauvage et al., 2007). Knowing the biology of the pathogen, this prediction is quite realistic, as one oospore produces about 300 to 400 motile zoospores *via* the development of the zoosporangium. Zoospores swim to the host roots by chemotactic attraction (Sekizaki et al., 1993), what leads to a high probability of pea root infestation. Besides, an equivalent low inoculum level required for infection has been reported for *A. cochliformis* on sugarbeet, a phylogenetically close pathogen with similar physiological characteristics (Almquist et al., 2016). Our results confirm the usefulness of a sensitive tool such as ddPCR to accurately quantify *A. euteiches* IDs below 10 oospores *per* gram of dry soil in naturally infested pea fields, make a relevant predictive diagnosis and assess the risk of pea root rot disease.

The confidence interval of the predicted mean DSI was acceptable. However, the mean ID values of the three technical replicates and the mean DSIs values of three technical replicates of the soil samples were used to set up the model. Thus, part of the technical variance was not taken into account in the model to better represent biological variance. The presence of several other pea pathogens such as *Pythium* spp. in symptomatic pea roots could be partly at the origin of the unexplained variance of the model, as the bioassay scoring encompassed similar symptoms from other pea pathogens potentially present in the soil samples. The presence of other soil-borne fungi in symptomatic roots, such as non-pathogenic or pathogenic *Fusarium* spp., is also known to create synergistic effects on symptom severity (Peters & Grau, 2002; Willsey et al., 2018). As different primers and probes targeting *Fusarium* spp. involved in the pea root rot complex are already available (Willsey et al., 2018), a multiplexed ddPCR approach simultaneously targeting different microorganisms associated



with the *A. euteiches* pea root rot complex would probably improve the prediction. This involves that future methodological development in ddPCR equipment proposes more channels than the two currently provided.

Significant field random effects increased the unconditional prediction interval. These effects could be due to the addition of several field-specific parameters such as *A. euteiches* aggressiveness, and differences in the soil receptivity to pea root rot disease. However, we found no significant difference in the aggressiveness levels of the different *A. euteiches* isolates collected and tested in the pathogenicity bioassays. More globally, French *A. euteiches* isolates mostly belong to pathotypes I and II and exhibit a low diversity of aggressiveness on pea genotypes (Quillevere-Hamard et al., 2018; Wicker et al., 2001). Differences in field soil receptivity to pea root rot have already been assessed (Persson et al., 1999), and soil suppressiveness to *A. euteiches* disease due to Ca content has also been studied (Heyman et al., 2007; Persson, 1998). Moreover, the probability for the presence of soil-borne pathogens associated with *A. euteiches* on plant root tissues depends on edaphic parameters such as soil pH, Fe<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> (Zitnick-Anderson et al., 2020).

Overall, as a result of the significant relationship between pea root symptom severity and *A. euteiches* inoculum density, the predicted DSIs conditional on the mean field random effects and the unconditional predicted DSIs showed the same spatial patterns as DSIs actually did in the four soils. In the low infested fields of Flers and Woestyne, *A. euteiches* was distributed in foci, as already described for *A. euteiches* and for other soil-borne pathogens (Anees et al., 2010; Moussart et al., 2009). Foci were larger, more or less confluent and more difficult to distinguish from each other in the highly infested fields of Renescure and Verpillieres. This scattered-cluster pattern of the inoculum requires adapted sampling strategies to reliably assess the disease risk at the field scale. Otherwise, soil sampling may miss inoculum foci, leading to under- or over-estimations of the inoculum level. Accurate and rapid molecular assays are thus effective tools for the processing of large amounts of soil samples needed to model soil-borne pathogen distribution at the field scale and to assess the risk of infested areas within a field. Nevertheless, molecular assay reagents are expensive, and analysing samples taken on a large scale for disease risk mapping may have a significant economic cost. In this context, a major challenge remains the defining of sampling strategies representative of the scattered soil-borne pathogen inoculum to optimise the sampling size.

We only analysed four fields, ranging from low to highly infested soils. They encompassed a wide variety of pathological situations illustrated by the heterogeneous distribution of DSI foci in the pea production basin of the north of France. The model we propose will have to be confirmed with pathological and pedoclimatic situations existing in other pea-producing regions, in France or elsewhere, for general validation. Yet, it is already usable as such and should be implemented by diagnostic laboratories to be tested by pea producers.

## **Declarations**

### **Funding**

Simon Gibert was financially supported by a PhD funding from Bonduelle SAS (59653 Villeneuve d'Ascq, France) and the National Association of Technical Research (ANRT) (CIFRE n°2017/0852).

### **Conflicts of interest/Competing interests**

The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.

### **Availability of data and material**

All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files]

### **Code availability**

R scripts developed in this study are available in a supplementary information file.

## **Acknowledgments**

Simon Gibert was financially supported by a PhD funding from Bonduelle SAS (59653 Villeneuve d'Ascq, France) and the National Association of Technical Research (ANRT) (CIFRE n°2017/0852).

The authors would like to thank Guillaume Fourrier of Bio-Rad laboratories for his technical assistance at the beginning of the project and for his help for the design of a ddPCR probe. The authors thank Cécile Jacot-des-Combes for the expertise and facilities of the DTAMB platform (University Lyon 1).

This work, through the involvement of the technical facilities of the GenoSol platform of the infrastructure ANAEE-Services, indirectly benefited from a grant from the French state through the National Agency for Research under the program "Investments for the Future" (reference ANR-11-INBS-0001), as well as from a grant from the Regional Council of Bourgogne Franche Comté. The BRC GenoSol is a part of BRC4Env, the pillar "Environmental Resources" of the Research Infrastructure AgroBRC-RARe.

## 5. References

- Abbo, E. O., & Irwin, J. A. G. (1990). *Aphanomyces euteiches*, a possible cause of poor lucerne establishment in the Lockyer Valley, Queensland *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 30, 361–364. <https://doi.org/10.1071/EA9900361>
- Albers, C. N., Jensen, A., Baelum, J., & Jacobsen, C. S. (2013). Inhibition of DNA polymerases used in q-PCR by structurally different soil-derived humic substances. *Geomicrobiology Journal*, 30, 675–681. <https://doi.org/10.1080/01490451.2012.758193>
- Almquist, C., Persson, L., Olsson, A., Sundstrom, J., & Jonsson, A. (2016). Disease risk assessment of sugar beet root rot using quantitative real-time PCR analysis of *Aphanomyces cochlioides* in naturally infested soil samples. *European Journal of Plant Pathology*, 145, 731–742. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0862-5>
- Anees, M., Edel-Hermann, V., & Steinberg, C. (2010). Build up of patches caused by *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 1661–1672. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.013>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Barton, K. (2020). MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.43.17. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>
- Bodker, L., Leroul, N., & Smedegaard-Petersen, V. (1993). Influence of pea cropping history on disease severity and yield depression. *Plant Disease*, 77, 896–900.
- Chan, M., & Close, R. (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, 213–217.
- Chang, K. F., Hwang, S. F., Ahmed, H. U., Fu, H., Zhou, Q., Strelkov, S. E., & Turnbull, G. D. (2017). First report of *Phytophthora sansomeana* causing root rot in field pea in Alberta, Canada. *Crop Protection*, 101, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.008>
- Cooke, D. E., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., & Brasier, C. M. (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 30, 17–32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1202>
- Cunningham, J., & Hagedorn, D. (1962). Penetration and infection of pea roots by zoospores of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, 52(8), 827–834.
- Debode, J., Van Poucke, K., Franca, S.C., Maes, M., Höfte, M., & Heungens, K. (2011). Detection of multiple *Verticillium* species in soil using density flotation and real-time polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 95. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0267>
- Delwiche, P., Grau, C., Holub, E., & Perry, J. (1987). Characterization of *Aphanomyces euteiches* isolates recovered from alfalfa in Wisconsin. *Plant Disease*, 71, 155–161. <https://doi.org/10.1094/PD-71-0155>
- Denis, J. A., Nectoux, J., Lamy, P.-J., Rouillac Le Sciellour, C., Guermouche, H., Alary, A. S., Kosmider, O., Sarafan-Vasseur, N., Jovelet, C., Busser, B., Nizard, P., Taly, V., & Fina, F. (2018). Development of digital PCR molecular tests for clinical practice: principles, practical implementation and recommendations. *Annales de Biologie Clinique (Paris)*, 76, 505–523. <https://doi.org/10.1684/abc.2018.1372>
- Desgroux, A., L'Anthoene, V., Roux-Duparque, M., Riviere, J. P., Aubert, G., Tayeh, N., Moussart, A., Mangin, P., Vetel, P., Piriou, C., McGee, R. J., Coyne, C. J., Burstin, J., Baranger, A., Manzanares-Dauleux, M., Bourion, V., & Pilet-Nayel, M.-L. (2016). Genome-wide association mapping of partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea. *BMC Genomics*, 17, 124. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2429-4>
- Edwards, S. M. (2020). lemon: Freshing up your 'ggplot2' plots. R package version 0.4.5. <https://CRAN.R-project.org/package=lemon>
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). An {R} Companion to Applied Regression, Third Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>
- Gangneux, C., Cannesan, M.-A., Bressan, M., Castel, L., Moussart, A., Vicré-Gibouin, M., Driouch, A., Trinsoutrot-Gattin, I., & Laval, K. (2014). A sensitive assay for rapid detection and quantification of *Aphanomyces euteiches* in Soil. *Phytopathology* 104, 1138–1147. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-13-0265-R>
- Gastwirth, J. L., Gel, Y. R., Hui W. L., Lyubchich, V., Miao, W., & Noguchi, K. (2020). lawstat: Tools for Biostatistics, Public Policy, and Law. R package version 3.4. <https://CRAN.R-project.org/package=lawstat>
- Gaulin, E., Jacquet, C., Bottin, A., & Dumas, B. (2007). Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Molecular Plant Pathology*, 8, 539–548. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00413.x>

- Gerlach, R., & Nocerino, J. (2003). Guidance for obtaining representative laboratory analytical subsamples from particulate laboratory samples. *US Environmental Protection Agency*.
- Gossen, B. D., Conner, R. L., Chang, K.-F., Pasche, J. S., McLaren, D. L., Henriquez, M. A., Chatterton, S., & Hwang, S. F. (2016). Identifying and managing root rot of pulses on the Northern Great Plains. *Plant Disease*, *100*, 1965–1978. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0184-FE>
- Gossen, B. D., Al-Daoud, F., Dumonceaux, T., Dalton, J. A., Peng, G., Pageau, D., & McDonald, M. R. (2019). Comparison of techniques for estimation of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in soil. *Plant Pathology*, *68*, 954–961. <https://doi.org/10.1111/ppa.13007>
- Greenhalgh, F. C., Merriman, P. R., & Keane, P. J. (1988). Relative importance of root rots of subterranean clover caused by *Aphanomyces euteiches* and *Phytophthora clandestina*. *Plant Pathology*, *37*, 344–350. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1988.tb02084.x>
- Herdina, Neate, S., Jabaji, S., & Ophel-Keller, K. (2004). Persistence of DNA of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in soil as measured by a DNA-based assay. *FEMS Microbiology Ecology*, *47*, 143–52. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00255-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00255-1)
- Heyman, F., Lindahl, B., Persson, L., Wikstrom, M., & Stenlid, J. (2007). Calcium concentrations of soil affect suppressiveness against *Aphanomyces* root rot of pea. *Soil Biology & Biochemistry*, *39*, 2222–2229. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.03.022>
- Heyman, F. (2008). Root rot of pea caused by *Aphanomyces euteiches*: calcium-dependent soil suppressiveness, molecular detection and population structure (PhD Thesis). Dept. of Forest Mycology and Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., ... & Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, *83*, 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
- Hlavac, M. (2018). Stargazer: well-formatted regression and summary statistics tables. R package version 5.2.1. <https://CRAN.R-project.org/package=stargazer>
- Holub, E. B., Grau, C.R., & Parke, J. L. (1991). Evaluation of the forma specialis concept in *Aphanomyces euteiches*. *Mycological Research*, *95*, 147–157.
- Jones, F. R., & Drechsler, C. (1925). Root rot of peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches* (n. sp.). *Journal of Agricultural Research*, *30*, 293–325.
- Kjoller, R., & Rosendahl, S. (1998). Enzymatic activity of the mycelium compared with oospore development during infection of pea roots by *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, *88*, 992–996. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.9.992>
- Kraft, J. M. (1990). Detection of *Aphanomyces euteiches* in Field Soil from Northern Idaho by a Wet-Sieving/Baiting Technique. *Plant Disease*, *74*, 716. <https://doi.org/10.1094/PD-74-0716>
- Kraft, J. M., & Pflieger, F. L. (2001). Compendium of pea diseases and pests. *American Phytopathological Society* (APS Press), St. Paul, USA.
- Kunadiya, M. B., Burgess, T. I., Dunstan, W. A., White, D., & Hardy, G. E. S., (2020). Persistence and degradation of *Phytophthora cinnamomi* DNA and RNA in different soil types. *Environmental DNA*, *3*, 92-104. <https://doi.org/10.1002/edn3.127>
- Lamari, L., & Bernier, C. C. (1985). Etiology of seedling blight and root rot of faba bean (*Vicia faba*) in Manitoba. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *7*, 139–145. <https://doi.org/10.1080/07060668509501490>
- Lavaud, C., Lesné, A., Piriou, C., Le Roy, G., Boutet, G., Moussart, A., Poncet, C., Delourme, R., Baranger, 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*, 2273–2288. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2583-0>
- Liu, J., Li, C., Muhae-Ud-Din, G., Liu, T., Chen, W., Zhang, J., & Gao, L. (2020). Development of the Droplet Digital PCR to detect the teliospores of *Tilletia controversa* Kuhn in the soil with greatly enhanced sensitivity. *Frontiers Microbiology*, *11*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00004>
- Maldonado-Gonzalez, M. M., Martinez-Diz, M. D., Andres-Sodupe, M., Bujanda, R., Diaz-Losada, E., & Gramaje, D. (2020). Quantification of *Cadophora luteo-olivacea* from grapevine nursery stock and vineyard soil using droplet digital PCR. *Plant Disease*, *104*, 2269–2274. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-2035-RE>
- Malvick, D., Percich, J., Pflieger, F., Givens, J., & Williams, J. (1994). Evaluation of methods for estimating inoculum potential of *Aphanomyces-Euteiches* in soil. *Plant Disease*, *78*, 361–365. <https://doi.org/10.1094/PD-78-0361>

- 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, 263–265. <https://doi.org/10.1080/00288233.1980.10430797>
- Matheson, C. D., Gurney, C., Esau, N., & Lehto, R. (2010). Assessing PCR inhibition from humic substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 3, 38-45. <https://doi.org/10.2174/1874940201003010046>
- Moussart, A., Wicker, E., Le Delliou, B., Abelard, J.-M., Esnault, R., Lemarchand, E., Rouault, F., Le Guennou, F., Pilet-Nayel, M.-L., Baranger, A., Rouxel, F., & Tivoli, B. (2009). Spatial distribution of *Aphanomyces euteiches* inoculum in a naturally infested pea field. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 153–158. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9350-x>
- 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, 545–551. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02679.x>
- 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, 35–44. <https://doi.org/10.1007/BF01974783>
- Oyarzun, P., & van Loon, J. (1989). *Aphanomyces euteiches* as a component of the complex of foot and root pathogens of peas in Dutch soils. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95, 259–264. <https://doi.org/10.1007/BF01977730>
- Papavizas, G. C., & Ayers, W. A. (1974). *Aphanomyces* species and their root diseases in pea and sugarbeet: a review. *U.S.D.A. Agricultural Research Service Technical Bulletin 1485*.
- Persson, L., Bodker, L., & Larsson-Wikstrom, M. (1997). Prevalence and pathogenicity of foot and root rot pathogens of pea in southern Scandinavia. *Plant Disease*, 81, 171–174. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.171>
- Persson, L. (1998). Soil suppressiveness to *Aphanomyces* root rot of pea. 1 vols, *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae Agraria*, 131; Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Persson, L., Larsson-Wikstrom, M., & Gerhardson, B. (1999). Assessment of soil suppressiveness to *Aphanomyces* root rot of pea. *Plant Disease*, 83, 1108–1112. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.12.1108>
- Peters, R. D., & Grau, C. R. (2002). Inoculation with nonpathogenic *Fusarium solani* increases severity of pea root rot caused by *Aphanomyces euteiches*. *Plant Disease*, 86, 411–414. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.4.411>
- Petersen, L., Minkinen, P., & Esbensen, K. H. 2005. Representative sampling for reliable data analysis: theory of sampling. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 77 (1), 261-277. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.09.013>.
- Pfender, W. F., Rouse, D. I., Hagedorn, D. J. (1981). A “most probable number” method for estimating inoculum density of *Aphanomyces euteiches* in naturally infested soil. *Phytopathology*, 71, 1169–1172. <https://doi.org/10.1094/Phyto-71-1169>
- Pfender, W., & Hagedorn, D. (1982). *Aphanomyces-Euteiches* f sp *phaseoli*, a causal agent of bean root and hypocotyl rot. *Phytopathology*, 72, 306–310. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-306>.
- Pietramellara, G., Ascher-Jenull, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G., & Nannipieri, P. (2008). Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45, 219–235. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>
- Plassart, P., Terrat, S., Thomson, B., Griffiths, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., Regnier, T., Nowak, V., Bailey, M., Lemanceau, P., Bispo, A., Chabbi, A., Maron, P.-A., Mougel, C., & Ranjard, L. (2012). Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community structure. *PLoS ONE*, 7, e44279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044279>
- Quillevere-Hamard, A., Le Roy, G., Moussart, A., Baranger, A., Andrivon, D., Pilet-Nayel, M.-L., & Le May, C. (2018). Genetic and pathogenicity diversity of *Aphanomyces euteiches* populations from pea-growing regions in France. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1673. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01673>
- Racki, N., Dreo, T., Gutierrez-Aguirre, I., Blejec, A., & Ravnkar, M. (2014). Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods*, 10, 42. <https://doi.org/10.1186/s13007-014-0042-6>
- Reiling, T., King, T., & Fields, R. (1960). Soil indexing for pea root rot and the effect of root rot on yield. *Phytopathology*, 50, 287–290.
- Robideau, G. P., De Cock, A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., Désaulniers, N., Eggertson, Q. A., et al. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase

- subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, 11, 1002–1011. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- 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, 64–69. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00784.x>
- Schren, A.L. (1960). Germination of oospores of *Aphanomyces euteiches* embedded in plant debris. *Phytopathology*, 50, 274–277.
- 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 & pharmaceutical bulletin*, 16, 698–701.
- Sherwood, R. T., & Hagedorn, D. J. (1958). Determining common root rot potential of pea fields. Agricultural Experiment Station, University of Wisconsin-Madison.
- Tofte, J. E. (1990). Reaction of red clover (*Trifolium pratense* L.) and diploid alfalfa (*Medicago sativa* L. and *Medicago Falcata* L.) to *Aphanomyces euteiches* Drechs. and selection for and inheritance of resistance in red clover. University of Wisconsin - Madison.
- Tsvetkova, N. A., & Guseva, T. A. (1980). The effect of *Aphanomyces euteiches* Drechs. pathogen of root rot of pea, and Tachigaren on the chemical composition of pea plants. Byulleten' Vsesoyuznogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Rastenii 45–49.
- Vandemark, G. J., Kraft, J. M., Larsen, R. C., Gritsenko, M. A., & Boge, W. L. (2000). A PCR-based assay by sequence-characterized DNA markers for the identification and detection of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, 90, 1137–1144. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.10.1137>
- Vandemark, G. J., Barker, B. M., & Gritsenko, M. A. (2002). Quantifying *Aphanomyces euteiches* in alfalfa with a fluorescent polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 92, 265–272. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.3.265>
- Vandemark, G. J., & Porter, L. D. (2010). First Report of Lentil Root Rot Caused by *Aphanomyces euteiches* in Idaho. *Plant Disease*, 94, 480–480. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-4-0480B>
- Wallenhammar, A.-C., Almquist, C., Söderström, M., & Jonsson, A. (2012). In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR. *Plant Pathology*, 61, 16–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02477.x>
- Wang, Y., Zhang, W., Wang, Ying, & Zheng, X. (2006). Rapid and sensitive detection of *Phytophthora sojae* in soil and infected soybeans by species-specific polymerase chain reaction assays. *Phytopathology*, 96, 1315–1321. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1315>
- Wen, R., Lee, J., Chu, M., TONU, N., Dumonceaux, T., Gossen, B. D., Yu, F., & Peng, G. (2020). Quantification of *Plasmodiophora brassicae* Resting spores in soils using droplet digital PCR (ddPCR). *Plant Disease*, 104, 1188–1194. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0584-RE>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J., (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press, San Diego. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wicker, E., Hulle, M., & Rouxel, F. (2001). Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology*, 50, 433–442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00590.x>
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis, Second Edition, Use R! *Springer International Publishing*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L.D., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T. L., Miller, E., Bache, S. M., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D. P., Spinu, V., Takahashi, K., Vaughan, D., Wilke, C., Woo, K., & Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4, 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wickham, H., & Bryan J. (2019). readxl: Read Excel Files. R package version 1.3.1. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>
- Wilke, C.O. (2020). cowplot: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for 'ggplot2'. R package version 1.1.0. <https://CRAN.R-project.org/package=cowplot>
- Willsey, T.L., Chatterton, S., Heynen, M., & Erickson, A. (2018). Detection of interactions between the pea root rot pathogens *Aphanomyces euteiches* and *Fusarium* spp. using a multiplex qPCR assay. *Plant Pathology*, 67, 1912–1923. <https://doi.org/10.1111/ppa.12895>
- Wood, S.A., Pochon, X., Laroche, O., Ammon, U. von, Adamson, J., & Zaiko, A. (2019). A comparison of droplet digital polymerase chain reaction (PCR), quantitative PCR and metabarcoding for species-specific

- detection in environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 19, 1407–1419. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13055>
- 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, 542–551. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.07.006>
- Yokosawa, R., Kuninaga, S., and Teranaka, M. (1974). Note on pea root rot fungus, *Aphanomyces euteiches* Drechs. in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 40, 454–457 (in Japanese). <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.40.454>
- Zitnick-Anderson, K., del Rio Mendoza, L. E., Forster, S., & Pasche, J. S. (2020). Associations among the communities of soil-borne pathogens, soil edaphic properties and disease incidence in the field pea root rot complex. *Plant and Soil*, 457, 339–354. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04745-4>

## CHAPITRE II

Prédiction du risque de pourritures racinaires dues à *Aphanomyces euteiches* : structuration spatiale de la densité d'inoculum de l'agent pathogène et du potentiel nécrotique racinaire des sols de parcelles infestées ; définition d'une stratégie d'échantillonnage adaptée





## Prédiction du risque de pourritures racinaires dues à *Aphanomyces euteiches* : structuration spatiale de la densité d'inoculum de l'agent pathogène et du potentiel nécrotique racinaire des sols de parcelles infestées ; définition d'une stratégie d'échantillonnage adaptée

S. GIBERT<sup>1,2</sup>, V. EDEL-HERMANN<sup>1</sup>, E. GAUTHERON<sup>1</sup>, N. GAUTHERON<sup>1</sup>, R. MOUSSA MCOLO<sup>1</sup>, E. BERNAUD<sup>1</sup>, J. MICHEL<sup>1</sup>, J.-M. SOL<sup>2</sup>, A. BARDON DEBATS<sup>2</sup>, C. LAMBERT<sup>2</sup>, R. GALLAND<sup>2</sup>, G. CAPELLE<sup>2</sup>, C. STEINBERG<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Agroécologie, AgroSup Dijon, INRAE, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

<sup>2</sup> Société BONDUELLE SAS, Rue Nicolas Appert - BP 17, 59653 Villeneuve d'Ascq – CEDEX, France

### Résumé

*Aphanomyces euteiches* est un oomycète d'origine tellurique responsable de pourritures racinaires chez de nombreuses espèces de légumineuses. En France, cet agent pathogène est particulièrement problématique pour la culture du pois. L'évitement des parcelles infestées est, à ce jour, la principale méthode de gestion de la maladie. Les tests de potentiel nécrotique racinaire (PNR) et la quantification de la densité d'inoculum (DI) pathogène dans les sols par PCR digitale sont des outils adaptés pour évaluer le risque d'apparition de la maladie et identifier les parcelles propices à la culture du pois. Toutefois, la structuration de l'inoculum d'*A. euteiches* dans les sols de parcelles infestées est hétérogène. Elle requiert d'optimiser les stratégies d'échantillonnage pour l'obtention de valeurs moyennes précises nécessaires à la prise de décision. Dans cette étude, quatre parcelles de 1 ha situées dans la zone de production de pois du nord de la France avec des niveaux d'infestation variables ont été échantillonnées de manière systématique selon une grille régulière. Le PNR et la DI d'*A. euteiches* des sols échantillonnés ont été mesurés. L'analyse variographique des données révèle une agrégation significative de l'inoculum sous forme de foyers infectieux dans les parcelles infestées, avec une autocorrélation variant de 20 m à 82 m suivant la parcelle analysée. L'analyse comparative de différentes stratégies d'échantillonnage sur des simulations de parcelles infestées a mis en évidence qu'un échantillonnage systématique suivant un tracé selon deux W tête-bêche permet d'estimer la DI moyenne et le PNR moyen d'une parcelle de manière significativement plus précise qu'un échantillonnage aléatoire simple ou que le tracé en diagonale pratiqué actuellement par la profession. Avec ce type de tracé, 46 mesures de DI et 20 mesures de PNR sont suffisantes pour estimer la valeur

moyenne d'une parcelle de taille inférieur ou égale à 12 ha avec une erreur relative inférieure à 5% en moyenne. Avec 42 mesures de PNR, l'erreur sur l'estimation de la moyenne de la parcelle est inférieure à 3% dans 95% des parcelles infestées simulées.

**Mots-clés** : *Aphanomyces euteiches*, pourritures racinaires du pois, échantillonnage de sol, représentativité de l'échantillonnage, PCR digitale, évaluation du risque de maladie, densité d'inoculum (DI), potentiel nécrotique racinaire (PNR)

## 1. Introduction

*Aphanomyces euteiches* Drechsler est un oomycète d'origine tellurique responsable de pourritures racinaires chez de nombreuses légumineuses. Il peut être particulièrement destructeur dans les cultures de pois (*Pisum sativum* L.) et est présent dans la plupart des zones de production de pois à travers le monde. En France, la présence d'*A. euteiches* a été rapportée pour la première fois en 1933 (Labrousse 1933), mais cet agent pathogène est considéré comme un problème important pour les cultures de pois seulement depuis 1993 (Didelot & Chaillet 1995 ; Wicker & Rouxel 2001). L'augmentation de la fréquence des cultures de pois dans les rotations culturales aurait favorisé son développement.

Les premiers symptômes causés par *A. euteiches* apparaissent sous la forme de petites taches de couleur miel sur les racines de pois (Kraft & Pflieger 2001). Les lésions se développent rapidement sur l'ensemble du système racinaire pour remonter jusqu'à l'épicotyle qui prend alors une couleur brune et devient plus lâche et imbibé d'eau. Certains microorganismes opportunistes ou pathogènes du complexe parasitaire des pourritures racinaires du pois tels que *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Didymella* spp., *Rhizoctonia solani* ou encore *Thielaviopsis basicola* peuvent également infecter la plante (Gossen et al. 2016 ; Willsey et al. 2018). La sévérité des symptômes s'en trouve accentuée et les lésions peuvent prendre une couleur brune à noire. L'eau et les nutriments ne peuvent plus alimenter le reste de la plante qui est affectée de nanisme, de chlorose et flétrit. La production de cosses et le nombre de graines qu'elles contiennent sont fortement diminués et dans les cas les plus extrêmes, la plante meurt avant même la production des gousses (Kraft & Pflieger 2001).

Les oospores, qui sont produites par *A. euteiches* au niveau des tissus infectés, sont dispersées de manière hétérogène dans le sol à la mort de la plante hôte via les tissus en décomposition (Schren 1960). Leur paroi épaisse les rend particulièrement résistantes aux variations de température et à la dessiccation et leur permet de survivre plus de 10 ans dans l'environnement (Papavizas & Ayers 1974). A proximité d'une nouvelle plante hôte, les oospores peuvent germer sous l'influence de composés d'origine racinaire et produire de nouveaux hyphes ou un zoosporange. Des zoospores primaires et motiles, produites et libérées par le zoosporange, peuvent alors nager jusqu'à la racine de l'hôte par chimiotaxie pour débiter un nouveau cycle infectieux (Gaulin et al. 2007). Ce cycle infectieux et la longue

durée de vie des oospores dans le sol aboutissent à l'augmentation de l'inoculum du sol après chaque nouvelle culture de plante sensible et par conséquent à une aggravation de l'incidence et de la sévérité de la maladie sur les cultures sensibles suivantes (Bodker et al. 1993 ; Oyarzun et al. 1993). A l'échelle du champ, les plantes de pois victimes de pourritures racinaires dues à *A. euteiches* apparaissent fréquemment sous forme de foyers de tailles variables (Kraft & Pflieger 2001). Cette distribution hétérogène de la maladie a été confirmée par des mesures spatialisées de sa sévérité sur une parcelle de pois (Moussart et al. 2009).

A l'heure actuelle, en l'absence de méthode de lutte chimique et de cultivar de pois résistant, l'évitement des parcelles infestées par des rotations culturales demeure le principal moyen de lutte contre *A. euteiches*. Cette stratégie nécessite au préalable d'identifier les parcelles permettant la culture du pois. Différentes méthodes basées sur la quantification de la sévérité des symptômes ou du potentiel de l'inoculum du sol ont ainsi été proposées pour prédire l'apparition de pourritures racinaires du pois à partir d'échantillons de sol (Sherwood & Hagedorn 1958 ; Reiling et al. 1960 ; Pfender et al. 1981 ; Chan & Close 1987 ; Oyarzun 1993 ; Malvick et al. 1994). En France, des tests mesurant le potentiel nécrotique racinaire (PNR) du sol ont été développés. Ils consistent à faire pousser, dans du sol collecté en parcelle agricole, des pois d'une variété sensible à *A. euteiches* dans des conditions contrôlées optimales à l'expression de la maladie (Moussart et al. 2009). La lecture du test s'effectue après 15 jours de croissance d'un pois sensible dans le sol testé. L'importance des symptômes observés sur les racines est notée par un expérimentateur sur une échelle prédéfinie appelée indice de nécrose racinaire (INR) (Wicker et al. 2001). La valeur moyenne obtenue entre plantes et répétitions biologiques est comparée à une valeur seuil préalablement définie en dessous de laquelle la culture du pois est possible et au-dessus de laquelle la culture du pois est déconseillée. Une relation linéaire est en effet observée entre les résultats de ces bio-essais et la sévérité de la maladie au champ (Moussart et al. 2009). Malgré la variabilité observée autour du résultat qu'il fournit, le test est désormais recommandé en France par la plupart des acteurs du secteur.

Plus récemment, des méthodes moléculaires permettant la quantification directe des oospores d'*A. euteiches* dans le sol ont été proposées comme alternatives aux bio-essais. Deux méthodes de quantification par PCR quantitative ciblant respectivement une séquence unique et une séquence multicopie de la région internal transcribed spacer (ITS) 1 du génome d'*A.*

*euteiches* ont été développées et validées sur sol artificiellement inoculé en oospores (Sauvage et al. 2007 ; Gangneux et al. 2014). Cependant elles ont montré des limites de détection trop élevées (respectivement 200 et 10 oospores par gramme de sol) pour une application à du sol naturellement infesté. Il a été récemment montré que l'utilisation de la PCR digitale (droplet digital PCR, ddPCR) pour la quantification conjointe de ces deux cibles présentait une sensibilité suffisante pour quantifier la densité d'inoculum (DI) d'*A. euteiches* dans des sols naturellement infestés (Gibert et al. 2021). Le caractère prédictif de la mesure a notamment été vérifié par la mise en évidence d'une relation significative entre la sévérité des symptômes obtenue par des tests de PNR et la DI d'échantillons de sols provenant de quatre parcelles naturellement infestées par *A. euteiches*. L'outil moléculaire mis au point apparaît ainsi comme une alternative potentielle aux tests de PNR actuellement utilisés par la profession.

Cependant, la fiabilité d'un outil d'aide à la décision à destination des producteurs et basé sur l'une ou l'autre de ces méthodes de mesure prédictive du risque de pourritures racinaires reste très dépendante de la méthodologie d'échantillonnage utilisée en parcelle agricole. L'obtention d'une moyenne précise des mesures de DI ou de PNR à partir d'échantillons de sol collectés sur une parcelle, représentative du niveau de risque pour la culture, nécessite une stratégie d'échantillonnage adaptée à la dispersion de la variable considérée sur la parcelle. Cette stratégie d'échantillonnage doit être conçue de façon à assurer la précision, la répétabilité et la reproductibilité du résultat tout en contrôlant son coût. Les contraintes de temps et de coût de l'échantillonnage, mais également des analyses des échantillons de sol *a posteriori*, sont très importantes pour une utilisation en routine d'une telle stratégie. Dans ce cadre, un échantillonnage de type systématique, réalisé selon une grille ou un tracé géométrique spécifique (en diagonale, X, W, losange...) semble plus adapté que d'autres stratégies d'échantillonnage probabilistes comme l'échantillonnage aléatoire simple, l'échantillonnage stratifié, en grappes ou l'échantillonnage séquentiel, plus lourdes à mettre en œuvre ou destinées à l'analyse approfondie d'un site en particulier (Mihail & Alcorn 1987 ; Gruijter et al. 2006).

La précision d'une estimation de la moyenne d'une variable sur une parcelle donnée peut être contrôlée en ajustant le nombre d'échantillons (i.e. le nombre de mesures de la variable considérée). Celui-ci peut être déterminé par des méthodes statistiques classiques à

partir de valeurs de la variable considérée issues d'échantillonnages de sol réalisés en amont (Gilbert 1987). Cependant, cette méthode est limitée car elle nécessite les hypothèses de normalité pour de petits échantillons, c'est-à-dire de taille inférieure à une trentaine de mesures, et d'indépendance des données. La DI de certains agents phytopathogènes telluriques peut toutefois être structurée de manière agrégative, ce qui peut impliquer une corrélation spatiale entre les mesures si les prélèvements sont trop proches les uns des autres (Campbell & Noe 1985 ; Ristaino & Gumpertz 2000). L'utilisation des outils géostatistiques peut toutefois permettre de caractériser ces phénomènes spatiaux (Ristaino & Gumpertz 2000 ; Botero-Ramirez 2021). Ils constituent ainsi une alternative pour la conception de stratégies d'échantillonnage.

L'objectif de cette étude est de déterminer une stratégie d'échantillonnage optimisée pour l'utilisation d'un outil de prédiction du risque de pourritures racinaires pour les cultures de pois dans le nord de la France. Ce travail a été divisé en quatre étapes : 1) constituer, à partir d'un échantillonnage systématique de sol de parcelles naturellement infestées par *A. euteiches*, un jeu de données spatialisées de DI et de PNR ; 2) déterminer de manière statistique, à titre indicatif et à partir de la distribution des mesures de DI et de PNR (i.e. sans prise en compte de la structuration spatiale), le nombre théorique d'échantillons nécessaire à l'obtention d'une valeur moyenne à une précision souhaitée ; 3) caractériser, par une analyse variographique, la structuration spatiale de la DI et du PNR du sol dans les parcelles infestées ; 4) définir, par une analyse comparative de différentes stratégies d'échantillonnage établies par des simulations, une stratégie d'échantillonnage et un nombre d'échantillons appropriés pour l'obtention d'une valeur moyenne de la parcelle pour chacune des deux variables.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Caractéristiques des parcelles étudiées et échantillonnage

Cette étude est localisée sur le bassin de production de pois de la région des Hauts-de-France (France). Les parcelles et échantillons analysés sont les mêmes que ceux du chapitre précédent (Gibert et al. 2021). Deux parcelles, Renescure et Verpillières, très fortement infestées et situées respectivement dans le nord et dans le sud du bassin de production de pois, ont été échantillonnées en octobre 2017. Deux autres parcelles, Woestyne et Flers, plus faiblement infestées et situées respectivement dans le nord et dans le sud du bassin de production de pois, ont été échantillonnées en novembre 2018. Les coordonnées GPS de chaque parcelle ont été enregistrées et leurs historiques culturaux ont été recueillis auprès des agriculteurs (Tableau 8). Dans chacune des parcelles, une zone rectangulaire de 1 ha (L=141 m ; l=70 m) a été définie et divisée en 50 quadras de 14,14 m par 14,14 m. Un échantillonnage systématique de 4 L de sol situé de - 5 cm à - 20 cm de profondeur a été effectué à la bêche au centre de chaque quadra. Le sol a été transféré dans des boîtes en plastique et la bêche soigneusement lavée entre deux prélèvements. Les échantillons de sol ont été transférés au laboratoire et placés à sécher à température ambiante (20 °C). Chaque échantillon de sol a ensuite été tamisé avec un tamis de maille 4 mm puis mélangé manuellement pour l'homogénéiser. Un sous-échantillon de 60 mL a été prélevé à partir de chaque échantillon de sol tamisé pour effectuer les analyses moléculaires. La totalité des sous-échantillons a été lyophilisée puis stockée à -20 °C. Le reste des échantillons de sol destiné aux bio-essais et aux analyses physico-chimiques a été stocké dans des boîtes en plastique dans une pièce à une température de 18 °C.

Le Laboratoire d'Analyse des Sols d'INRAE (Arras, France) a effectué des analyses physico-chimiques à partir de 10 échantillons de sol sur les 50 disponibles par parcelle en suivant les normes internationales (ISO) ou françaises (NF). Les échantillons ont tout d'abord été broyés à des tailles de particules inférieures à 250 µm et conditionnés, puis la texture (distribution de la taille des particules), le pH eau, les carbonates de calcium (CaCO<sub>3</sub>), le carbone organique (C), la matière organique (MO), l'azote et le phosphore (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ont été analysés. La valeur moyenne sur les 10 échantillons analysés a été calculée pour chaque paramètre (Tableau 9).



**Tableau 8** : Coordonnées géographiques et historique cultural des parcelles de Renescure, Verpillière, Woestyne et Flers

Parcelle	Coordonnées géographiques	Surface de la parcelle (ha)	Date d'échantillonnage	Labour	Historique cultural						
					2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Renescure	50°44'34.4"N 2°21'45.2"E	18,1	oct-17	Non labour	Blé ( <i>Triticum aestivum</i> )	Haricot ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )*	Blé ( <i>Triticum aestivum</i> )	Lin ( <i>Linum usitatissimum</i> )	Blé ( <i>Triticum aestivum</i> )	Pois cv. Firenze ( <i>Pisum sativum</i> )*	/
Verpillière	49°39'52.7"N 2°47'42.6"E	4,85	oct-17	Labour	Orge de printemps ( <i>Hordeum vulgare</i> )	Maïs ( <i>Zea mays</i> )	Blé ( <i>Triticum aestivum</i> )	Betterave ( <i>Beta vulgaris</i> )	Blé ( <i>Triticum aestivum</i> )	Pois cv. Style ( <i>Pisum sativum</i> )*	/
Woestyne	50°44'55.7"N 2°23'04.1"E	29	nov-18	Non labour	Haricot ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )*	Blé ( <i>Triticum aestivum</i> )	Betterave ( <i>Beta vulgaris</i> )	Blé ( <i>Triticum aestivum</i> )	Lin ( <i>Linum usitatissimum</i> )	Blé ( <i>Triticum aestivum</i> )	Pois cv. Messenger ( <i>Pisum sativum</i> )*
Flers	50°03'17.5"N 2°48'52.7"E	12	nov-18	Labour	Maïs ( <i>Zea mays</i> )	Pois cv. Messenger ( <i>Pisum sativum</i> )*	Blé ( <i>Triticum aestivum</i> )	Blé ( <i>Triticum aestivum</i> )	Betterave ( <i>Beta vulgaris</i> )	Pomme de terre ( <i>Solanum tuberosum</i> )	Blé ( <i>Triticum aestivum</i> )

\* Espèce de légumineuse sensible à *Aphanomyces euteiches*.

**Tableau 9** : Texture et principaux paramètres physico-chimiques du sol des quatre parcelles échantillonnées

Parcelle	Texture			Physico-chimie							
	Type	Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	pH	C (g . Kg <sup>-1</sup> )	N (g . kg <sup>-1</sup> )	C/N	MO (g . Kg <sup>-1</sup> )	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg . Kg <sup>-1</sup> )	CaCO <sub>3</sub> (g . Kg <sup>-1</sup> )
Renescure	Sablo-argilo-limoneux	30	62	8	5,7	25,7	2,9	8,8	44,4	75	< 1
Verpillière	Argilo-limoneux	17	67	16	7	11,4	1,14	9,9	19,7	61	< 1
Woestyne	Argilo-limoneux	22	67	11	7,1	19,1	2,1	8,9	33,1	218	< 1,2
Flers	Argilo-limoneux	19	74	7	7,4	10,1	1,1	8,9	17,5	108	< 1,4

## 2.2 Mesures des potentiels nécrotiques racinaires et des densités d'inoculum des sols échantillonnés

Les valeurs de PNR et de DI utilisées dans cette étude sont issues du Chapitre I (Gibert et al. 2021). Les valeurs de PNR ont été mesurées pour chaque échantillon de sol lors de bio-essais en serres. Les producteurs de pois utilisent habituellement une moyenne de l'indice PNR pour noter les parcelles de pois. Cet indice est compris entre 0 et 5. Dans ce travail, pour comparer nos résultats avec les études précédentes et avec les pratiques des producteurs de pois, le PNR a été traité comme une variable quantitative bornée.

Les valeurs de DI sont des valeurs moyennes de mesures de la DI d'*A. euteiches* effectuées par ddPCR sur des ADN extraits avec trois répétitions d'échantillons de sols lyophilisés provenant des parcelles échantillonnées. Ces mesures de la DI, initialement exprimées en nombres de copies d'ITS1 par ng d'ADN analysé, ont été converties en nombres de génomes diploïdes par gramme de sol afin de donner une estimation du nombre d'oospores diploïdes d'*A. euteiches* présentes dans les sols analysés.

## 2.3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R version 4.0.1 pour Windows (R Core Team 2020). Les packages readxl v1.3.1 et tidyverse v1.3.0 ont été utilisés pour importer et analyser les données (Wickham et al. 2019 ; Wickham et Brian 2019).

### 2.3.1 Estimation statistique du nombre d'échantillons requis pour la mesure de la densité d'inoculum moyenne et du potentiel nécrotique racinaire moyen de chaque parcelle à une précision prédéfinie

Une première estimation statistique du nombre de mesures nécessaires pour obtenir une incertitude relative (IR) maximale de 5%, 10% et 20% a été effectuée sans tenir compte de la corrélation spatiale selon la méthode utilisée par Li et al. (2018, 2019). Cette estimation est valable pour un échantillonnage dont les échantillons sont distants au minimum de 14,14 m. Pour chacune des quatre parcelles échantillonnées et pour les deux variables étudiées (DI et PNR), la taille de l'échantillon de  $n = 50$  mesures a été considérée comme suffisamment grande pour que la moyenne de l'échantillon  $\bar{x}$  suive une loi de Student  $t(\mu, \sigma_{\bar{x}})$  à  $n - 1$  degrés de liberté où  $\mu$  est la moyenne de la population et  $\sigma_{\bar{x}}$  est l'erreur type de la

population. Pour chaque parcelle et pour chaque variable, la moyenne de l'échantillon  $\bar{x}$ , sa variance  $s^2$ , son écart type  $s$ , l'erreur type ( $s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$ ) de la moyenne et le coefficient de variation ( $CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$ ) ont été calculés.

L'intervalle de confiance à 95% de  $\bar{x}$  est :

$$IC95 = \bar{x} \pm t_{0,975} \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

L'incertitude relative IR, qui correspond à la demi largeur de l'IC95 (ou incertitude absolue) sur  $\bar{x}$ , est :

$$IR = \frac{t_{0,975} \times \frac{s}{\sqrt{n}}}{\bar{x}} = t_{0,975} \times \frac{CV}{\sqrt{n_{opt}}}$$

avec  $n_{opt}$  le nombre optimal de mesures pour l'IR souhaité.  $n_{opt}$  a été calculé pour différentes valeurs d'IR selon la formule :

$$n_{opt} \geq \left( t_{0,975} \times \frac{CV}{IR} \right)^2$$

### 2.3.2 Vérification de la présence d'autocorrélation spatiale de la densité d'inoculum et du potentiel nécrotique racinaire sur les parcelles échantillonnées

Une approche géostatistique a été utilisée pour caractériser la structure de l'inoculum d'*A. euteiches* à l'échelle des quatre parcelles échantillonnées (Chiles & Delfiner 1999 ; De Fouquet 2011 ; Oliver & Webster 2014). L'Indice de Moran global (I de Moran) d'autocorrélation spatiale a été calculé pour la DI et le PNR de chaque parcelle en utilisant la fonction moran.test du package spdep v1.1.5 (Bivand et al. 2018). La matrice de poids nécessaire au calcul de l'indice a été construite à l'aide des fonctions dnearneigh (distance entre échantillons < 15m, correspondant à une matrice de contiguïté de type « ROOK ») et nb2listw de spdep.

### 2.3.3 Simulation de 100 parcelles infestées composites de tailles variables

Les jeux de données de DI et de PNR obtenus à partir des quatre parcelles de 1 ha échantillonnées ont été utilisés pour simuler 100 parcelles infestées composites d'une surface de 12 ha. Pour cela, pour chacune des quatre parcelles, quatre coordonnées cartésiennes ont

été attribuées à chacune des valeurs de DI et de PNR en définissant respectivement comme origine des axes, chacun des quatre angles de la parcelle. Cent simulations de parcelles rectangulaires de 12 ha ont été construites en juxtaposant douze parcelles (3 × 4) de 1 ha tirées au sort de façon aléatoire parmi ces seize possibilités (i.e. quatre orientations pour chacune des quatre parcelles). De nouvelles coordonnées cartésiennes ont été attribuées à chacune des simulations de parcelles de 12 ha générées en prenant comme origine des axes, un des quatre angles de chaque parcelle. Les 100 simulations de parcelles obtenues avec le jeu de données de DI et les 100 simulations de parcelles obtenues avec le jeu de données de PNR ont fait l'objet d'un krigeage (Cressie 1993).

#### **2.3.4 Estimation des variogrammes et krigeages ordinaires des quatre parcelles échantillonnées et des 100 simulations de parcelles infestées**

Un variogramme a été construit pour la DI et le PNR sur chaque parcelle afin de caractériser la structure de la corrélation spatiale suivant une méthodologie décrite pour caractériser les patrons spatiaux de communautés microbiennes du sol en milieu agricole (Constancias et al. 2015). Pour cela, le package GeoR v1.8.1 a été utilisé (Paulo et al. 2020). Le PNR et la DI ne suivant pas une distribution normale sur toutes les parcelles, une transformation non paramétrique des données par ordre de rang a d'abord été effectuée (Juang et al. 2001). Un variogramme empirique a été calculé par la méthode des moments (Matheron 1965) et un modèle a été ajusté au variogramme empirique par la méthode des moindres carrés ordinaires, la méthode des moindres carrés non linéaires pondérés ou la méthode du maximum de vraisemblance (fonction likfit de GeoR). Le modèle de Matérn, qui est une généralisation de plusieurs modèles théoriques de variogramme permettant de décrire différents processus spatiaux, a été retenu pour l'ensemble des variogrammes effectués (Minasny & McBratney 2005). Pour chaque parcelle et chaque variable, la validité du modèle a été évaluée en utilisant les résultats d'une validation croisée dite « leave-one-out », basée sur l'omission d'un élément et la ré-estimation de la variable à partir des données restantes, à l'aide de la fonction krige.cv de gstat v2.0.6 (Pebesma 2004; Gräler et al. 2016). L'analyse graphique des variogrammes et des critères globaux comme l'erreur quadratique moyenne des prédictions, l'erreur quadratique moyenne standardisée, l'erreur quadratique médiane standardisée, la corrélation entre valeurs observées et prédites et l'absence de

corrélation entre valeurs prédites et résidus a été utilisée pour évaluer la validité du modèle (Oliver & Webster 2014).

La distribution de la DI et du PNR sur les parcelles a ensuite été cartographiée par krigeage ordinaire sur la base des variogrammes estimés, à nouveau avec les fonctions krige de gstat v2.0.6 (Pesbesma 2004 ; Gräler et al. 2016). Cette technique de géostatistique est utilisée pour prédire les valeurs d'une variable d'intérêt dans les espaces non échantillonnés de la parcelle où elle est inconnue, en utilisant les valeurs connues proches du point d'intérêt. Les prédictions du krigeage ordinaire ont été effectuées dans l'espace de l'ordre de rang puis transformées dans l'espace d'origine. Les prédictions par krigeage ordinaire ont été effectuées selon une grille de maille suffisamment fine pour tester différentes stratégies d'échantillonnage (n = 40 328 prédictions pour les quatre parcelles de 1 ha et n = 766 800 prédictions pour les simulations de parcelles de 12 ha).

### **2.3.5 Comparaison de la précision et de la reproductibilité de différentes stratégies d'échantillonnage pour la mesure de la densité d'inoculum d'*Aphanomyces euteiches* et du potentiel nécrotique racinaire**

Pour les deux variables analysées, les données prédites par krigeage ordinaire des quatre parcelles de 1 ha échantillonnées et des 100 simulations de parcelles infestées ont été utilisées pour simuler des collectes d'échantillons de sol suivant différentes stratégies d'échantillonnage : un échantillonnage aléatoire simple (EAS) ou des échantillonnages systématiques suivant un tracé en diagonale, en losange, en W, selon deux W tête-bêche ou en X. Pour chaque stratégie, des tirages de 0 à 100 valeurs ont été effectués à partir des jeux de données afin de simuler des échantillonnages de tailles croissantes. Pour cela, les coordonnées d'un nombre de points correspondant à la taille de l'échantillon ont été tirées de manière aléatoire pour l'EAS et de manière à être régulièrement espacées le long des tracés prédéfinis. Pour chaque jeu de données, la valeur prédite par krigeage se trouvant à la distance la plus proche de chaque point a été sélectionnée. La moyenne arithmétique  $\bar{x}_{\text{échantillon}}$  a été calculée pour chaque stratégie et chaque taille d'échantillonnage. La moyenne arithmétique de la totalité des valeurs prédites de chaque parcelle  $\bar{x}_{\text{parcelle}}$  et son intervalle de confiance à 95% (IC95) ont été calculés. Afin de déterminer la précision associée à chaque

stratégie d'échantillonnage, l'erreur relative (ER) de l'estimation de la moyenne de la parcelle pour la variable considérée (DI ou PNR) a été calculée suivant la formule :

$$ER = \frac{\bar{x}_{\text{échantillon}} - \bar{x}_{\text{parcelle}}}{\bar{x}_{\text{parcelle}}} \times 100$$

Etant donné le grand nombre de valeurs prédites ( $n = 40\,328$  pour les quatre parcelles de 1 ha et  $n = 766\,800$  pour les simulations de parcelles infestées de 12 ha), la moyenne des valeurs de la parcelle a été considérée comme une estimation précise de la moyenne  $\mu$  de la population de la parcelle pour la variable considérée.

Le package *sf* (Pebesma et al. 2018) a été utilisé pour effectuer les différentes simulations d'échantillonnage et pour cartographier la structuration de la DI et du PNR sur les parcelles.

### 3. Résultats

#### 3.1 Distribution de la densité d'inoculum d'*Aphanomyces euteiches* et du potentiel nécrotique racinaire dans des parcelles infestées et estimation statistique du nombre d'échantillons requis pour une précision prédéfinie

Les DI moyennes des parcelles échantillonnées varient de  $15,6 \pm 4,3$  génomes diploïdes par g de sol sec, pour la parcelle de Flers, à  $36,7 \pm 7,6$  génomes diploïdes par g de sol sec pour la parcelle de Renescure (Table 10). Dans les parcelles de Woestyne et de Flers, qui ont des niveaux d'infestation moins élevés que les parcelles de Renescure et de Verpillières, la distribution des DI est asymétrique, avec une médiane bien inférieure à la moyenne. Cette asymétrie est notamment due à une fréquence élevée de valeurs de DI inférieures à 5 génomes diploïdes par g de sol sec dans les parcelles de Woestyne (32%) et de Flers (40%). Elle traduit également la sensibilité de la DI moyenne aux valeurs extrêmes, notamment pour la parcelle de Woestyne, pour laquelle 18% des échantillons de sol ont une DI supérieure à 70 génomes diploïdes par g de sol sec.

**Tableau 10** : Statistiques générales et taille d'échantillon optimale sans prise en compte de la corrélation spatiale

Parcelle	Variable	$\bar{x}$ (IC 95%)	Med	s	CV (%)	$n_{opt}$		
						IR = 5 %	IR = 10 %	IR = 20%
Renescure	DI	36,7 (29,5 - 44,5)	31,0	27,3	74,4	895	224	56
	PNR	2,7 (2,5 - 2,9)	3,0	0,9	32,6	172	43	11
Verpillières	DI	26,8 (22,8 - 30,8)	24,4	14,5	54,0	472	118	30
	PNR	3,2 (3,0 - 3,4)	3,2	0,7	22,6	83	21	6
Woestyne	DI	32,7 (23,0 - 43,4)	21,1	37,3	113,9	2096	524	131
	PNR	1,3 (1,0 - 1,6)	1,1	1,0	81,9	1084	271	68
Flers	DI	15,6 (11,5 - 19,9)	11,1	15,5	99,5	1599	400	100
	PNR	1,5 (1,1 - 1,9)	1,3	1,4	94,6	1446	362	91

$\bar{x}$ , Med, s et CV représentent respectivement la moyenne, la médiane, l'écart-type et le coefficient de variation de la densité en inoculum (DI) ou du potentiel nécrotique racinaire (PNR) de la parcelle. IC95% représente l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne.  $n_{opt}$  représente le nombre d'échantillons optimal pour une l'incertitude relative IR indiquée.



La DI médiane coïncide mieux avec le PNR moyen des parcelles. Celui-ci est plus élevé pour les parcelles de Renescure ( $2,7 \pm 0,2$ ) et de Verpillières ( $3,2 \pm 0,2$ ) que pour les parcelles de Woestyne ( $1,3 \pm 0,3$ ) et Flers ( $1,5 \pm 0,4$ ). La distribution des PNR, qui n'ont pas de valeurs extrêmes car bornés entre 0 et 5, a une variabilité globalement inférieure à celle de la distribution des DI (Table 10). Les coefficients de variation (CV) sont ainsi de 22,6% pour le PNR contre 54% pour la DI pour la parcelle de Verpillières et de 81,9% pour le PNR contre 113,9% pour la DI sur la parcelle de Woestyne. Enfin, l'inoculum d'*A. euteiches* et son expression pathogène sont répartis de manière plus homogène dans les parcelles avec un niveau d'infestation plus élevé de Renescure et de Verpillières (CV de respectivement 74,4% et 54,0% pour la DI et de 32,6% et 22,6% pour le PNR) que dans les parcelles avec un niveau d'infestation plus faible de Woestyne et de Flers (CV de respectivement 113,9% et 99,5% pour la DI et 81,9% et 94,6% pour le PNR).

Cette variabilité se répercute sur le nombre d'échantillons nécessaires pour atteindre une incertitude relative (IR) souhaitée sur l'estimation de la moyenne dans chacune des quatre parcelles (Table 10). Sans prise en compte de la corrélation spatiale, il faut ainsi 30 échantillons pour la parcelle de Verpillières, 56 échantillons pour la parcelle de Renescure et respectivement 100 et 131 échantillons pour les parcelles moins infestées de Flers et Woestyne pour atteindre une IR de 20% pour l'estimation de la DI moyenne. Il faut seulement six mesures pour la parcelle de Verpillières, 11 mesures pour la parcelle de Renescure et respectivement 68 et 91 mesures pour les parcelles de Woestyne et de Flers pour atteindre une IR de 20% sur l'estimation du PNR moyen. Les tailles d'échantillonnage nécessaires pour estimer le PNR moyen avec une IR inférieure à 10% sont respectivement de 21 et 43 échantillons sur les parcelles de Verpillières et de Renescure. Elles sont cependant très élevées pour les parcelles de Woestyne (271 échantillons) et de Flers (362 échantillons) sur lesquelles le PNR est distribué de façon plus hétérogène. Les tailles d'échantillons nécessaires pour estimer la DI moyenne avec une IR de 10% sont comprises entre 118 pour la parcelle de Verpillières et 524 pour la parcelle de Woestyne, et ces valeurs sont encore multipliées par 4 environ pour une IR de 5% (Table 10). Il apparaît ainsi inenvisageable, d'un point de vue opérationnel et économique, d'atteindre cette précision de 5% ou 10% avec la stratégie d'échantillonnage utilisée.

### **3.2 Analyse de la structuration spatiale de la densité d'inoculum d'*Aphanomyces euteiches* et du potentiel nécrotique racinaire dans les parcelles infestées échantillonnées.**

Les indices I de Moran montre la présence d'autocorrélation spatiale positive significative entre les mesures de DI dans les parcelles de Woestyne, Flers et Renescure (Tableau 11). De même, les I de Moran montrent que les mesures de PNR sont spatialement autocorrélées de manière significative sur les parcelles de Woestyne, Flers et Verpillières (Tableau 11). La présence de cette autocorrélation significative des mesures de DI et de PNR dans ces parcelles confirme la structuration spatiale de type agrégative, sous forme de foyers infectieux, de l'inoculum et de son expression pathogène. Les valeurs des statistiques I de Moran de la DI et du PNR apparaissent plus élevées pour les parcelles plus faiblement infestées de Woestyne et de Flers que pour les parcelles fortement infestées de Renescure et Verpillières. Cela indique que la variabilité importante de la DI et du PNR dans les parcelles de Woestyne et de Flers est due à une structuration en foyers plus marquée dans ces parcelles que dans les parcelles fortement infestées de Renescure et de Verpillières. Enfin, la présence de cette autocorrélation spatiale entre les mesures de DI et entre les mesures de PNR indique que la dispersion réelle (i.e. l'écart-type et le CV) des estimations du PNR moyen et de la DI moyenne est potentiellement sous-estimée. Ainsi, les tailles d'échantillonnages précédemment calculées sans prendre en compte cette autocorrélation spatiale sont potentiellement aussi sous-estimées.

**Tableau 11** : Indice d'autocorrélation spatiale et paramètres des modèles (Matérn) de variogrammes utilisés pour la densité d'inoculum (DI) d'*Aphanomyces euteiches* et le potentiel nécrotique racinaire (PNR) de chacune des parcelles échantillonnées. Les paramètres du modèle sont présentés pour les variables normalisées par transformation quantile Gaussienne

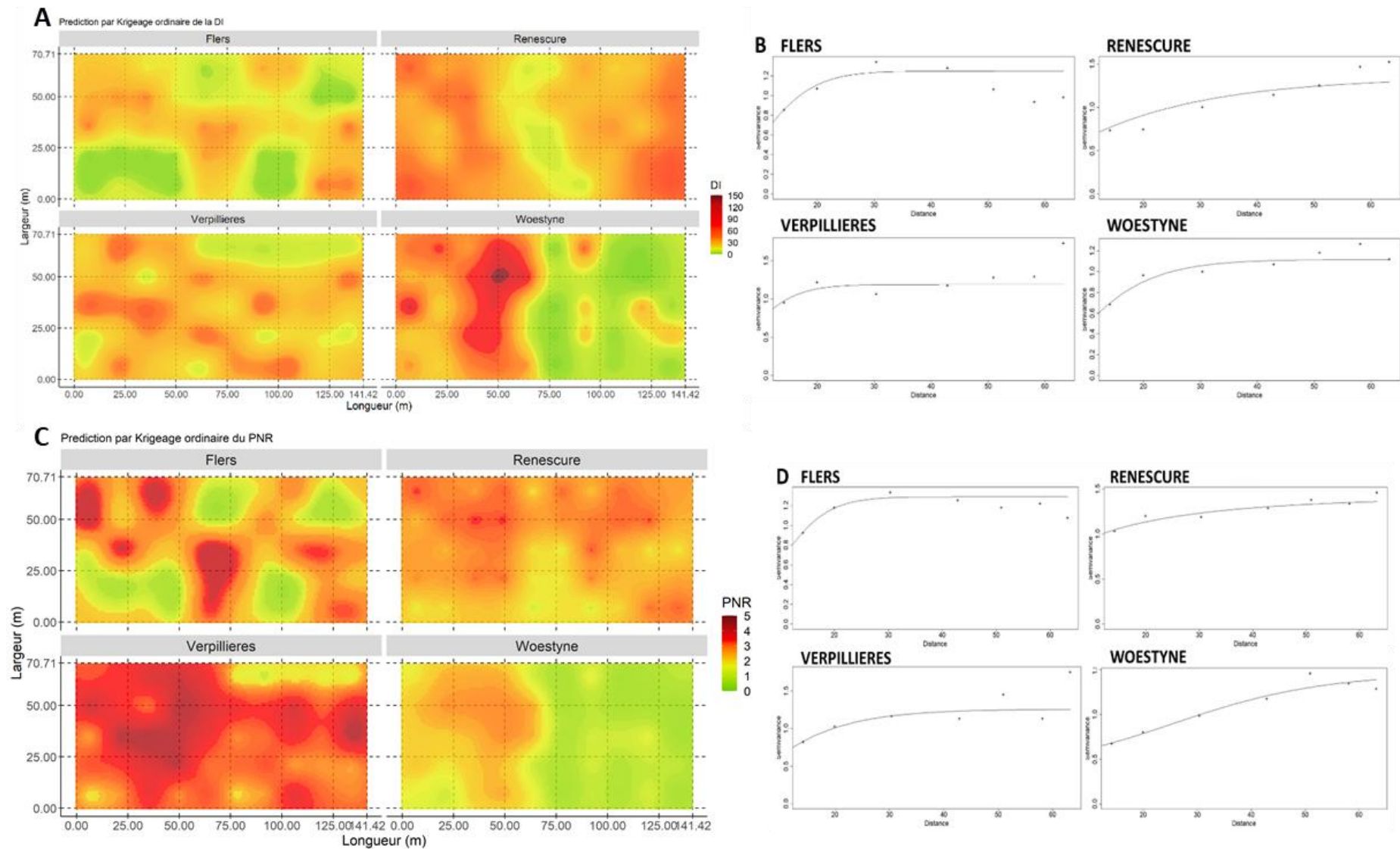
Parcelle	Variable	I de Moran	Pépite (C <sub>0</sub> )	Semivariance au Palier (C <sub>1</sub> =C <sub>0</sub> +C)	Variance structurelle <sup>a</sup> (%) (C <sub>1</sub> /C <sub>0</sub> +C <sub>1</sub> )	Portée pratique (m) (distance à 95% du palier)
Renescore	DI	0.23**	0,22	1,13	83	64
	PNR	0.13	0,03	1,38	98	42
Verpillière	DI	0.08	0	1,19	100	20
	PNR	0.38***	0	1,26	100	70
Woestyne	DI	0.42***	0	1,12	100	82
	PNR	0.56 ***	0,56	0,90	62	68
Flers	DI	0.34***	0	1,25	100	24
	PNR	0.28 **	0	1,29	100	23

(\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )

<sup>a</sup> La variance structurelle représente la part de variance spatialement structurée.

L'analyse variographique confirme la nature agrégative de la structuration spatiale de la DI d'*A. euteiches* et du PNR. Cette nature agrégative dépend de la parcelle étudiée et de son niveau d'infestation (Tableau 11 ; Figure 10). La portée pratique du variogramme (95% de palier) correspond à la distance à partir de laquelle la covariance va s'annuler ( $C = C(0) = s^2$ ) et à partir de laquelle il n'y a plus de dépendance spatiale. Cette distance peut être utilisée comme distance optimale entre deux échantillons, car les échantillons prélevés à une distance inférieure à la portée sont spatialement dépendants (Carter & Gregorich 2008). Cette portée pratique est respectivement de 23 m et 24 m pour le PNR et la DI pour la parcelle de Flers, sur laquelle cette distance de dépendance spatiale est la plus courte et les foyers sont de tailles plus modestes. Elle est de 83 m et de 68 m pour la DI et le PNR, respectivement, sur la parcelle de Woestyne. La portée pratique du variogramme pour la DI sur la parcelle de Verpillières (20 m) est très nettement inférieure à celle du variogramme pour le PNR sur cette parcelle (70 m).

Enfin, les cartographies obtenues par krigeage ordinaire confirment la structuration spatiale de la DI en foyers sur les quatre parcelles (Figure 10). La variabilité importante des valeurs de DI et de PNR sur les parcelles de Flers et de Woestyne est due à la présence conjuguée de zones non infestées et de foyers de DI élevés. La DI et le PNR sont répartis de façon plus homogène sur les parcelles de Renescure et de Verpillières, sur lesquelles on distingue peu de zones non infestées. En comparant les cartes obtenues pour la DI et le PNR, on observe que l'inoculum pathogène a, dans une certaine mesure, tendance à être exprimé de façon différentielle selon les parcelles : cette expression est plus prononcée pour les parcelles de Flers et Verpillières (i.e. des foyers avec un niveau de DI moyen mais avec des PNR assez élevées) que pour la parcelle de Woestyne (i.e. un foyer avec un niveau d'inoculum élevé mais un PNR moins élevé). Ce résultat suggère l'existence dans le sol de facteurs biotiques ou abiotiques de régulation de l'expression de l'activité pathogène d'*A. euteiches*.



**Figure 10 :** Cartographie de la structuration spatiale (A) et variogrammes (B) de la densité d'inoculum (DI), et cartographie de la structuration spatiale (C) et variogrammes (D) du potentiel nécotique racinaire (PNR) sur les parcelles de Flers, Renescure, Verpillières et Woestyne. L'échelle des couleurs de la DI est adaptée au risque pour la culture de pois selon la relation DI - PNR préalablement mise en évidence (Chapitre I).

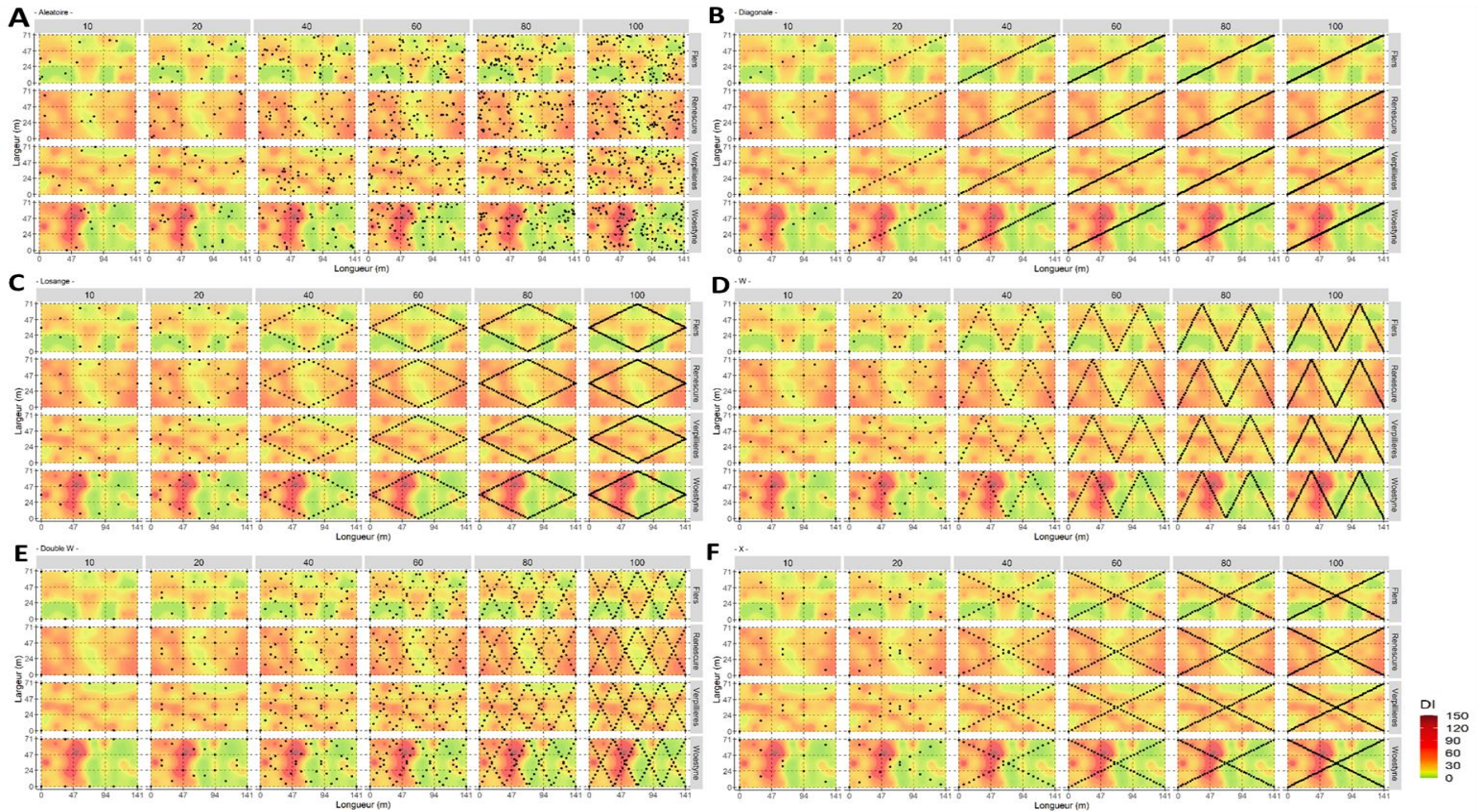
### **3.3 Analyse comparative de différentes stratégies d'échantillonnage appliquées aux prédictions par krigeage ordinaire de la densité d'inoculum et du potentiel nécrotique racinaire sur les quatre parcelles échantillonnées**

Différentes stratégies d'échantillonnage (EAS, diagonale, losange, W, deux W tête-bêche et X) ont été testées à partir des estimations de DI et de PNR des quatre parcelles obtenues par krigeage ordinaire (Figure 11). Les moyennes générales  $\bar{x}_{parcelle}$  des estimations de DI sur les parcelles de Flers, Renescure, Verpillières et Woestyne sont respectivement de 18,4, 32,7, 26,4 et 27,5 génomes diploïdes par g de sol sec et les IR associées sont respectivement de 0,8%, 0,4%, 0,4% et 1,0%. De même pour les estimations de PNR, les moyennes générales  $\bar{x}_{parcelle}$  pour les parcelles de Flers, Renescure, Verpillières et Woestyne sont respectivement de 2,3, 2,6, 3,2 et 1,5 avec des IR associées de 0,4%, 0,2%, 0,2%, 0,5%. Pour les parcelles de Flers, Renescure, Verpillières et Woestyne, les CV sont respectivement de 75%, 39%, 40% et 98% pour la DI et de 39%, 15%, 17% et 50% pour le PNR.

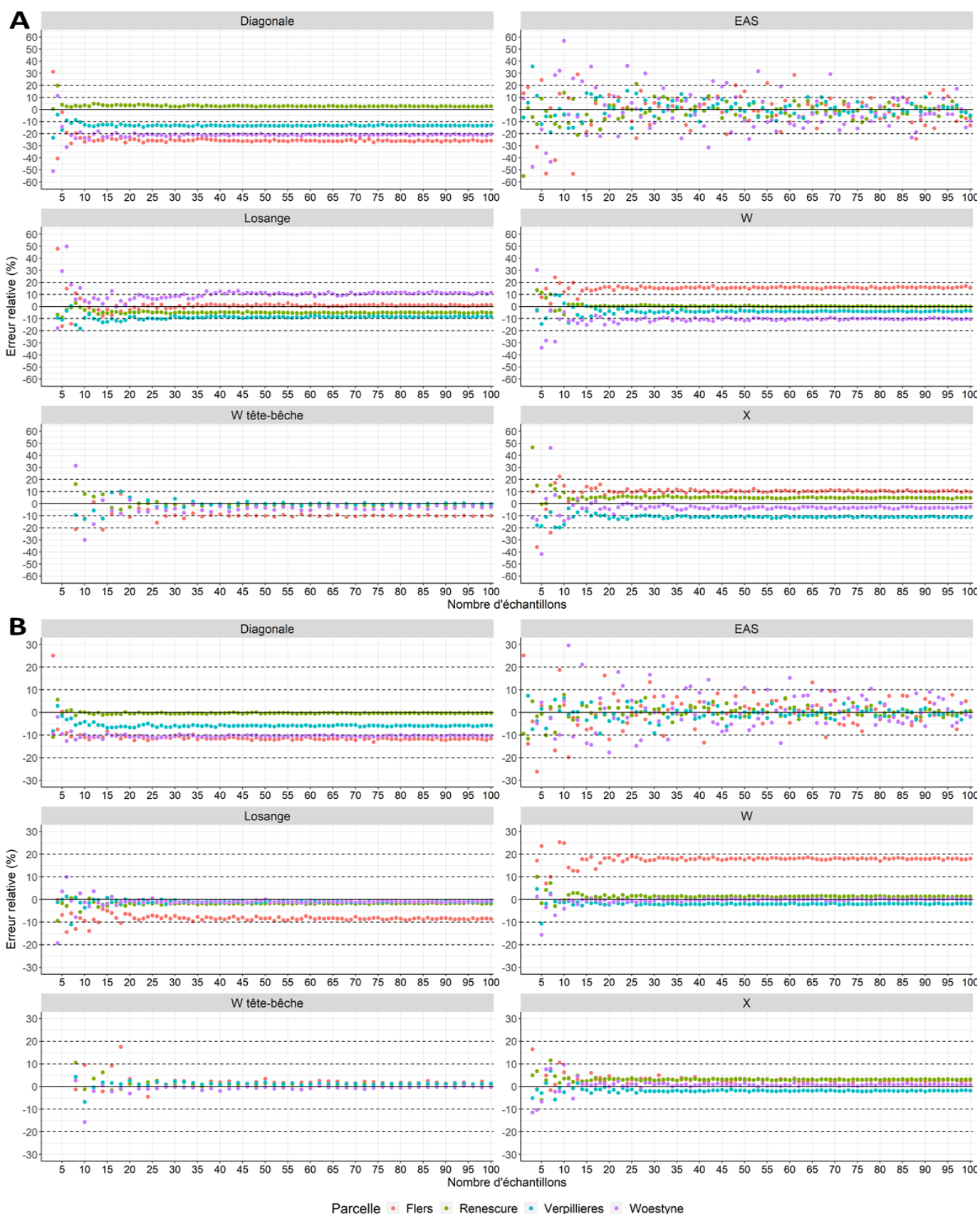
L'erreur relative de l'estimation de la moyenne de chaque parcelle varie suivant la stratégie adoptée et suivant le nombre d'échantillons (Figure 12). Pour une même stratégie et pour un même nombre d'échantillons, l'ER est globalement moins élevée pour le PNR que pour la DI. Les ER obtenues pour les différentes stratégies d'échantillonnage systématique selon un tracé (diagonale, losange, W, deux W tête-bêche, et X) tendent, avec l'augmentation du nombre d'échantillons, vers une valeur différente de 0 qui varie suivant la parcelle et la stratégie d'échantillonnage. Pour les deux variables et dans chacune des parcelles étudiées, les stratégies d'échantillonnage systématique permettent une stabilisation de l'ER à partir d'un nombre d'échantillons plus faible que pour l'EAS, au-delà duquel l'ER ne diminue plus (Figure 12).

L'échantillonnage selon deux W tête-bêche est la stratégie offrant la meilleure précision, c'est-à-dire pour laquelle l'ER pour l'estimation de la DI moyenne et du PNR moyen de chacune des quatre parcelles testées est la plus faible. En valeur absolue, à partir d'un nombre de mesures supérieur ou égal à 20, le PNR moyen est estimé avec une ER inférieure à 5% pour les quatre parcelles et la DI moyenne est estimée avec une ER inférieure à 10% pour les parcelles de Renescure, Verpillières et Woestyne et inférieure à 15% pour la parcelle de Flers.





**Figure 11** : Patterns d'échantillonnage des différentes stratégies testées sur les densités d'inoculum (DI) des parcelles de Flers, Renescure, Verpillères et Woestyne estimées par krigeage ordinaire : échantillonnage aléatoire simple (A), selon une diagonale (B), un losange (C), un W (D), deux W tête-bêche (E), un X (F). Les tailles d'échantillons représentées sont de 10, 20, 40, 60, 80 et 100 échantillons. Les patterns sont identiques pour les données de potentiels nécrotiques racinaires (PNR). L'échelle des couleurs de la DI est adaptée au risque pour la culture de pois selon la relation DI - PNR préalablement mise évidence (Chapitre I).



**Figure 12** : Erreur relative sur l'estimation de la densité d'inoculum moyenne (A) et du potentiel nécrotique racinaire moyen (B) obtenue avec différentes stratégies d'échantillonnage de sol (en titre de chaque graphique ; EAS, échantillonnage aléatoire simple) sur les parcelles de Flers, Renescure, Verpillières et Woestyne en fonction de la taille de l'échantillon. Les données utilisées ont été obtenues par krigeage ordinaire effectué à partir de valeurs observées de chacune des deux variables (n=50).

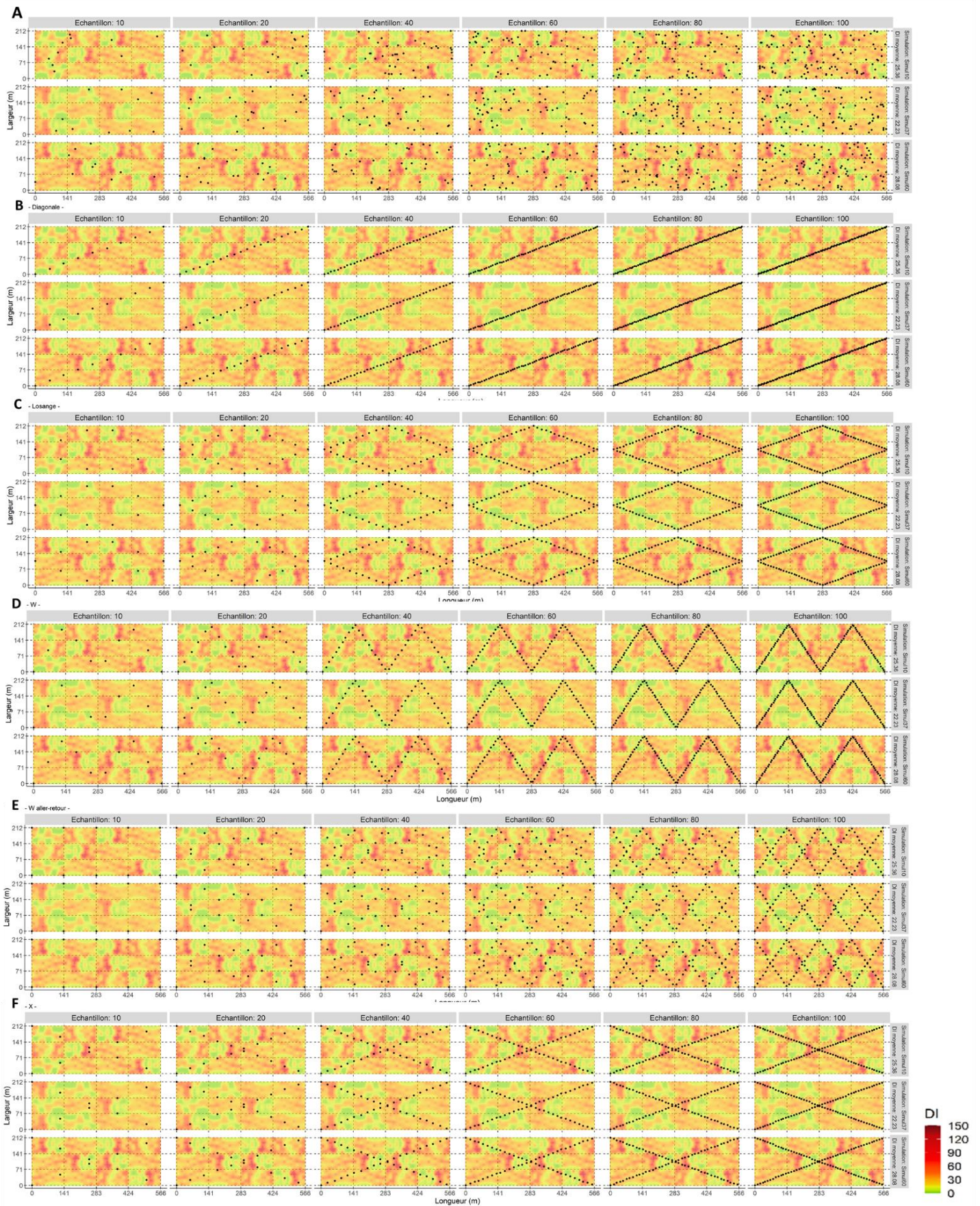


*A contrario*, l'échantillonnage en diagonale est le moins précis pour l'estimation de la DI moyenne et du PNR moyen sur les parcelles testées. La moyenne de ces deux variables par parcelle est très largement sous-estimée pour trois parcelles sur quatre. La DI moyenne des parcelles de Flers et Woestyne est ainsi largement sous-estimée avec une ER inférieure à -20% pour toutes les tailles d'échantillonnage testées (Figure 12). De même, le PNR moyen de ces deux parcelles est sous-estimé avec une ER inférieure à -10% pour toutes les tailles d'échantillonnage testées. En valeur absolue, les stratégies d'échantillonnage en losange et en X permettent d'estimer la DI moyenne et le PNR moyen avec une ER respectivement inférieure à 15% et à 10% à partir de 20 échantillons.

### **3.4 Comparaison de la précision de différentes stratégies d'échantillonnage de sol sur 100 simulations de parcelles infestées**

Les 100 simulations de parcelles infestées ont permis d'obtenir des niveaux de DI moyenne qui s'échelonnent de 22 à 28 génomes diploïdes d'*A. euteiches* par g de sol sec avec des CV variant de 32% à 77% (données non présentées). De même pour le PNR, les 100 simulations de parcelles infestées ont généré un PNR moyen par parcelle allant de 2 à 2,6 avec des CV variant de 21% à 44% (données non présentées). Pour la DI, l'IR de  $\bar{x}_{parcelle}$  pour les 100 simulations est comprise entre 0,7% et 1,8%. De même pour le PNR, l'IR de  $\bar{x}_{parcelle}$  pour les 100 simulations est comprise entre 0,4% et 1,0 %. Pour les deux variables étudiées,  $\bar{x}_{parcelle}$  est donc une estimation précise de la moyenne  $\mu$  de la population de chacune de ces simulations de parcelles infestées.

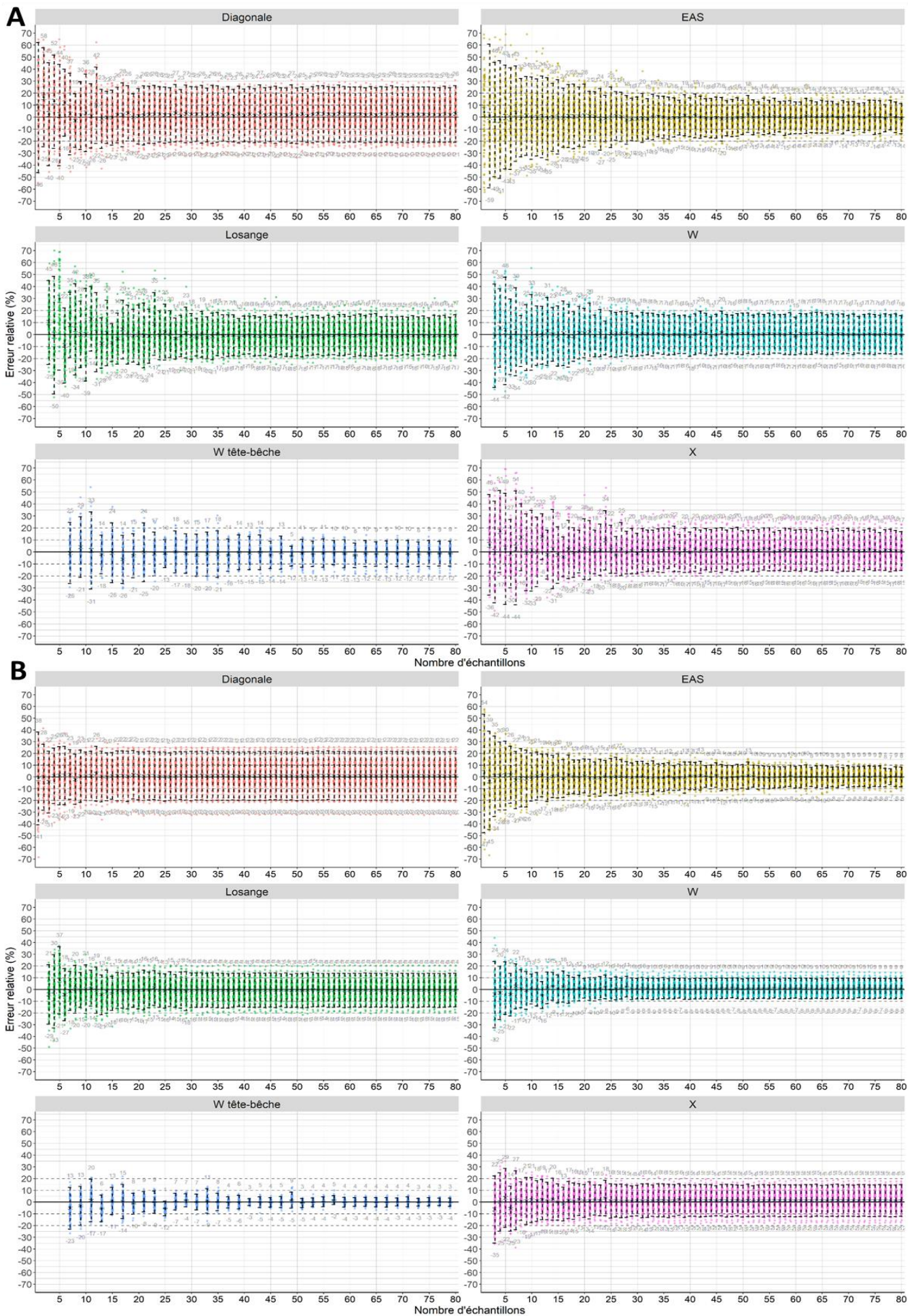
Les différentes stratégies d'échantillonnage ont été testées à partir des estimations de DI et de PNR des 100 simulations de parcelles infestées pour chaque variable (Figure 13). Les tendances observées sur les données des parcelles de Flers, Woestyne, Renescure et Verpillières ont été confirmées par l'analyse effectuée sur ces simulations de parcelles. L'échantillonnage selon deux W tête-bêche apparaît comme la stratégie la plus adaptée pour l'estimation de la DI moyenne et du PNR moyen, car, comparativement aux autres stratégies testées, elle permet de minimiser l'ER (Figure 14 et Figure 15). Ainsi, d'après les simulations effectuées, l'échantillonnage selon deux W tête-bêche permet d'estimer la DI moyenne avec une ER significativement inférieure à celle de toutes les autres stratégies d'échantillonnage testées à partir de 46 mesures (Figure 15-A). Avec ce nombre d'échantillons, l'ER sur



**Figure 13** : Exemples des différentes stratégies d'échantillonnage testées sur les densités d'inoculum (DI) sur trois des 100 simulations de parcelles : échantillonnage aléatoire simple (A), selon une diagonale (B), un losange (C), un W (D), deux W tête-bêche (E), un X (F). Les tailles d'échantillons représentées sont de 10, 20, 40, 60, 80 et 100 échantillons. Les patterns sont identiques pour les données de potentiels nécrotiques racinaires (PNR). L'échelle des couleurs de la DI est adaptée au risque pour la culture de pois selon la relation DI - PNR préalablement mises en évidence (Chapitre I).



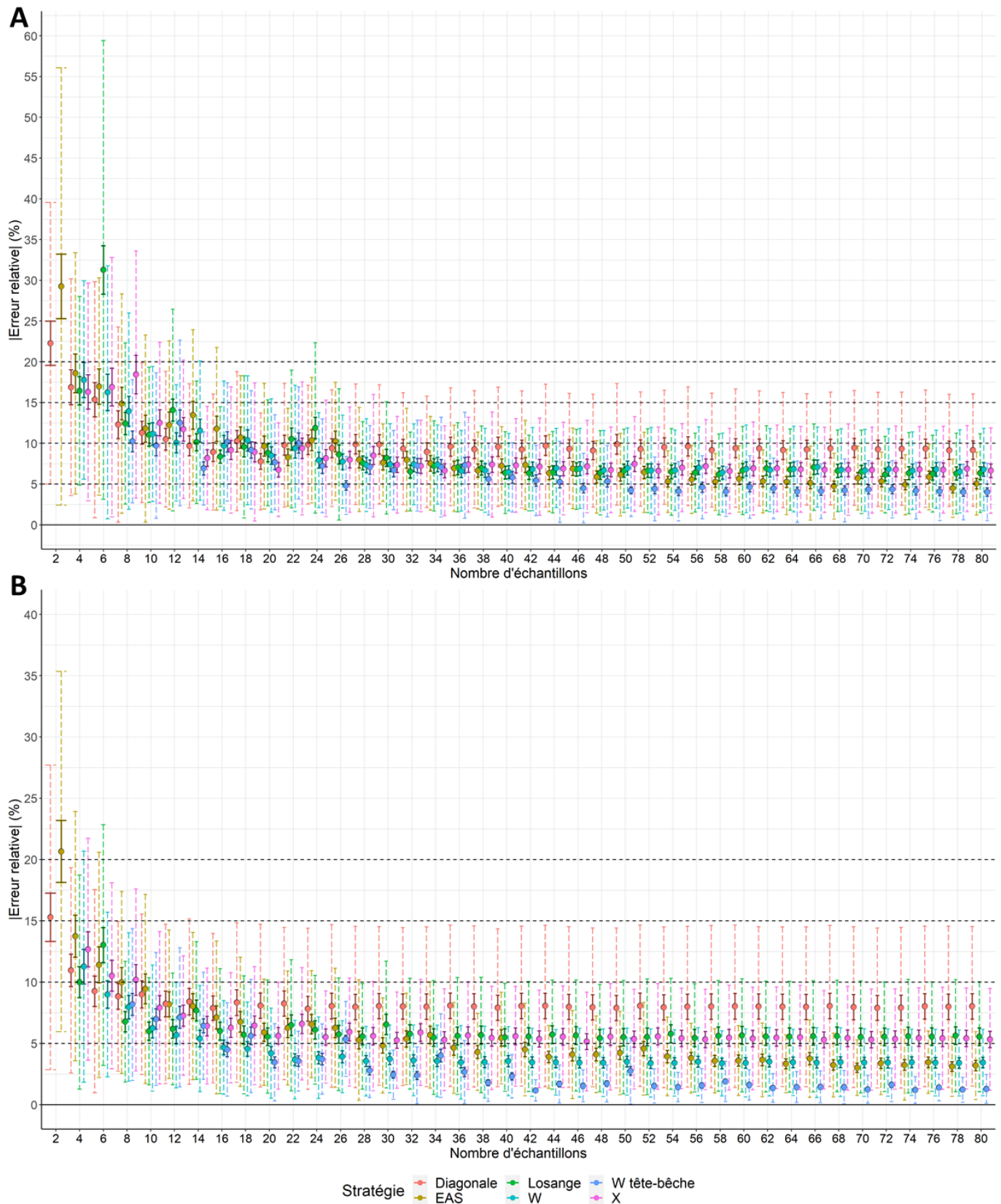
CHAPITRE II : Prédiction du risque de pourritures racinaires dues à *Aphanomyces euteiches* : structuration spatiale de la densité en inoculum de l'agent pathogène et du potentiel nécotrique racinaire des sols de parcelles infestées ; définition d'une stratégie d'échantillonnage adaptée



**Figure 14** : Distribution de l'erreur relative sur l'estimation de la densité d'inoculum moyenne (**A**) et du potentiel nécrotique racinaire moyen (**B**) obtenue avec différentes stratégies d'échantillonnage de sol (en titre de chaque graphique ; EAS, échantillonnage aléatoire simple) sur 100 simulations de parcelles infestées en fonction du nombre d'échantillons. Chaque point de couleur représente l'erreur relative obtenue pour un échantillonnage tiré sur une simulation de parcelle infestée suivant la stratégie d'échantillonnage considérée. La moyenne arithmétique et son indice de confiance à 95% sont représentés par les point et les barres d'erreurs pleines de couleur bleu. Les barres en pointillés noirs représentent l'intervalle de la moyenne plus ou moins deux fois l'écart-type contenant 95% des valeurs d'erreur relative. A titre indicatif, les bornes inférieures et supérieures de cet intervalle sont représentées par les valeurs de couleur grise.

l'estimation de la DI moyenne est inférieure à 5% en moyenne (Figure 15-A) et est comprise pour 95% des parcelles simulées entre une surestimation de 9% et une sous-estimation de 14% (Figure 14-A). De même, l'ER sur l'estimation du PNR moyen est significativement inférieure à celle de toutes les autres stratégies d'échantillonnage testées à partir de 38 mesures (Figure 15-B). Elle est même minimale pour 42 mesures de PNR, taille d'échantillonnage à laquelle elle est inférieure à 3% dans 95% des parcelles simulées (Figure 14-B).

L'échantillonnage systématique en diagonale apparaît comme la stratégie la moins précise parmi les stratégies testées pour l'estimation de la DI moyenne et du PNR moyen de parcelles infestées (Figure 14 et Figure 15). La DI moyenne des parcelles simulées est en effet estimée avec une ER toujours supérieure à 5% en moyenne malgré l'augmentation de la taille de l'échantillonnage. Les stratégies d'échantillonnage systématique en X, en W et en losange permettent d'obtenir une plus grande précision dans l'estimation de la moyenne de la parcelle que la stratégie en diagonale à partir de 28 mesures pour la DI et de 14 mesures pour le PNR (Figure 14 et Figure 15). Pour la DI, au-delà d'une taille de 28 échantillons, l'ER moyenne commise avec ces trois stratégies n'est pas significativement différente (Figure 15-A). Cependant pour le PNR, un tracé en W est significativement plus précis qu'un tracé en X ou en losange à partir d'une taille de 20 échantillons (Figure 15-B). La précision de l'EAS est équivalente à celle du tracé en W pour l'estimation du PNR et est légèrement plus importante que celle des tracés en X, en W et en losange pour l'estimation de la DI moyenne à partir de 54 mesures.



**Figure 15** : Erreur relative, en valeur absolue, de l'estimation de la densité d'inoculum moyen (A) et de l'estimation du potentiel nécrotique racinaire moyen (B) de différentes stratégies d'échantillonnages (EAS, échantillonnage aléatoire simple) en fonction du nombre d'échantillons. La moyenne (n=100) et son indice de confiance à 95% sont représentés par les points de couleur et les barres d'erreur en traits continus. L'écart-type de la distribution est représenté par les barres d'erreur en pointillés colorés. Les lignes horizontales en pointillés noirs représentent une erreur relative de 5%, 10%, 15% et 20%.

## 4. Discussion

L'objectif de ce travail était de déterminer une stratégie d'échantillonnage de sol, incluant le nombre d'échantillons nécessaires, adaptée pour l'utilisation d'un outil de prédiction du risque de pourritures racinaires pour les cultures de pois. Cet outil de prédiction du risque est basé sur des mesures de PNR ou de DI d'*A. euteiches* du sol collecté, et dont le caractère prédictif a été démontré (Moussart et al. 2009 ; Gibert et al. 2021). La définition de stratégies d'échantillonnage sur le terrain a fait l'objet de nombreuses études pour déterminer à la fois le nombre de prélèvements et les méthodes d'analyses impliquant notamment les interpolations et la modélisation de la structuration des variables recherchées. Ces études ont concerné la géologie (Wadoux et al. 2019), la pollution des sols (De Fouquet 2011 ; Cao et al. 2020), l'agronomie (Kerry et al. 2010 ; Sherpa et al. 2016) ou la structuration des communautés d'adventices (Roberts et al. 2004 ; Bourgeois et al. 2012 ; Bonneau et al. 2016) mais beaucoup moins se sont préoccupées de la structuration des populations pathogènes dans les sols et de la notion de risque associé à cette structuration (Moussart et al. 2009 ; Anees et al. 2010). Dans ces derniers cas cependant, aucune analyse géostatistique ne supporte les observations rapportées par les auteurs. Par contre, une étude récente sur les risques associés à la présence de mycotoxines dans les champs de maïs s'appuie sur une analyse spatio-temporelle portant sur des parcelles de 53 localisations différentes de l'état de Géorgie aux USA pendant 17 ans et montre la pertinence de la définition d'une stratégie d'échantillonnage et de la collecte d'un nombre suffisant de données pour faire de la prédiction de manière crédible (Kerry et al. 2017). C'est pourquoi notre étude est originale et apporte un éclairage nouveau sur la manière de prédire le risque de pourritures racinaires du pois dans le bassin de production de cette légumineuse dans le nord de la France.

La détermination d'une stratégie d'échantillonnage optimisée utilisable de manière générique dans le cadre d'un outil de prédiction du risque est basée sur l'observation de la distribution et de la structuration de ces deux variables prédictives, DI et PNR, dans des parcelles infestées du bassin de production du nord de la France. Ces parcelles ont été choisies de manière à être graduellement infestées et localisées au nord et au sud du bassin de production afin de représenter une diversité de situations possibles dans cette région. A l'échelle intra-parcellaire, la représentativité de la distribution spatiale de la DI d'*A. euteiches*

et du PNR est basée sur un échantillonnage systématique de sol important selon une grille régulière. Ce type de plan d'échantillonnage est en effet connu pour fournir des résultats souvent plus précis que tout autre plan aléatoire, même en cas de corrélation spatiale (Gruijter et al. 2006). L'espacement régulier des prélèvements en fait également un plan adapté à l'analyse spatiale des données (Pulakkatu-Thodi et al. 2014). L'extrapolation des conclusions tirées de ces mesures pour déterminer une stratégie d'échantillonnage nécessaire à un outil de prédiction du risque destiné à être utilisé de façon générique dans le bassin de culture du pois du nord de la France apparaît ainsi appropriée.

Cependant certains éléments techniques utilisés durant l'échantillonnage initial devront être respectés dans la mise en œuvre de la stratégie qui sera définie. Ainsi, dans cette étude, la collecte des échantillons de sol a été effectuée entre -5 cm et -20 cm de profondeur, coïncidant avec la zone où le risque est maximal pour la culture. Chez la plupart des génotypes de pois, la plus grande partie des racines et de leur biomasse est en effet située dans les 30 premiers cm de sol (Voisin et al. 2002 ; Armstrong et al. 1994). De précédentes observations effectuées dans une parcelle infestée par *A. euteiches* ont également mis en évidence qu'une profondeur située entre -10 et -30 cm correspond à la zone où le PNR du sol est maximal et où l'inoculum se maintiendrait le plus durablement (Moussart et al. 2009). De plus, les IR et les ER sur les DI moyennes et les PNR moyens obtenues dans cette étude prennent en compte les fluctuations de l'échantillonnage mais également les erreurs techniques liées au processus d'analyse des échantillons de sol *a posteriori*. Certains critères et méthodes utilisés dans le processus d'analyse des échantillons de sol de cette étude sont nécessaires à l'obtention d'une mesure de DI ou de PNR représentative et reproductible (volume de sol analysé, niveau d'homogénéisation de sol, technique d'extraction d'ADN...). Ils doivent bien évidemment être respectés afin d'éviter une augmentation de l'erreur technique et donc une augmentation des valeurs d'IR et d'ER.



#### **4.1 Structuration spatiale de la densité d'inoculum d'*Aphanomyces euteiches* et du potentiel nécrotique racinaire du sol de parcelles infestées**

Les résultats obtenus confirment la nature agrégative de l'inoculum d'*A. euteiches* et de son expression pathogène dans les parcelles infestées. Cette agrégation de l'inoculum se traduit sous la forme de foyers de densités et de tailles variables. La structuration en foyers du PNR du sol et des plantes de pois victimes de pourritures racinaires dans les parcelles infestées par *A. euteiches* a déjà été observée (Kraft et Pflieger 2001 ; Moussart et al. 2009). Cependant, nos résultats sont les premiers issus d'une quantification moléculaire directe de l'inoculum pathogène dans des parcelles naturellement infestées. L'analyse variographique indique ainsi que la structuration spatiale de cet inoculum (i.e. des foyers infectieux) varie de 20 m à 82 m selon la parcelle analysée. La taille des foyers de PNR et les DI mesurées sont concordantes avec celles de foyers précédemment décrits et présentant des surfaces de l'ordre de 800 m<sup>2</sup> (40×20) à 1600 m<sup>2</sup> (20×80) (Moussart et al. 2009). Toutefois, la cartographie des parcelles analysées révèle la présence de foyers de plus petites tailles dans les parcelles ayant un niveau d'infestation moins élevé (Flers et Woestyne) que dans les parcelles fortement infestées (Verpillières et Renescure). Cette différence pourrait être en partie due à la propagation contagieuse de nature polycyclique de la maladie, élargissant la taille des foyers via les infections primaires au fur et à mesure des cultures successives de plantes sensibles et via des infections secondaires entre plantes adjacentes d'une même culture (Willoquet et al. 2007). Cependant, d'autres facteurs, comme certaines caractéristiques biotiques et abiotiques du sol, la fréquence et la densité de culture de l'hôte ou encore certaines pratiques culturales impliquant le déplacement du sol sont susceptibles de jouer un rôle dans cette structuration (Campbell & Noe 1985 ; Wallenhammar 1996 ; Cao et al. 2009).

La comparaison entre d'une part les cartographies de la DI, et d'autre part, les cartographies du PNR, confirme la relation significative établie entre ces deux variables (Sauvage et al. 2007 ; Gangneux et al. 2014 ; Gibert et al. 2021). Elle confirme également que des effets propres à chaque parcelle jouent aussi un rôle modéré dans l'expression de la maladie. Ces effets pourraient être dus à l'addition de plusieurs paramètres spécifiques à la parcelle comme la présence dans le sol d'autres agents pathogènes responsables de



pourritures racinaires du pois ou de facteurs de nature biotique ou abiotique régulant l'expression de l'activité pathogène d'*A. euteiches* (Gibert et al. 2021).

Des structururations de l'inoculum de type agrégative ont été largement constatées pour de nombreux autres agents pathogènes d'origine tellurique et notamment d'autres oomycètes comme *Phytophthora* spp. (Ristaino & Gumpertz 2000 ; Campbell & Noe 1985). Dans ces cas, l'inoculum étant considéré comme une variable discrète (données de comptage de propagules par unité de surface), il suit généralement une loi de distribution de Poisson. Cependant, cette agrégation de l'inoculum est ordinairement liée à une forte variance des mesures effectuées, pouvant aboutir à leur sur-dispersion (i.e. variance supérieure à la moyenne) (Campbell & Noe 1985). La distribution de l'inoculum suit alors une loi binomiale négative ou ne suit aucune loi connue (Mihail & Alcorn 1987). De la même manière, dans notre étude, on constate une sur-dispersion des valeurs de DI sur toutes les parcelles échantillonnées. La variance des valeurs de PNR, qui est une variable bornée entre 0 et 5 excluant les valeurs extrêmes, est moins élevée que celle observée pour la DI, mais reste importante. L'hétérogénéité due à la structuration en foyers chez *A. euteiches* est ainsi responsable de la variance importante des valeurs de DI et de PNR observées dans les quatre parcelles échantillonnées.

## **4.2 Estimation statistique du nombre optimal d'échantillons pour une parcelle**

La variabilité importante de la DI et du PNR se répercute sur les tailles d'échantillonnage nécessaires pour atteindre une incertitude relative prédéfinie sur l'estimation des moyennes dans chacune des quatre parcelles. Celles-ci ont été estimées à titre indicatif sans prendre en compte la corrélation spatiale et elles concernent des échantillons prélevés selon le plan d'échantillonnage utilisé, soit des échantillons distants de 14,14 m. Dans le cadre d'un outil d'aide à la décision destiné à être utilisé sur des parcelles dont le niveau d'infestation et l'hétérogénéité ne sont pas connus, il apparaît important d'utiliser la taille d'échantillonnage déterminée sur la parcelle la plus hétérogène parmi les quatre échantillonnées. Dans les parcelles de Flers et de Woestyne, les moins infestées et les plus hétérogènes, ces tailles d'échantillonnage apparaissent cependant très élevées, que ce soit pour la DI (100 et 131 échantillons pour une IR de 20%, respectivement) ou pour le PNR

(68 et 91 échantillons pour une incertitude relative de 20%, respectivement). De plus, le plan d'échantillonnage systématique en grille régulière, précédemment discuté et utilisé pour obtenir les échantillons et leurs mesures de DI et de PNR, ne permet qu'une estimation biaisée de la variance d'échantillonnage qui peut être sous-estimée en cas d'autocorrélation spatiale des mesures (Gruijter et al. 2006). La précision associée à ces tailles d'échantillonnage (IR de 20% de la moyenne) pourrait ainsi être surestimée. L'analyse variographique permet toutefois de déterminer la distance idéale entre prélèvements, au-delà de laquelle les valeurs ne sont plus corrélées. Cette distance doit être supérieure à la portée pratique du variogramme. Celle-ci varie de 20 à 82 m suivant la parcelle et la variable considérée. Dans tous les cas, les tailles d'échantillonnage estimées ne semblent pas adoptables, d'un point de vue économique et opérationnel, pour un processus routinier que représente un outil d'aide à la décision à destination des producteurs de pois.

### **4.3 Comparaison de la précision et de la reproductibilité de différentes stratégies d'échantillonnage pour la mesure de la densité d'inoculum moyenne d'*Aphanomyces euteiches* et du potentiel nécrotique racinaire moyen du sol de parcelles infestées**

Les stratégies d'échantillonnage systématique selon un tracé prédéfini possèdent de nombreux avantages économiques et opérationnels. Par comparaison avec des stratégies d'échantillonnage comme l'échantillonnage aléatoire simple, l'échantillonnage séquentiel, en grappe, ou stratifié, elles sont simples à conceptualiser et rapides à mettre en œuvre pour le préleveur. Le motif de l'échantillonnage reste en effet identique quelle que soit la surface de la zone analysée. La distance entre prélèvements de sol est par contre déterminée par l'échelle de la parcelle étudiée. Dans certains cas, les stratégies d'échantillonnage systématique peuvent permettre, en biaisant l'estimation de la moyenne et de la variance de la parcelle, d'obtenir une précision accrue et de minimiser le nombre d'échantillons nécessaires.

Dans cette étude, les estimations de la moyenne de la DI et du PNR de nos quatre parcelles par les stratégies d'échantillonnage systématique selon un tracé déterminé apparaissent systématiquement biaisées. En effet les erreurs relatives observées tendent, avec l'augmentation du nombre d'échantillons, vers une valeur pouvant être différente de 0

et variant suivant la parcelle. De manière générale, la variance des valeurs sélectionnables de façon systématique le long du tracé est également plus faible que celle de la variable sur la parcelle, et un faible nombre d'échantillons suffit pour que l'erreur relative se stabilise. Cela indique que la population statistique de valeurs de DI et de PNR sélectionnables de façon systématique le long de ces tracés peut avoir des paramètres différents (moyenne et variance) de ceux de la population statistique de la parcelle étudiée. Ces paramètres, notamment la moyenne, varient suivant le tracé suivi et la distribution de la variable sur la parcelle. C'est cette variation suivant le tracé effectué dans la parcelle qui peut permettre d'obtenir une estimation plus précise de la moyenne de la parcelle avec une stratégie d'échantillonnage systématique qu'avec un EAS.

Ainsi, parmi les stratégies d'échantillonnage systématique testées, la stratégie selon deux W tête-bêche est la plus efficiente pour estimer avec précision la moyenne de la parcelle pour chacune des deux variables analysées. Elle possède la précision la plus importante, c'est-à-dire l'erreur relative la plus faible dans l'estimation de la DI moyenne et du PNR moyen de la parcelle. Pour ces deux variables, d'après les simulations effectuées, la stratégie selon deux W tête-bêche permet d'obtenir une erreur relative inférieure à 5% en moyenne à partir d'une taille d'échantillonnage inférieure à celle de l'échantillonnage aléatoire simple (respectivement 20 contre 38 pour le PNR et 46 contre 78 pour la DI). Il est également notable que 42 mesures permettent d'avoir une erreur relative sur l'estimation du PNR moyen de la parcelle inférieure à 3 % dans 95% des simulations de parcelles infestées effectuées.

A l'opposé, la stratégie d'échantillonnage en diagonale est la moins précise des stratégies testées. D'après les simulations effectuées, l'ER pour l'estimation de la DI d'*A. euteiches* et du PNR est en moyenne plus de deux fois supérieure à celle obtenue avec un parcours tracé selon deux W tête-bêche (Figure 15). Ce résultat confirme la faible précision de l'échantillonnage systématique en diagonale, comparativement à des tracés en losange ou en W simple, mis en évidence sur des parcelles présentant une forte agrégation spatiale de l'inoculum ou de plantes malades (Mihail & Alcorn 1987 ; Delp et al. 1986). Dans ces cas, la faible couverture spatiale de l'échantillonnage selon une diagonale aboutie à une forte probabilité de sous-représenter les zones infestées (passent entre les foyers), ou au contraire de les sur-représenter (en passant principalement dans les foyers), biaisant ainsi fortement la moyenne de la variable sur la parcelle. Cette probabilité dépend bien sûr du niveau

d'infestation de la parcelle et de la taille des foyers relativement à la taille de la zone d'échantillonnage. Un trajet en diagonale reste ainsi efficace pour les collectes de sol visant à l'estimation de moyennes de variables réparties de façon plus homogène, c'est-à-dire faiblement structurées spatialement, dans la zone étudiée (Delp et al. 1986).

## 5. Conclusion

Ce travail invite ainsi à reconsidérer la stratégie d'échantillonnage de sol actuellement utilisée par les producteurs de pois pour effectuer les tests de PNR dû à *A. euteiches*. Celle-ci consiste en effet à réaliser un échantillon composite à partir de 15 à 20 échantillons de sol prélevés de part et d'autre d'une diagonale dans une parcelle d'environ 5 ha. Les échantillons ne sont pas prélevés de manière systématique (à intervalles réguliers) mais de manière plus aléatoire, ce qui peut augmenter la variance et donc le nombre d'échantillons nécessaires pour atteindre la précision souhaitée. Ainsi, la faible couverture spatiale de cette stratégie d'échantillonnage, associée au faible nombre d'échantillons prélevés, apparaissent inadaptés pour prendre en compte la distribution d'*A. euteiches* dans les sols agricoles.

Notre étude s'est concentrée sur des tracés d'échantillonnage simples et fréquemment utilisés dans le domaine agricole. Il n'est cependant pas exclu que d'autres tracés, non pris en compte dans cette étude, permettent une couverture spatiale améliorée et l'obtention d'une meilleure précision pour l'estimation de ces valeurs moyennes et permettent de prélever un plus faible nombre d'échantillons. Cette stratégie d'échantillonnage reste dans tous les cas applicable sur des parcelles de taille inférieure ou égale à 12 ha, ce qui correspond à la surface des parcelles actuellement cultivées en pois dans le nord de la France. Pratiquement, l'adoption d'une méthode de collecte de sol selon un trajet suivant deux W tête-bêche permettra d'obtenir une valeur de PNR moyen ou de DI d'*A. euteiches* moyenne de manière plus précise que la stratégie actuelle avec un nombre raisonnable d'échantillons. Ce nombre d'échantillons doit être issu d'un compromis entre les contraintes de coût et la précision souhaitée. La diminution du nombre d'échantillons induit une baisse du coût des analyses *a posteriori*. Celui-ci peut s'avérer élevé, aussi bien pour les analyses de quantification moléculaire de l'inoculum dont les réactifs sont coûteux, que pour les bio-essais de mesures de PNR qui sont longs et fastidieux. Une piste pour diminuer le coût

de l'analyse pourrait être le pool des échantillons de sol de volumes égaux prélevés le long du tracé. L'obtention d'une valeur moyenne de DI ou de PNR ne nécessiterait alors qu'un nombre de mesures limité au nombre de pools effectués et au nombre de répétitions techniques de la mesure. Etant donné la nature complexe de la matrice sol, de structure et de granulométrie variable, ainsi que la distribution hétérogène de l'inoculum d'*A. euteiches* dans le sol à l'échelle de l'échantillon, cette pratique nécessiterait d'être validée de manière expérimentale avant son adoption.

Enfin, la comparaison des cartographies obtenues montre que des facteurs environnementaux (abiotiques, biotiques ou anthropiques) pourraient moduler, de façon toutefois limitée, l'expression pathogène d'*A. euteiches*. Ces facteurs n'ont pas été clairement identifiés dans ce travail mais sont de fait intégrés, au moins partiellement, dans l'analyse puisque les prélèvements ont été effectués au champ et qu'ils sont porteurs de l'histoire de la parcelle d'origine (pédoclimat, pratiques culturales, communautés microbiennes associées). Il serait ainsi intéressant de les identifier et de déterminer si la prise en compte plus précise de leurs rôles respectifs permet d'affiner la précision de la prédiction.

## 6. Références

- Anees, M., Edel-Hermann, V., & Steinberg, C. (2010). Build up of patches caused by *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 1661-1672. doi:10.1016/j.soilbio.2010.05.013
- Armstrong, E. L., Pate, J. S., & Tennant, D. (1994). The field pea crop in South Western Australia – Patterns of water use and root growth in genotypes of contrasting morphology and growth habit. *Functional Plant Biology*, 21(4), 517–532. <https://doi.org/10.1071/pp9940517>
- Bivand, R., S., & Wong, D W. S. (2018). Comparing implementations of global and local indicators of spatial association TEST, 27(3), 716-748. <https://doi.org/10.1007/s11749-018-0599-x>
- Bodker, L., Leroul, N., & Smedegaard-Petersen, V. (1993). Influence of pea cropping history on disease severity and yield depression. *Plant Disease*, 77(9), 896–900
- Bonneau, M., Peyrard, N., Gaba, S., & Sabbadin, R. (2016). Sampling for weed spatial distribution mapping need not be adaptive. *Environmental and Ecological Statistics*, 23(2), 233-255. doi: 10.1007/s10651-015-0337-4
- Botero-Ramirez, A., Hwang, S. F., & Strelkov, S. E. (2021). *Plasmodiophora brassicae* inoculum density and spatial patterns at the field level and relation to Soil characteristics. *Pathogens*, 10(5): 499. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050499>
- Bourgeois, A., Gaba, S., Munier-Jolain, N., Borgy, B., Monestiez, P., & Soubeyrand, S. (2012). Inferring weed spatial distribution from multi-type data. *Ecological Modelling*, 226, 92-98. doi:10.1016/j.ecolmodel.2011.10.010
- Campbell, C., & Noe, J. (1985). The spatial-analysis of soilborne pathogens and root diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 23, 129–148
- Cao, T., Manolii, V. P., Strelkov, S. E., Hwang, S.-F., & Howard, R. J. (2009). Virulence and spread of *Plasmodiophora brassicae* [clubroot] in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 31(3), 321–329. <https://doi.org/10.1080/07060660909507606>
- Carter, M. R., & Gregorich, E. G. (Eds.). (2008). Soil sampling and methods of analysis (2nd ed). *Canadian Society of Soil Science* ; CRC Press
- Chan, M., & Close, R. (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
- Chiles, J.-P., & Delfiner, P. (1999). *Geostatistics : Modeling spatial uncertainty*. Wiley.
- Cressie, N. (1993). Spatial prediction and kriging. In *Statistics for Spatial Data* (pp. 105–209). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119115151.ch3>
- De Fouquet, C. (2011). From exploratory data analysis to geostatistical estimation: Examples from the analysis of soil pollutants. *European Journal of Soil Science*, 62(3), 454–466. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2011.01374.x>
- Delp, B., Stowell, L., & Marois, J. (1986). Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. *Phytopathology*, 76(12), 1299–1305. <https://doi.org/10.1094/Phyto-76-1299>
- Didelot, D., & Chaillat, I. (1995). Relevance and interest of root disease prediction tests for pea crop in France. *2nd European Conference on Grain Legumes—Improving Production and Utilisation of Grain Legumes, Copenhagen-Denmark*, 9–13
- Fouquet, C. (2011). From exploratory data analysis to geostatistical estimation: examples from the analysis of soil pollutants. *European Journal of Soil Science*, 62(3), 454-466. doi:10.1111/j.1365-2389.2011.01374.x
- Gangneux, C., Cannesan, M.-A., Bressan, M., Castel, L., Moussart, A., Vicré-Gibouin, M., Driouch, A., Trinsoutrot-Gattin, I., & Laval, K. (2014). A sensitive assay for rapid detection and quantification of *Aphanomyces euteiches* in soil. *Phytopathology*, 104(10), 1138–1147. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-13-0265-R>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00413.x>
- Gibert, S., Edel-Hermann, V., Moussa Mcolo, R., Gautheron, E., Michel, J., Bernaud, E., Gautheron, N., Sol, J.-M., Capelle, G., Galland, R., Bardou-Debats, A., Lambert, C., & Steinberg, C. (2021). Risk assessment of *Aphanomyces euteiches* root rot disease: Quantification of low inoculum densities in field soils using droplet digital PCR. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02325-5>

- Gilbert, R. O. (1987). *Statistical Methods for Environmental Pollution Monitoring* (PNL-4660). Pacific Northwest National Lab. (PNNL), Richland, WA (United States). <https://www.osti.gov/biblio/7037501-statistical-methods-environmental-pollution-monitoring>
- Gossen, B. D., Conner, R. L., Chang, K.-F., Pasche, J. S., McLaren, D. L., Henriquez, M. A., Chatterton, S., & Hwang, S.-F. (2016). Identifying and managing root rot of pulses on the Northern Great Plains. *Plant Disease*, *100*(10), 1965–1978. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0184-FE>
- Gräler, B., Pebesma E., & Heuvelink, G. (2016). Spatio-temporal interpolation using gstat. *The R Journal* *8*(1), 204-218
- Gruijter, J. de, Brus, D. J., Bierkens, M. F. P., & Knotters, M. (2006). Sampling for natural resource monitoring. *Springer Science & Business Media*
- Juang, K. W., Lee, D. Y., & Ellsworth, T. R. (2001). Using rank-order geostatistics for spatial interpolation of highly skewed data in a heavy-metal contaminated site. *Journal of Environmental Quality*, *30*(3), 894–903. <https://doi.org/10.2134/jeq2001.303894x>
- Kerry, R., Oliver, M. A., & Frogbrook, Z. L. (2010). Sampling in precision agriculture. In M. A. Oliver (Ed.), *Geostatistical Applications for Precision Agriculture* (pp. 35-63). doi 10.1007/978-90-481-9133-8\_2
- Kerry, R., Ortiz, B. V., Ingram, B. R., & Scully, B. T. (2017). A spatio-temporal investigation of risk factors for aflatoxin contamination of corn in southern Georgia, USA using geostatistical methods. *Crop Protection*, *94*, 144-158. doi:10.1016/j.cropro.2016.12.005
- Kraft, J. M., & Pflieger, F. L. (2001). Compendium of pea diseases and pests. (J. M. Kraft & F. L. Pflieger, Eds.). *American Phytopathological Society (APS Press)*.
- Labrousse, F. (1933). Notes de pathologie végétale. *Revue de pathologie végétale et d'Entomologie agricole* *19*, 71–84
- Li, J. (2019). Sampling soils in a heterogeneous research plot. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, *143*, e58519. <https://doi.org/10.3791/58519>
- Li, J., Guo, C., Jian, S., Deng, Q., Yu, C.-L., Dzantor, K. E., & Hui, D. (2018). Nitrogen fertilization elevated spatial heterogeneity of soil microbial biomass carbon and nitrogen in switchgrass and gamagrass croplands. *Scientific Reports*, *8*(1), 1734. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18486-5>
- Malvick, D., Percich, J., Pflieger, F., Givens, J., & Williams, J. (1994). Evaluation of methods for estimating inoculum potential of *Aphanomyces euteiches* in soil. *Plant Disease*, *78*(4), 361–365. <https://doi.org/10.1094/PD-78-0361>
- Matheron, G. (1965). Les variables régionalisées et leur estimation une application de la théorie des fonctions aléatoires aux sciences de la nature. Masson
- Mihail, J., & Alcorn, S. (1987). *Macrophomina phaseolina*—Spatial patterns in a cultivated soil and sampling strategies. *Phytopathology*, *77*(8), 1126–1131. <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-1126>
- Minasny, B., & McBratney, Alex. B. (2005). The Matérn function as a general model for soil variograms. *Geoderma*, *128*(3), 192–207. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.04.003>
- Moussart, A., Wicker, E., Delliou, B. le, Abelard, J. M., Esnault, R., Lemarchand, E., Rouault, F., Guennou, F. le, Pilet-Nayel, M. L., Baranger, A., Rouxel, F., & Tivoli, B. (2009). Spatial distribution of *Aphanomyces euteiches* inoculum in a naturally infested pea field. *European Journal of Plant Pathology*, *123*(2), 153–158. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9350-x>
- Oliver, M. A., & Webster, R. (2014). A tutorial guide to geostatistics: Computing and modelling variograms and kriging. *CATENA*, *113*, 56–69. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2013.09.006>
- Oyarzun, P. (1993). Bioassay to assess root-rot in pea and effect of root-rot on yield. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, *99*(2), 61–75. <https://doi.org/10.1007/BF01998474>
- 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. <https://doi.org/10.1007/BF01974783>
- Papavizas, G. C., & Ayers, W. A. (1974). *Aphanomyces* species and their root diseases in pea and sugarbeet: A review. *Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture*.
- Paulo, J., Ribeiro, J. R., Diggle, P. J., Schlather, M., Bivand, R., & Ripley, B. (2020). geOR: Analysis of geostatistical data. R package version 1.8-1. <https://CRAN.R-project.org/package=geOR>
- Pebesma, E. J. (2004). Multivariable geostatistics in S: the gstat package. *Computers and Geosciences*, *30*: 683-691

- Pebesma, E. J. (2018). Simple features for R: Standardized support for spatial vector data. *The R Journal* 10 (1), 439-446, <https://doi.org/10.32614/RJ-2018-009>
- Pfender, W. F., Rouse, D. I., & Hagedorn, D. J. (1981). A 'most probable number' method for estimating inoculum density of *Aphanomyces euteiches* in naturally infested soil. *Phytopathology*, 71(11), 1169–1172. <https://doi.org/10.1094/Phyto-71-1169>
- Pulakkatu-Thodi, I., Reisig, D. D., Greene, J. K., Reay-Jones, F. P. F., & Toews, M. D. (2014). Within-field spatial distribution of stink bug (Hemiptera: Pentatomidae)-Induced boll injury in commercial cotton fields of the Southeastern United States. *Environmental Entomology*, 43(3), 744–752. <https://doi.org/10.1603/EN13332>
- Reiling, T., King, T., & Fields, R. (1960). Soil indexing for pea root rot and the effect of root rot on yield. *Phytopathology*, 50(4), 287–290
- Ristaino, J. B., & Gumpertz, M. L. (2000). New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology*, 38(1), 541–576. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.541>
- Roberts, E. A., Sheley, R. L., & Lawrence, R. L. (2004). Using sampling and inverse distance weighted modeling for mapping invasive plants. *Western North American Naturalist*, 64(3), 312-323.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00784.x>
- Schren, A. L. (1960). Germination of oospores of *Aphanomyces euteiches* embedded in plant debris. *Phytopathology*, 50(4). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19601102431>
- Sherpa, S. R., Wolfe, D. W., & van Es, H. M. (2016). Sampling and data analysis optimization for estimating soil organic carbon stocks in agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, 80(5), 1377-1392. doi:10.2136/sssaj2016.04.0113
- Sherwood, R. T., & Hagedorn, D. J. (1958). Determining common root rot potential of pea fields. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300443087>
- Voisin, A.-S., Salon, C., Munier-Jolain, N. G., & Ney, B. (2002). Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil*, 242(2), 251–262. <https://doi.org/10.1023/A:1016214223900>
- Wadoux, A., Marchant, B. P., and Lark, R. M. (2019). Efficient sampling for geostatistical surveys. *European Journal of Soil Science*, 70(5), 975-989. doi:10.1111/ejss.12797
- Wallenhammar, A.-C. (1996). Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. *Plant Pathology*, 45(4), 710–719. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-173.x>
- Wicker, E., Hullé, M., & Rouxel, F. (2001). Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology*, 50(4), 433–442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00590.x>
- Wicker, E., & Rouxel, F. (2001). Specific behaviour of French *Aphanomyces euteiches* Drechs. Populations for virulence and aggressiveness on pea, related to isolates from Europe, America and New Zealand. *European Journal of Plant Pathology*, 107(9), 919–929. <https://doi.org/10.1023/A:1013171217610>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L. D., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T. L., Miller, E., Bache, S. M., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D. P., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Willocquet, L., Jumel, S., & Lemarchand, E. (2007). Spatio-temporal development of pea root rot disease through secondary infections during a crop cycle. *Journal of Phytopathology*, 155(10), 623–632. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01289.x>
- Willsey, T. L., Chatterton, S., Heynen, M., & Erickson, A. (2018). Detection of interactions between the pea root rot pathogens *Aphanomyces euteiches* and *Fusarium* spp. Using a multiplex qPCR assay. *Plant Pathology*, 67(9), 1912–1923. <https://doi.org/10.1111/ppa.12895>





## CHAPITRE III

Identification, pathogénicité et dynamique des communautés de champignons et d'oomycètes associées aux pourritures racinaires du pois dans le nord de la France



## Avant-propos

---

Les pourritures racinaires constituent une préoccupation majeure dans la production de pois en France et plus particulièrement dans celle du pois potager. Dans de nombreux pays, elles sont attribuées à un complexe parasitaire de champignons et d'oomycètes d'origine tellurique dont la composition peut différer selon les zones géographiques. En France, l'oomycète *Aphanomyces euteiches* était jusqu'à présent considéré comme le principal agent pathogène responsable de pourritures racinaires et, si d'autres microorganismes ont pu être sporadiquement associés à la maladie, leur contribution n'a pas vraiment été prise en compte. Le concept de complexe parasitaire n'a que peu été évoqué et par conséquent aucune recherche n'a été dédiée à la caractérisation de ce complexe ni à la définition de sa composition. Récemment, l'occurrence de pourritures racinaires dans des parcelles de pois que le diagnostic préventif fourni par le test de mesure de l'indice nécrotique racinaire disait sans risque a conduit à l'hypothèse de l'existence et du rôle d'un complexe parasitaire. Vérifier cette hypothèse suppose d'isoler tous les microorganismes associés à des symptômes de pourriture racinaire du pois et de tester leur pathogénicité. L'objectif de l'étude décrite dans le chapitre suivant a été de déterminer la composition du complexe parasitaire responsable de pourritures racinaires du pois potager dans le nord de la France et d'étudier son évolution au cours d'une saison culturale. Des champignons et oomycètes endophytes ont été isolés de racines symptomatiques de pois échantillonnés i) au stade floral/maturation des graines dans 22 parcelles de pois potager en 2017 et ii) aux stades de l'émergence, de l'élongation et floraison/maturation dans deux parcelles au cours d'une saison culturale en 2018.

Six cent quarante-six isolats de champignons et d'oomycètes ont été collectés. Parmi eux, 144 isolats collectés en 2017 et 173 isolats collectés en 2018 ont été identifiés en utilisant différents marqueurs moléculaires. La pathogénicité sur pois de ces 317 isolats a été testée et les isolats ont été classés en quatre groupes selon leur niveau d'agressivité allant de non pathogènes à très agressifs. Les champignons du genre *Fusarium* ont été les plus fréquemment isolés des pois symptomatiques. *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, et *F. redolens* sont largement prédominants parmi les isolats aussi bien en 2017 qu'en 2018. L'analyse phylogénétique du facteur d'élongation de la traduction 1- $\alpha$  (*TEF1*) a montré que 99% des isolats de *F. solani* analysés correspondaient à la lignée de *F. pisi* comb. nov. (anciennement

*F. solani* f. sp. *pisii*) proposée par Šišić et al. (2018a). Cette analyse a également montré que la majorité des isolats de *F. oxysporum* était phylogénétiquement proches d'isolats du Royaume-Uni qui ne font pas partie de la forme spéciale *pisii*. Une importante variabilité d'agressivité entre isolats a été observée au sein de chaque espèce. Les tests de pathogénicité ont montré que les isolats de *F. solani* étaient les plus agressifs, suivis par les isolats de *Clonostachys rhizophaga*, *F. redolens*, *F. oxysporum* et *F. avenaceum*. Par ailleurs, *C. rhizophaga* a été isolé à une fréquence moins importante mais néanmoins tous les isolats de *C. rhizophaga* étaient pathogènes et très agressifs sur le pois. Il s'agit du premier signalement de *C. rhizophaga* en tant qu'agent pathogène du pois. Peu d'oomycètes ont été isolés et ils appartenaient tous au genre *Pythium*. Enfin, cette étude a montré que les communautés de champignons et d'oomycètes associées aux pourritures racinaires évoluent au cours d'une saison culturale. Le niveau de dissimilarité entre les communautés associées aux pourritures racinaires dans les deux parcelles suivies a diminué au cours de la saison culturale pour converger vers une composition en espèces plus proche. Au stade floraison/maturation des graines, ces communautés étaient dominées par *F. solani*, *F. oxysporum* et *F. redolens*. La proportion d'isolats classés comme non pathogènes à faiblement agressifs, importante à la levée, diminue progressivement au cours de la saison culturale en faveur des isolats classés modérément agressifs à très agressifs.

Les résultats des travaux présentés dans ce chapitre ont permis de vérifier l'hypothèse selon laquelle un complexe parasitaire présentant une forte richesse spécifique est, en France aussi, impliqué dans la maladie. En outre, nous avons montré que la composition de ce complexe pouvait varier d'une parcelle à l'autre et évoluer au cours d'une saison culturale. Ces résultats ont fait l'objet d'une « Disease note » acceptée pour publication dans la revue *Plant Disease* et d'un manuscrit sous forme d'article qui sera prochainement soumis à la revue *Plant Pathology*.

## Identification, pathogenicity, and community dynamics of fungi and oomycetes associated with pea root rot in the North of France.

S. GIBERT<sup>1,2</sup>, V. EDEL-HERMANN<sup>1</sup>, E. GAUTHERON<sup>1</sup>, N. GAUTHERON<sup>1</sup>, E. BERNAUD<sup>1</sup>, J.-M. SOL<sup>2</sup>, G. CAPELLE<sup>2</sup>, R. GALLAND<sup>2</sup>, A. BARDON-DEBATS<sup>2</sup>, C. LAMBERT<sup>2</sup>, C. STEINBERG<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Agroécologie, AgroSup Dijon, INRAE, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

<sup>2</sup> Société BONDUELLE SAS, Rue Nicolas Appert - BP 17, 59653 Villeneuve d'Ascq – CEDEX, France

### **Abstract**

Root rot diseases are a major concern for green pea production. They are due to a pathogenic complex of soil-borne fungi and oomycetes that can differ in composition depending on the geographical area. In France, *Aphanomyces euteiches* was so far considered as the main causal agent of root rot, and the contribution of other pathogenic species of the pea root rot complex was never investigated, even though fusariosis-like root rot symptoms were often observed in pea field. This study aims at characterizing the composition of the pathogenic complex responsible for root rot of green pea in the North of France and the evolution of its composition along a cropping season. To this end, endophytic fungi and oomycetes were isolated from root symptomatic tissues of pea sampled i) at the flowering/grain maturation stage in 22 green pea fields in 2017, and ii) at pea emergence, elongation, and flowering/grain maturation stages in two fields along the cropping season in 2018. Among the 646 fungal and oomycete isolates collected, 144 isolates collected in 2017 and 173 isolates collected in 2018 were identified using molecular markers. The pathogenicity of these 317 isolates was assessed and isolates were divided into four groups depending on their aggressiveness, from non-pathogenic to highly aggressive. Fungi of the genus *Fusarium* were the most frequently isolated from symptomatic pea. *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, and *F. redolens* were highly predominant both in 2017 and in 2018. Phylogenetic analysis of the translation elongation factor 1- $\alpha$  (*TEF1*) sequences showed that 99% of the isolates of *F. solani* analysed correspond to the *F. pisi* comb. nov. lineage (formerly *F. solani* f. sp. *pisi*) proposed by Šišić et al. 2018a. This analysis also showed that the majority of the isolates of *F. oxysporum* were phylogenetically closed to isolates from the United Kingdom that are not part of the *forma specialis pisi*. A high variability in aggressiveness was observed within each species. The

pathogenicity test showed that the isolates of *F. solani* were the most aggressive ones, followed by the isolates of *F. redolens* and those of *F. avenaceum*. In addition, *Clonostachys rhizophaga* was isolated with a lower frequency. All the isolates of *C. rhizophaga* were pathogenic and highly aggressive on pea. This is the first report of *C. rhizophaga* as a pathogen on pea. Few oomycetes were isolated and they all belonged to the genus *Pythium*. Lastly, this study shows that the communities of fungi and oomycetes associated with pea root rot change over the cropping season. The level of dissimilarity between the communities associated with root rot in the two monitored plots decreased along the cropping season to converge toward a more similar composition. At flowering/grain maturation stage, these communities were dominated by *F. solani*, *F. oxysporum* and *F. redolens*. The proportion of isolates categorised as non-pathogenic to weakly pathogenic decreased progressively along the cropping season in favour of moderately to highly pathogenic isolates.

**Keywords:** Pea root rot, pathogenic complex, *Fusarium*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. redolens*, *Clonostachys rhizophaga*, community dynamics

## 1. Introduction

Root rot of legumes is a major constraint in most of the intensive cropping areas across the globe (Infantino et al. 2006; Gossen et al. 2016; Wille et al. 2019). It is an important factor of yield instability and a key impediment for pulse cultivation. This disease is increasingly concerning considering that legume production is expected to grow in the coming years due to their nutritional qualities for both human and animal consumption as well as their multiple benefits for agricultural sustainability (Fuchs et al. 2014; Rubiales et al. 2015; Foyer et al. 2016; Magrini et al. 2016).

Among grain legumes, pea (*Pisum sativum* L.) is particularly affected by root rot worldwide (Gossen et al. 2016; Harveson et al. 2021). Symptoms generally appear under the form of brown to black lesions on the upper part of the pea taproot, spreading in the root system and to the base of the stem. In the field, above ground symptoms are increasingly pronounced along the cropping season. The growth of infested plant is generally greatly reduced. At an advanced stage, plants generally show a pronounced stunting, associated with yellowing or wilting of the aerial parts, often resulting in a reduced number of pods or leading to death (Kraft and Pflieger 2001; Harveson et al. 2021).

A parasitic complex composed of a wide range of soil-borne fungal and oomycete species is involved in both green and field pea root rot (Basu 1975; Taheri et al. 2017a). *Aphanomyces euteiches* is considered as the most concerning oomycete of this disease complex but several *Pythium* species and, in a lesser extent, some species of *Phytophthora* are frequently isolated from diseased pea roots and are moreover involved in pea seed rot and damping-off (Reyes 1980; Tu 1991; Persson et al. 1997; Heyman et al. 2012; Chang et al. 2017). *Fusarium* spp. such as *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum* and *F. redolens* were found to be the most concerning fungi of the pea parasitic complex (Gossen et al. 2016; Harveson et al. 2021). *F. solani* f. sp. *pisi* and *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (responsible for pea wilt) that show a high host specificity and are highly destructive on pea, were for a long time regarded to be the main causal fungal agents of pea root rot (Kraft and Pfender 2001). *Fusarium culmorum*, *F. avenaceum* or *F. tricinctum* have a larger host range and became an increasing concern because of their frequent involvement in severe root rot of peas (Gossen et al. 2016). *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola* and *Didymella* spp. (responsible for the pea foot rot



and ascochyta blight) were also frequently reported as causal agents of root rot (Blume and Harman 1979; Tu 1991; Oyarzun et al. 1993; Persson et al. 1997; Gossen et al. 2011; Parker et al. 2013; Melzer et al. 2016; Šišić et al. 2018c; Chatterton et al. 2019). Other fungi such as *Sclerotinia sclerotiorum* or *Cylindrocarpon* spp. were only sporadically found in infected tissues and were never been described to have a major impact on crop yields (Oyarzun et al. 1993; Soyulu and Dervis 2011).

Members of the pea root rot complex often co-occur in root symptoms, but the composition of the complex and the relative significance of each species can differ depending on the geographical area (Wille et al. 2019). The climatic conditions and the presence of pathogenic inoculum, regulated by the frequency of host species in the cropping rotation or in mulch, are the main factors influencing the composition of the pea root rot complex at a regional scale (Moussart et al. 2013; Šišić et al. 2018b). Moreover, in most studies, pathogenicity tests showed that the virulence and the aggressiveness on pea vary widely between the involved species as well as between strains of a same species (Persson et al. 1997; Skovgaard et al. 2002; Šišić et al. 2018b). The existence of a synergistic effect between various species has indeed been shown to increase the severity of symptoms (Peters and Grau 2002; Lamichhane and Venturi 2015; Willsey et al. 2019). In addition, meteorological conditions, resistance of pea varieties, soil edaphic factors and agricultural practices have a major impact on the development and on the pathogenicity expression in the field (Rubiales et al. 2015; Taheri et al. 2017a; Zitnick-Anderson et al. 2020).

In recent years, the composition of the pea root rot complex has been well studied in North America. *Fusarium solani*, *F. avenaceum* and *A. euteiches* appeared to be the major threat to field pea production in this area (Feng et al. 2010; Chittem et al. 2015; Gossen et al. 2016; Zitnick-Anderson and Pasche 2016; Taheri et al. 2017a; Wu et al. 2018; Chatterton et al. 2019). In Northern Europe, *A. euteiches* and several *Fusarium* species such as *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, and *F. avenaceum* are among the greatest concerns in pea production. They were found with a high prevalence in Sweden, Denmark and The Netherlands (Oyarzun and Loon 1989; Oyarzun et al. 1993; Persson et al. 1997). In Germany, *Didymella pinodella*, *D. pinodes*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. redolens* and *F. avenaceum* were the most prevalent species isolated from pea root rot (Baćanović-Šišić et al. 2018; Šišić et al. 2020). In the United Kingdom, the parasitic complex would be restricted to *F. oxysporum*, *F. solani* and *F. redolens* (Clarkson 1978; Jenkins 2018).

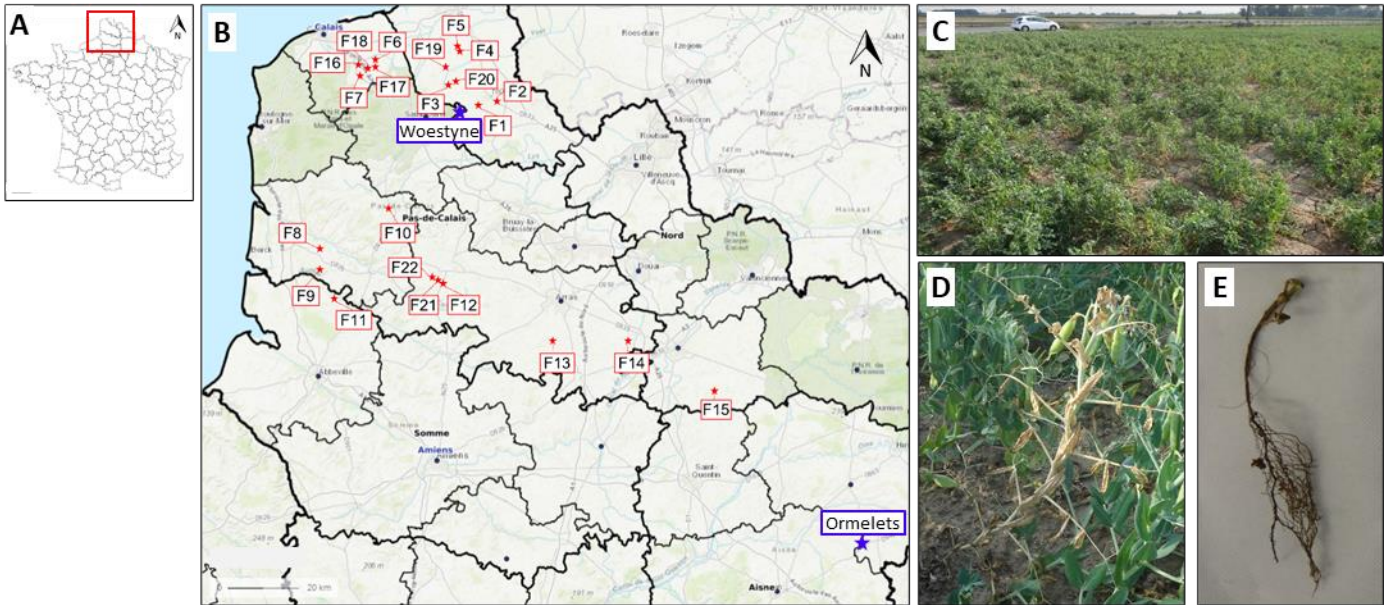
So far, in France, the attention of researchers, breeders and producers mainly focused on *A. euteiches*, considered as the main causal agent of pea root rot (Wicker et al. 2001; Quillevere et al. 2016; Le May et al. 2018; Quillevere-Hamard et al. 2018). Other components of the parasitic complex were often overlooked, even though fusariosis-like root rot symptoms were often observed in pea fields. The composition of the pea root rot complex and the respective contribution of each pathogen were never investigated. Thus, the objectives of the present study were to identify the pathogenic fungi and oomycete species associated with green-pea root rot in the main pea growing area in Northern France and to study the evolution of the composition of the parasitic complex along a cropping season. To this end: (a) we isolated fungi and oomycetes from symptomatic root tissues of pea plants sampled in a large number of green pea fields at the flowering/grain maturation stages, and at pea emergence, elongation, and flowering/grain maturation stages in two different fields along a cropping season; (b) we identified the isolates using morphological and molecular criteria and we assessed their pathogenicity; (c) we classified the species according to their prevalence and the isolates according to their aggressiveness level; and (d) we analysed how the composition of the community of fungi and oomycetes evolved along a cropping season. Some pea pathogens identified in this study are reported in a Disease Note (Gibert et al. 2021a).

## 2. Materials and methods

### 2.1 Field characteristics and plant and soil sampling

Sampling campaigns were conducted in 2017 and 2018 in the pea production basin of the Hauts-de-France region (France). For each sampled field, the GPS coordinates, the historical cropping record, the cultivated pea variety and the sowing date were collected from the farmers (Table 12). In 2017, twenty-two green pea fields (named F1 to F22) distributed throughout the pea production basin were selected based on the established presence of root rot (Figure 16 ; Table 12). Sampling was carried out at the end of the cropping season on pea plants from flowering to grain maturation stage. Five plants *per* field presenting stunting, yellowing, or wilting of the aerial parts were sampled using a cleaned and disinfected (70% ethanol) spade, including the entire root system. Samples were placed into large paper envelopes, and brought to the laboratory in a cooler. A 2 L bulk soil sample was also collected in each field and placed in a plastic box in order to determine soil physico-chemical characteristics.

In 2018, two fields with root rot antecedents, named Woestyne and Ormelets and located respectively in the north and in the south of the pea production basin, were selected (Figure 16; Table 12). Five samples of 2 L bulk soil were collected in each field following a W pattern before pea sowing (T0) and processed as in 2017 to determine soil physico-chemical characteristics. Plant sampling was carried out at three different stages along the cropping season: after pea emergence (T1), during plant elongation (T2), and at the pea flowering to maturation stage (T3). At sampling time T1, at which the aerial plantlet parts were indistinguishable between asymptomatic and symptomatic roots, five plantlets *per* field were selected based on the observation of root symptoms onset after a careful removal of the upper layer of the soil surrounding the roots. All selected plantlets were sampled with the soil surrounding their roots using a cleaned and disinfected spade as in 2017. At times T2 and T3, five pea plants *per* field presenting visible root rot symptoms at the stem base or stunting, yellowing or wilting of the aerial parts were sampled using a cleaned and disinfected spade, including the entire root system. At the three sampling times, samples were placed into large paper envelopes, and brought to the laboratory in a cooler.



**Figure 16 :** (A, B) Location of the fields sampled in 2017 (framed in red) and in 2018 (framed in blue), (C) Example of sampled pea field, (D) pea plant victim of root rot, and (E) typical symptomatic roots. (The background map was obtained from [www.geoportail.gouv.fr](http://www.geoportail.gouv.fr) internet site)

**Table 12** : Geographic coordinates, agronomical parameters and historical cropping records of sampled field.

Field	Geographic coordinates	Sowing date	Pea variety	Sampling date	Tillage	Historical cropping record					
						2012	2013	2014	2015	2016	2017
F1	50.77106 N 2.45362 E	2017-05-15	Dommel	2017/07/17	Till	Potato *	Wheat	Wheat	Potato	Wheat	Pea
F2	50.7768819 N 2.5271 E	2017-05-12	Ultimo	2017/07/17	Till	Wheat	Wheat	Sugar beet	Potato	Wheat	Pea
F3	50.81614 N 2.34057 E	2017-05-17	Ultimo	2017/07/18	Till	Wheat	Potato	Wheat	Flax	Wheat	Pea
F4	50.89732 N 2.38188 E	2017-05-16	Ultimo	2017/07/18	Till	Chicory	Potato	Wheat	Flax	Potato	Pea
F5	50.90826 N 2.38001 E	2017-05-22	Ultimo	2017/07/18	Till	Sugar beet	Potato	Wheat	Flax	Wheat	Pea
F6	50.86679 N 2.05775 E	2017-05-17	Ultimo	2017/07/18	Till	Wheat	Chicory	Wheat	Corn	Potato	Pea
F7	50.83918 N 1.99852 E	2017-05-17	Tangara	2017/07/18	Till	Potato	Wheat	Chicory	Potato	Wheat	Pea
F8	50.41283 N 1.83555 E	2017-05-16	Dommel	2017/07/18	Till	Wheat	Potato	Wheat	Sugar beet	Wheat	Pea
F9	50.3629 N 1.839 E	2017-05-12	Imperia	2017/07/18	Till	6-row barley	Flax	Wheat	Potato	Wheat	Pea
F10	50.5121 N 2.1078 E	2017-05-22	Ultimo	2017/07/19	Till	Corn	Wheat	6 row barley	Sugar beet	Wheat	Pea
F11	50.28954 N 1.8949 E	2017-05-17	5v944	2017/07/19	Till	Wheat	Flax	Wheat	Sugar beet	Wheat	Pea
F12	50.32888 N 2.31023 E	2017-05-24	Ultimo	2017/07/19	Till	Sugar beet	Wheat	6 row barley	Corn	Wheat	Pea
F13	50.17817 N 2.74746 E	2017-05-10	Imperia	2017/07/19	Till	Flax	Sugar beet	Wheat	Corn	Wheat	Pea
F14	50.17934 N 3.043 E	2017-05-09	Fregate	2017/07/19	Till	Wheat	Sugar beet	Wheat	Potato	Wheat	Pea
F15	50.05716 N 3.38384 E	2017-05-16	Dommel	2017/07/19	Till	Wheat	Rapeseed	Wheat	Flax	Wheat	Pea
F16	50.862 N 1.9876 E	2017-05-23	Ganga	2017/08/01	Till	Potato	Wheat	Chicory	Sugar beet	Wheat	Pea
F17	50.857 N 2.0584 E	2017-05-23	Ultimo	2017/08/01	Till	Wheat	Sugar beet	Wheat	Potato	Wheat	Pea
F18	50.8561 N 2.0285 E	2017-05-17	Ultimo	2017/08/01	Till	Corn	Sugar beet	Potato	Flax	Chicory	Pea
F19	50.868 N 2.3193 E	2017-05-26	Ultimo	2017/08/01	Till	Potato	Wheat	Flax	Wheat	Potato	Pea
F20	50.827 N 2.365 E	2017-05-23	Ultimo	2017/08/01	Till	Pâture	Potato	Wheat	Potato	Wheat	Pea
F21	50.3327 N 2.3003 E	2017-05-24	Ultimo	2017/08/01	Till	Corn	Wheat	Sugar beet	Wheat	6-row barley	Pea
F22	50.337 N 2.2868 E	2017-05-24	Ultimo	2017/08/01	Till	Wheat	Flax	Wheat	Sugar beet	Wheat	Pea
Woestyne	50.748810 N 2.384470 E	2018-04-21	Messenger	T1 2018/05/16 T2 2018/06/06 T3 20/06/2018	No till	Bean	Wheat	Sugar beet	Wheat	Flax	Wheat
Ormelets	49.677433 N 3.940208 E	2018-04-12	Firenza	T1 2018/05/17 T2 2018/06/07 T3 2018/06/21	Till	Sugar beet	Wheat	Onion	Wheat	Flax	Wheat

\* The vernacular names refer to: *Allium cepa* (onion), *Beta vulgaris* (sugar beet), *Brassica napus* (rapeseed), *Chicorium* sp. (chicory), *Hordeum vulgare* (6-row barley), *Linum usitatissimum* (flax), *Phaseolus vulgaris* (bean), *Solanum tuberosum* (potato), *Triticum aestivum* (wheat), *Zea mays* (corn).

At the laboratory, the rhizospheric soil was carefully removed from the root systems and the stems were cut 5 to 10 cm above the collar. The plant aerial parts were discarded and the root systems were used for fungal and oomycetes isolation. The twenty-two bulk soil samples collected in 2017 were sieved at 4 mm. Each of the five soil samples (T0) collected respectively in Woestyne and in Ormelets in 2018 was subdivided by quartering. For each of them, a retained fraction of 200 g was sieved at 4 mm. The sieved fractions were pooled to provide a subsample for Woestyne and Ormelets, respectively. The physico-chemical properties of the subsequent set of twenty-four sieved soil samples were determined by the accredited INRAE Soil Analysis Laboratory (Arras, France) according to international (ISO) or French (NF) standardised methods. Each sample was ground to particle sizes lower than 250 µm. Particle-size distribution, pH in water, organic carbon (C), organic matter (OM), total calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>), nitrogen (N) and phosphorus (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - Olsen method) were analysed (supplementary data 1 – Annexe 2). Basic meteorological data of the two cropping seasons are provided in Table 13.

**Table 13** : Meteorological data over the pea cropping seasons 2017 and 2018 at the station of Mons-en-chaussée (Hauts-de-France, France). Monitoring data were obtained from the INRAE CLIMATIK platform (<https://intranet.inrae.fr/climatik/>, in French) managed by the AgroClim laboratory of Avignon, France.

Sampling year	Total precipitation (mm)	Temperature (°C)		
		Min.	Average	Max.
2017	163	12.6	18.4	24.3
2018	110.5	12.1	17.6	23.5

## 2.2 Fungi and oomycetes isolation

Symptomatic plants were carefully washed in sterile deionised water, surface-disinfected in 70% ethanol for 10 s, rinsed twice in sterile deionised water and dried on sterile filter paper. Four root fragments of 5 to 10-mm long were excised per plant from discoloured rot or necrotic lesions. For fungi isolation, three root fragments were plated onto three distinct plates of semi-selective malt extract agar medium (MEA, malt extract, 15 g.L<sup>-1</sup>; agar, 10 g.L<sup>-1</sup>) supplemented with citric acid (250 mg.L<sup>-1</sup>), chlortetracycline (50 mg.L<sup>-1</sup>), and streptomycin sulfate (100 mg.L<sup>-1</sup>), and were incubated for 24 h to 48 h at 25 °C. The isolation of oomycetes was based on the protocol proposed by Schmitthenner and Hilty (1962) for the samples collected in 2017. One symptomatic root fragment per plant was incubated in 10 mL of sterile water in a hemolysis tube added with Tween 20% at 16 °C for 48 h. One mL of this solution was spread onto corn meal agar medium (CMA) (Corn Meal Agar, 10 g.L<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany; agar, 10 g.L<sup>-1</sup>) amended with chlortetracycline (50 mg.L<sup>-1</sup>), streptomycin sulfate (100 mg.L<sup>-1</sup>), and benomyl (5 mg.L<sup>-1</sup>). Each agar disk was then turned around on itself into the plate using two sterile spatulas and plates were incubated at 18 °C for three weeks (Davet and Rouxel 1997). The strategy used for the isolation of oomycetes from the plants collected in 2018 was modified. One diseased root fragment per plant was plated directly onto semi-selective CMA added with benomyl (5 mg.L<sup>-1</sup>) and rifampicin (25 mg.L<sup>-1</sup>). Plates were incubated at 25 °C for 24 h to 48 h.

Emerging fungi and oomycetes (showing coenocytic hyphae) were sub-cultured and purified by hyphal tipping respectively onto potato dextrose agar (PDA, 39 g.L<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich) and CMA. Fungi were cultivated onto PDA and carnation leaf agar (agar, 20 g.L<sup>-1</sup>; sterilised carnation leaf on top of water agar) and oomycetes onto CMA medium for morphological characterization. One isolate *per* morphotype and *per* field for the samples collected in 2017 and all the isolates collected in 2018 were selected for further molecular identification and pathogenicity tests. A second step of purification by single-spore sub-culturing on PDA was performed on the selected isolates for which sporulation could be induced. The oomycetes cultures were maintained at 4 °C on CMA and in tubes containing 10 sterilised hemp seeds and 10 mL of sterile deionised water for long-term storage. Fungal isolates were stored at -80 °C using 1050 µL of a spore suspension in potato dextrose broth (PDB, 24 g.L<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich) added with 150 µL of glycerol. All isolates are stored in the

Microorganisms of Interest for Agriculture and Environment (MIAE, INRAE Dijon, France) collection.

### **2.3 DNA extraction and molecular identification of fungal and oomycete isolates**

Each selected isolate was cultured on PDA at 25 °C for 7 days, and the mycelium was scraped directly from the agar plates. Fifty milligrams of mycelium were used for DNA extraction using a FastDNA® SPIN kit (MP Biomedicals, Eschwege, Germany) according to the manufacturer's recommendations. DNA extracts were stored at -20 °C until PCR amplification.

Molecular identification of the isolates was carried out by sequencing the PCR product of up to four markers. The translation elongation factor 1- $\alpha$  gene (*TEF1*), which is recommended for *Fusarium* species identification (O'Donnell et al. 2015) was targeted for all isolates with morphological characteristics similar to those of *Fusarium* (Nelson et al. 1983). The internal transcribed spacer (ITS) region, considered as a universal barcode, was targeted for all fungi and oomycetes of other genera. The mitochondrial encoded gene of the cytochrome c oxidase subunit I (COI, *COX1*) was targeted to refine the taxonomic assignment of oomycetes isolates up to the species level. In complement of ITS sequences, *TEF1* gene and/or the D1-D2 region of the large subunit (LSU) ribosomal gene were also targeted for PCR amplification to refine the taxonomic assignment of some fungal isolates. For each locus, different sets of primers were used and selected for their ability to allow an amplification for the isolate of interest. The references and sequences of the primers used for PCR amplifications are presented in Table 14 and the markers and primers used for each isolate are listed in supplementary data 2 (Annexe 2).

PCRs were performed in 25- $\mu$ L reaction mixtures containing 150  $\mu$ M of dNTPs, 1 U of *Taq* polymerase (MP Biomedicals), 1  $\mu$ L of DNA, PCR reaction buffer and 0.1  $\mu$ M to 0.3  $\mu$ M of each primer depending on the pair used: 0.1  $\mu$ M for EF1/EF2 pair, 0.2  $\mu$ M for ITS5/ITS4, Fa/Ra, EF1-728F/EF2, EF983F/EF1567R and LROR/LR5 pairs, and 0.3  $\mu$ M for ITS1F/ITS4 and OomCoxI-Levup/Fm85mod pairs. PCRs were initiated with a 3 min incubation at 94 °C followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min 15 s at a variable annealing temperature, 1 min at 72 °C, and a final extension of 10 min at 72 °C. The annealing temperature was 57 °C for *TEF1* amplification with EF1/EF2 primers, 1 min at 60 °C for *TEF1* amplification with Fa/Ra primers, and 1 min at



55 °C for amplification with all other primer pairs. PCR amplicons were visualised on 2% agarose gels. Successful PCR reactions were sent to Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Germany) for Sanger sequencing in forward and reverse directions using the PCR primers as sequencing primers. For each PCR product, sequences from both strands were assembled using SEQMAN 6.0 (DNASTAR Lasergene, GATC Biotech). Sequence identities were determined using BLAST analysis from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Taxonomic identification was based on the sequence similarity of the amplified loci region with sequences available in the database and associated with a publication. The sequences were deposited in GenBank (Supplementary data 2 – Annexe 2).

**Table 14 :** PCR primers used for fungal and oomycete identifications

Targeted locus	Primer pairs	Forward primer sequence (5' - 3')	Reverse primer sequence (5' - 3')	References
Internal transcribed spacer (ITS)	ITS1F/ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Gardes and Bruns (1993) White et al. (1990) Cooke et al. (2000)
	ITS5/ITS4	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG		
	ITS6/ITS4	GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG		
	1389F/ITS4ngsUni	TTGTACACACCGCCC	CCTSCSCTTANTDATATGC	Amaral-Zettler et al. (2009) Tederloo et Lindahl (2016)
Translation elongation factor 1- $\alpha$ ( <i>TEF1</i> ) gene	EF1/EF2	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TCCTCCGCTTATTGATATGC	O'Donnell et al. (1998) Carbone and Kohn (1999)
	EF1-728F/EF2	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG		
	Fa/Ra	TCGTCATCGGCCACGTCGACTCT	CAATGACGGTGACATAGTAGCG	Edel-Hermann et al. (2015)
	983F/1567R	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	ACHGTRCCRATACCACCRATCTT	Rehner and Buckley (2005)
D1-D2 region of the Large subunit ribosomal (LSU) gene	LR5/LROR	ACCCGCTGAACTTAAGC	TCCTGAGGGAAACTTCG	Bunyard et al. (1996) Vilgalys and Hester (1990)
Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit I (COI) gene	OomCoxI-Levup/Fm85mod	TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC	RRHWACKTGACTDATRATACCAA	Robideau et al. (2011)

## 2.4 Pathogenicity tests

The protocols used to produce inoculums were adapted to the characteristics of the different isolates. Fungal isolates able to sporulate were cultivated in liquid minimal medium (MM, Correll 1987) in an incubator-shaker at 25 °C and 125 rpm for 7 days. The culture was then filtrated on a sterile 48- $\mu\text{m}$  mesh blended silk Nitex® 03-48/31 (Sefar, Heiden, Switzerland) and rinsed with sterile deionised water. The water-conidia suspension was quantified using a spectrophotometer, adjusted at  $10^5$  conidia.mL<sup>-1</sup> thanks to a pre-established standard range and 1 mL per plant was used as inoculum.

Fungal isolates that were unable to sporulate were cultivated in PDB at 25 °C and 125 rpm for 7 days. Mycelial cultures were crushed for homogenization using an Ultra-Turaxx® homogenizer device (IKA, Staufen, Deutschland). Each mycelial suspension was diluted at 2/3 with sterile deionised water and inoculated at 1mL per plant.

Inoculums of oomycete zoospores were produced using a modified version of the Mitchell and Yang methodology for *A. euteiches* zoospore production described by Wicker et al. (2001). Twenty CMA agar disks from 7-day-old cultures were transferred into 50 mL of peptone glucose broth (PGB) (20 g.L<sup>-1</sup> bactopeptone, 5 g.L<sup>-1</sup>; glucose), and incubated 1 day at 24 °C. PGB was then removed, and the obtained mycelium was rinsed three times for 2 h in 30 mL of sterilised Volvic water (Société des Eaux de Volvic, Volvic, France). Motile zoospores were counted with a Malassez haemocytometer and the concentration of the water-zoospore suspension was adjusted to inoculate each plant with  $10^5$  zoospores. Oomycetes for which sporulation could not be induced were cultivated on CMA plates at 24 °C for 4 days. One 5 mm diameter CMA disk was used to inoculate each plant.

The pathogenicity of the isolates was assessed on pea using an *in vitro* assay derived from Dyer and Ingram (1990). Pea seeds (cv. Firenze, Vilmorin, France) were disinfected in a sodium hypochlorite solution (1.5 g.L<sup>-1</sup> available Cl<sub>2</sub>) for 20 min, rinsed three times in sterile deionised water, plated onto MEA, and incubated in the dark at room temperature. After 48 h, germinated seeds without apparent symptoms of contamination were transferred into sterile glass tubes (20 cm deep, 3 cm diameter) containing 20 mL of Hoagland's No. 2 basal salt mixture at 1.6 g.L<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) added with 8 g.L<sup>-1</sup> of agar (Condalab). Seedlings were inoculated 5 days post germination with either 1 mL of the spores

or zoospores suspension or with one CMA disk, depending on the isolate, as described above. Each pathogenicity test included one positive control and one negative control. The reference strains *F. solani* f. *lisi* (Fspi2) or *Aphanomyces euteiches* RB84 (Wicker et al. 2001) were used as a positive control in assays testing fungi and oomycetes, respectively. One mL of sterile deionised water was used for the negative control plantlets. Eight tubes per isolate and per positive and negative control were prepared. Twenty pathogenicity assays were performed to test a total of 317 isolates. The tubes were incubated in a growth chamber with a thermoperiod of 25 °C day / 23 °C night and a photoperiod of 16 h light / 8 h dark. After 30 days, the plants were recovered from the tubes and the pathogenicity of the isolates was assessed by calculating the proportion among replicates of each isolate of (1) asymptomatic plants, (2) plants not dead but presenting symptoms of pea root rot and (3) dead plants. Koch's postulates were verified by the reisolation on PDA of the inoculated species from one symptomatic plant among the eight replicates. The isolation methodology was the same as previously described for the isolation step. This procedure was done for the five first tests performed (88 isolates). Koch's postulate were further on assumed to be fulfilled given the aseptic conditions in the tubes and the systematic recovery of the inoculated isolate from symptomatic pea roots during the five first tests. After notations, roots and aerial parts of each plant were cut at the collar level and placed in 5 mL tubes and paper envelopes, respectively. Each sample was dried in an oven at 80 °C for 48 h and then weighed with a precision balance.

## 2.5 Phylogenetic analysis

A phylogenetic analysis of *F. solani* and *F. oxysporum* isolates was performed using partial *TEF1* sequences. The *TEF1* sequences that were too short were excluded from this analysis. Several *TEF1* sequences of *F. solani* and *F. oxysporum* isolates were added as references according to previous phylogenetic studies (O'Donnell 2000; Skovgaard et al. 2002; O'Donnell et al. 2008; Šišić et al. 2018; Jenkins et al. 2021). Multiple alignments of DNA sequences were conducted with the MUSCLE alignment method (Edgar 2004) implemented in SeaView v5.0.4 (Gouy et al. 2021). The program JModelTestv2.1.7 (Darriba et al. 2012) was used to select the best fitting model for each sequence data set (GTR+G with 4 across site rate variations categories and GTR were respectively selected to construct *F. solani* and *F. oxysporum* trees).

Maximum likelihood (ML) analysis was performed using PhyML v3.0 (Guindon et al. 2010) implemented in SeaView v5.0.4. The topology of the resulting tree was tested by bootstrapping with 100 re-samplings of the data.

## 2.6 Statistical analyses

All statistical analyses were conducted and visualised using R statistical software version 4.0.1 for Windows (R Core Team 2020, Online Resource 1). The readxl package V1.3.1 and the tidyverse package v1.3.0 were used to import and to analyse the dataset (Wickham et al. 2019; Wickham and Brian. 2019). The packages ggplot2 v3.3.2, cowplot v1.1.0 and lemon v0.4.5 were used for data visualisation and graphic constructions (Wickham 2016; McKinnon Edwards 2020; Wilke 2020).

For each of the two sampling campaigns, the relative frequencies of fungal and oomycete species were calculated as the number of isolates of a considered species on the total number of isolates. The prevalence of each fungal or oomycete species was calculated as the percentage of symptomatic root samples and as the percentage of fields from which a considered species was isolated.

To compare the diversity of the fungal and oomycetes communities isolated in 2018 among sampling times and sampled fields, the beta diversity was analysed with a non-metric multidimensional scaling (NMDS) using the 'metaMDS' function of the vegan package (Oksanen et al. 2020), based on both Jaccard and Bray-Curtis distance matrices. Jaccard distance matrices were calculated from species presence/absence datasets (i.e. binary datasets) and Bray-Curtis distance matrices were calculated from species abundance datasets (i.e. number of isolates per species and per root sample). Dispersion ellipses were drawn using 'veganCovEllipse' function of vegan package. Significant distances were evaluated between the groups using non-parametric analysis of similarities (ANOSIM) using the 'anosim' function of the 'vegan' package on both Jaccard and Bray-Curtis distance matrices.

Dry plant biomass was calculated as the sum of the dry root biomass and the dry aerial part biomass.

Mean relative dry biomass of plants (RBp), roots (RBr) and aerial parts (RBa) were calculated according to the following formula:

$$RB = \frac{1}{n_2} \sum_{j=1}^{n_2} \frac{X_j}{\frac{1}{n_1} \sum_{i=1}^{n_1} Y_i}$$

where RB is the relative dry biomass of plants, roots or aerial parts,  $n_1$  is the number of negative control replicates,  $n_2$  the number of inoculated replicates of each isolate,  $X_j$  the dry biomass of plants, roots or aerial parts of each inoculated replicate,  $Y_i$  the dry biomass of plant, root or aerial parts of each negative control replicate.

For each *in vitro* pathogenicity test performed and for each isolate, the significance of the dry plant biomass difference with the negative control was tested with one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test using package 'mulcomp' (Hothorn et al. 2008). To compare species aggressiveness (considering species with at least five isolates), the average values of RBp data between species was tested using one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test, performed respectively with function 'anova\_test' and 'tukey\_hsd' of the 'rstatix' package (Kassambara 2021). In any case, residual assumption of normality was assessed graphically using 'ggqqplot' function of the package 'ggpubr' (Kassambara 2020) and homogeneity of variance was tested using Levene's test with the 'levene\_test' function. Principal component analysis (PCA) was computed using the PCA function of the package 'FactoMineR' (Husson et al. 2008). PCA was performed on variables RBr, RBa, and on the proportions of asymptomatic, symptomatic and dead plants measured for each isolate over all inoculated replicates. In order to classify isolates in groups of aggressiveness, isolates were considered as supplementary qualitative variables and were clustered using the k-means clustering algorithm performed with the 'kmean' function. The relevant number of clusters was determined by the Elbow method of the 'Nbclust' package (Charrad et al. 2014). PCA results were visualised using the package 'factoextra' (Kassambara and Mundt 2020) with isolates as individuals. Proportion data were tested in each case among the different groups by a Pearson's Chi-squared test using the chisq.test function (Yates corrections was used if the number of isolates was less than five in at least one group).

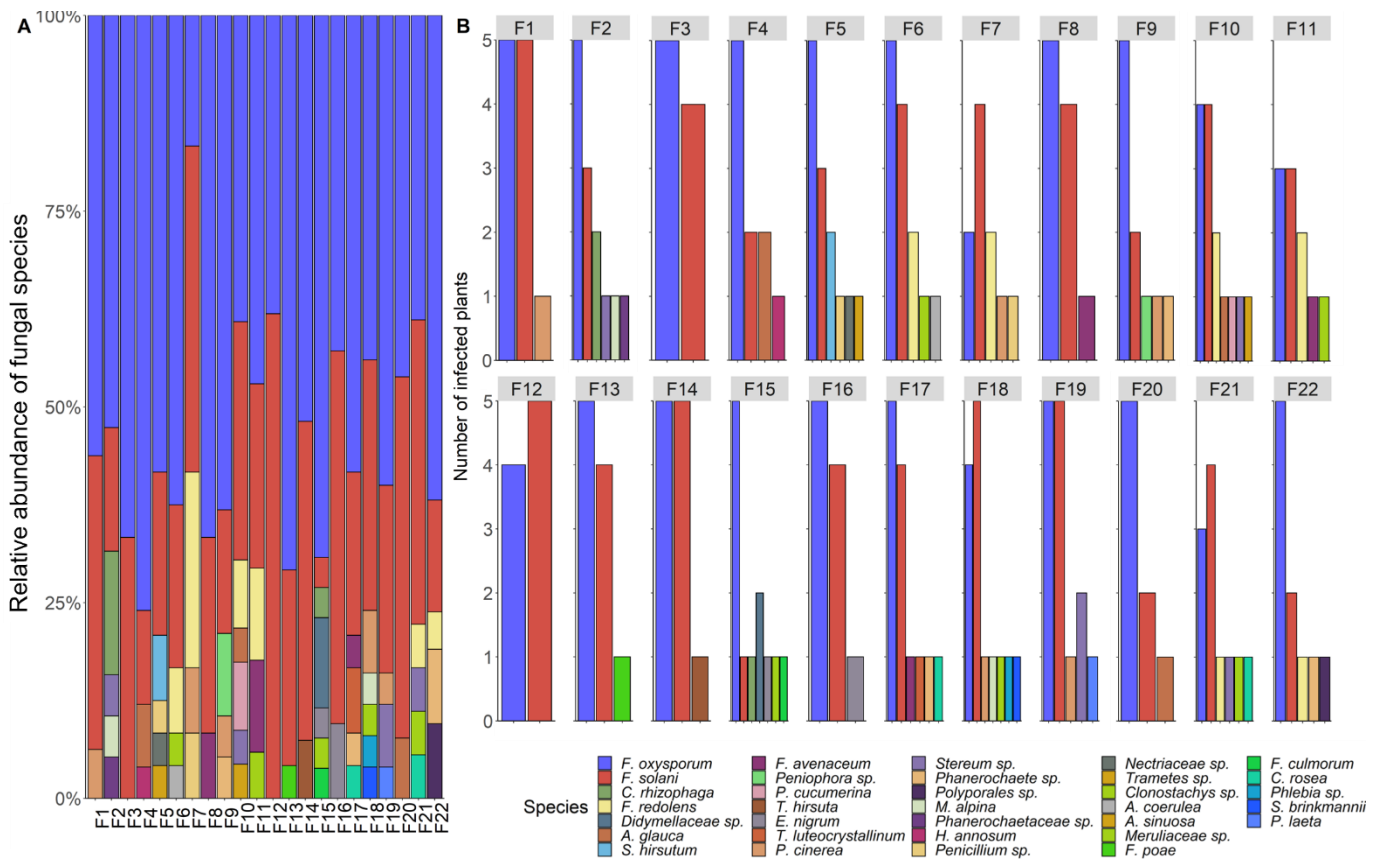
## 3. Results

### 3.1 Fungi associated with root rot of peas at the end of the cropping season

Fungi and oomycetes were isolated from root rot tissues of 110 pea plants from the 22 fields prospected at the end of the cropping season (i.e. at plant floral to grain maturation stages) during the 2017 sampling campaign. Four hundred and seventy three fungal isolates were isolated from symptomatic roots whereas no oomycete isolate was obtained. One hundred and sixty isolates, chosen to be representative of morphotypes and sampled fields (one isolate per morphotype and per field) revealed, thanks to the molecular identification, that they belonged to at least 37 different species (Table 15). Most isolates were identified at the species level using various molecular markers but 29 isolates were identified at a higher taxonomic level (supplementary data 2 – Annexe 2). The taxonomic diversity among isolates collected from the same plant was low, with a number of species ranging from 1 to 5 and a median of 2. ANOSIM test performed among Jaccard (i.e. presence-absence dataset;  $R=0.06$ ,  $p < 0.05$ ) and Bray-Curtis (abundance dataset;  $R=0.10$ ,  $p < 0.05$ ) distance matrices also showed weak  $R$  values, which suggested no major differences among the fungal communities associated with diseased pea between the 22 fields.

Isolates with morphological characteristics of *Fusarium* spp. were highly dominant among the fungi isolated from root rot lesions with 405 isolates (85.6% of the total collection). Morphological and molecular identification showed that they belonged to six species, among which *F. oxysporum*, *F. solani*, and *F. redolens* were the most abundant ones with 258, 129, and 11 isolates, respectively (Figure 17; Table 15). *F. oxysporum* and *F. solani* were found in all the prospected fields and were isolated from respectively 91% and 72% of the total sampled plants. However, their isolation frequencies varied among fields: *F. oxysporum* was the most isolated species in 17 fields and *F. solani* was the most isolated species in three fields (Figure 17). *F. redolens* was found in 27% of the prospected fields and was isolated from 10% of the total sampled plants (Table 15). *F. oxysporum* was isolated from 91% and 50% of the plants also infested by *F. solani* and *F. redolens* respectively, and *F. solani* was isolated from 80% of the plants infested by *F. redolens*. The three species were isolated together but only

from three plants. Other *Fusarium* species were less frequently isolated: *F. avenaceum* (5 isolates from 3 fields), *F. culmorum* (1 isolate) and *F. poae* (1 isolate). Beside *Fusarium* spp., several other species were more rarely isolated from pea root lesions such as *Peniophora cinerea* and *Stereum* sp. (6 isolates from 5 fields each) (Figure 17). *Clonostachys rhizophaga* (4 isolates) and Didymellaceae sp. (3 isolates) were the second most isolated taxon in the fields F2 and F15, respectively. Several other fungi were isolated with a low relative frequency (<1%) (Table 15). Finally, the number of different taxa isolated from symptomatic pea roots varied from two to seven depending on the field (Figure 17).



**Figure 17 :** (A) Relative abundance of fungal species among isolates collected from symptomatic pea roots sampled in 22 fields prospected in 2017 and (B) number of sampled plants infected by each isolated species in each field. The fields are described in Table 12.



**Table 15 :** Relative frequencies of isolation of fungi and their prevalence among prospected fields and sampled plants in 2017. Prevalence was calculated as the percentage of the total number of plants or fields from which each taxon was isolated.

Taxon	Relative frequency (%) (n = 473)	Prevalence (%)	
		Among plants (n = 110)	Among Fields (n = 22)
<i>Fusarium oxysporum</i>	54.5	90.9	100.0
<i>Fusarium solani</i>	27.3	71.8	100.0
<i>Fusarium redolens</i>	2.3	10.0	27.3
<i>Peniophora cinerea</i>	1.3	4.5	22.7
<i>Fusarium avenaceum</i>	1.1	2.7	13.6
<i>Stereum</i> sp.	1.1	3.6	22.7
<i>Absidia glauca</i>	0.8	3.6	13.6
<i>Clonostachys rhizophaga</i>	0.8	2.7	9.1
<i>Clonostachys</i> sp.	0.8	3.6	18.2
<i>Phanerochaete</i> sp.	0.8	2.7	13.6
<i>Agaricomycetes</i> sp.	0.6	2.7	13.6
<i>Didymellaceae</i> sp.	0.6	1.8	4.5
<i>Epicoccum nigrum</i>	0.6	1.8	9.1
<i>Baltazaria galactina</i>	0.4	1.8	9.1
<i>Clonostachys rosea</i>	0.4	1.8	9.1
<i>Mortierella alpina</i>	0.4	1.8	9.1
<i>Penicillium</i> sp.	0.4	1.8	9.1
<i>Peniophora</i> sp.	0.4	0.9	4.5
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	0.4	0.9	4.5
<i>Polyporales</i> sp.	0.4	0.9	4.5
<i>Stereum hirsutum</i>	0.4	1.8	4.5
<i>Trametes hirsuta</i>	0.4	0.9	4.5
<i>Trichoderma luteocrystallinum</i>	0.4	0.9	4.5
<i>Absidia coerulea</i>	0.2	0.9	4.5
<i>Adustoporia sinuosa</i>	0.2	0.9	4.5
<i>Amyloporia xantha</i>	0.2	0.9	4.5
<i>Fusarium culmorum</i>	0.2	0.9	4.5
<i>Fusarium poae</i>	0.2	0.9	4.5
<i>Heterobasidion annosum</i>	0.2	0.9	4.5
<i>Meruliaceae</i> sp.	0.2	0.9	4.5
<i>Nectriaceae</i> sp.	0.2	0.9	4.5
<i>Peniophora laeta</i>	0.2	0.9	4.5
<i>Phanerochaetaceae</i> sp.	0.2	0.9	4.5
<i>Phlebia</i> sp.	0.2	0.9	4.5
<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.2	0.9	4.5
<i>Trametes viride</i>	0.2	0.9	4.5
<i>Trichoderma viride</i>	0.2	0.9	4.5

### 3.2 Fungi and oomycetes associated with root rot of peas at various phenological stages

Endophytic fungi and oomycetes were isolated from root symptomatic tissues of peas sampled at three different phenological stages (pea emergence (T1), elongation (T2), and flowering/grain maturation (T3)) in two different fields along the 2018 cropping season. One hundred and seventy three isolates were isolated and identified using morphological and molecular criteria. They included 162 isolates of fungi (93.6% of the total collection) and 11 isolates of oomycetes (6.4% of the collection, all belonging to the genus *Pythium*), distributed in at least 38 different species (Table 16). One hundred and fifty-one isolates were identified at the species level, 20 at the genus level, one at the order level and one at the family level (Supplementary data 2 – Annexe 2)

As for the 2017 sampling campaign, the genus *Fusarium* was predominant with 88 isolates (50.9% of the isolates) (Table 16). The most frequent species were: *F. oxysporum* (38 isolates), *F. solani* (27 isolates) and *F. redolens* (14 isolates). *F. oxysporum*, *F. solani*, and *F. redolens* were isolated from 80%, 57%, and 33% of the sampled plants, respectively. However, they were isolated in different proportions between the two fields with respectively 87%, 47%, 73% of the plants sampled in Ormelets, and 73%, 20% and 6% of the plants sampled in Woestyne. *F. oxysporum* was isolated from 82% and 90% of the plants from which *F. solani* and *F. redolens*, respectively, were also isolated, including 5 plants from which the three species co-occurred. Other *Fusarium* species were less frequently isolated in the Woestyne field: *F. avenaceum* (3 isolates and only at T2), *F. tricinctum* (3 isolates only found at T1 and T3), and *F. culmorum* (1 isolate found at T1) (Table 16).

*Clonostachys* was the second most represented genus with 18 isolates (10.4% of the isolates). Isolates were distributed between the species *C. rosea* (9 isolates) and *C. rhizophaga* (8 isolates), and one isolate was unidentified at the species level. *C. rosea* was found in the two sampled fields at different phenological stages, whereas *C. rhizophaga* was only isolated at T2 and T3 in the field of Ormelets. (9% of the sampled fields in 2017 and 70% of the symptomatic plants from the field of Ormelets sampled at T1 and T2 in 2018). *Mortierella* spp. represented 9.9% of the total collection (17 isolates). *M. alpina* (10 isolates) isolated only from young pea plants at T1, and *M. elongata* (5 isolates) were the most prevalent *Mortierella* species, accompanied by one isolate of *M. minutissima* and one isolate of an unidentified *Mortierella*

species. Several *Pythium* species represented by 11 isolates were isolated from symptomatic plants collected at the elongation stage (T2) and flowering/grain maturation stage (T3) in the two plots monitored in 2018, sometimes with two species in the same plant (*P. terrestris* W35a and *P. intermedium* W35b) and always with at least one species of *Fusarium*. However, no *Pythium* isolate was found at plant emergence (T1) in neither of the two fields.

**Table 16** : Relative frequencies of isolation of fungi and oomycetes, and their prevalence among sampled plants at each sampling time and in total in 2018. Prevalence was calculated as the percentage of the total number of plants from which each taxon was isolated.

Taxon	Relative frequency (%) (n = 173)	Prevalence among sampled plants (%)			
		T1 (n=10)	T2 (n=10)	T3 (n=10)	Total (n=30)
<i>Fusarium oxysporum</i>	22	50	100	90	80
<i>Fusarium solani</i>	16.2	50	50	70	56.7
<i>Fusarium redolens</i>	8.1	20	40	40	33.3
<i>Mortierella alpina</i>	5.8	50	0	10	20
<i>Clonostachys rosea</i>	5.2	20	40	20	26.7
<i>Clonostachys rhizophaga</i>	4.6	0	30	40	23.3
<i>Trichoderma velutinum</i>	3.5	20	20	20	20
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	2.9	30	10	0	13.3
<i>Mortierella elongata</i>	2.9	20	20	10	16.7
<i>Mucor hiemalis</i>	2.3	10	30	0	13.3
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	2.3	20	10	10	13.3
<i>Alternaria</i> sp.	1.7	10	0	20	10
<i>Fusarium avenaceum</i>	1.7	0	30	0	10
<i>Fusarium tricinctum</i>	1.7	10	0	10	6.7
<i>Pseudeurotium</i> sp.	1.7	10	0	0	3.3
<i>Pythium</i> sp.	1.7	0	20	10	10
<i>Trichoderma tomentosum</i>	1.7	0	30	0	10
<i>Chaetomium</i> sp.	1.2	10	0	0	3.3
<i>Pythium amasculinum</i> or <i>P. hydnosporum</i>	1.2	0	10	10	6.7
<i>Pythium terrestris</i>	1.2	0	0	20	6.7
<i>Absidia glauca</i>	0.6	0	0	10	3.3
<i>Acremonium sclerotigenum</i>	0.6	10	0	0	3.3
<i>Alternaria infectoria</i>	0.6	0	0	10	3.3
<i>Chaetomiaceae</i> sp.	0.6	10	0	0	3.3
<i>Clonostachys</i> sp.	0.6	0	10	0	3.3
<i>Corynespora</i> sp.	0.6	0	0	10	3.3
<i>Fusarium culmorum</i>	0.6	0	10	0	3.3
<i>Fusarium solani</i> species complex	0.6	0	10	10	3.3
<i>Mortierella minutissima</i>	0.6	0	10	0	3.3
<i>Mortierella</i> sp.	0.6	0	0	10	3.3
<i>Mucor circinelloides</i>	0.6	10	0	0	3.3
<i>Penicillium brasilianum</i>	0.6	10	0	0	3.3
<i>Plectosphaerella plurivora</i>	0.6	10	0	0	3.3
<i>Pleosporales</i> sp.	0.6	10	0	0	3.3
<i>Pythium</i> Cluster B2a species complex	0.6	0	10	0	3.3
<i>Pythium heterothallicum</i> or <i>P. glomeratum</i>	0.6	0	0	10	3.3
<i>Pythium intermedium</i>	0.6	0	0	10	3.3
<i>Pythium oligandrum</i>	0.6	0	0	10	3.3

The NMDS ordination biplots showed an evolution of fungal and oomycete communities of symptomatic pea roots along the cropping season in each field (Figure 18-A-D). The community at T1 was slightly different from the ones observed at T2 and T3 in both fields. ANOSIM test realised on dissimilarity matrices among sampling times confirmed the observed differences (Table 17-A). Significant mid-range R values ( $p < 0.05$ ) were obtained from Jaccard matrices between T1 and T2 and between T1 and T3 for the two fields. These differences in communities between T1 and T2 on one side and between T1 and T3 on the other side were even more pronounced with the ANOSIM test performed on the abundance dataset with stronger R-values ranging from 0.36 to 0.60 ( $p < 0.05$ ) (Table 17-A). However, communities between T2 and T3 were only significantly different in terms of species composition and abundance in the field of Woestyne with mid-range R values obtained from Jaccard and Bray-Curtis matrices of 0.30 ( $p < 0.01$ ) and 0.46 ( $p < 0.01$ ), respectively. No significant difference in species composition and abundance was observed among communities of fungi and oomycetes of the field of Ormelets between T2 and T3.

Fungal and oomycete communities of symptomatic pea roots also varied among fields at a same plant phenological stage (Figure 18-E, F). ANOSIM test showed that communities were significantly different ( $p < 0.001$ ) between the fields of Woestyne and Ormelets (Table 17-B). The mid-range R value obtained from Jaccard distance matrices at T1 ( $R = 0.58$ ) was higher than the R values obtained at T2 ( $R = 0.45$ ) and T3 ( $R = 0.23$ ). These results suggest that the level of dissimilarity between the communities of these two fields was higher at pea emergence and then decreased to converge toward a more similar species composition at flowering/grain maturation stage. The differences between the two fields at each phenological stage remained significant ( $p < 0.05$ , Table 17-A). Furthermore, the dissimilarity between the communities of these two fields was even more pronounced based on the data of variation in abundance of each taxon. R values obtained on Bray-Curtis matrices were slightly higher at T1 and T3 than the ones previously obtained from Jaccard distance matrices (Table 17-B).



**Table 17** : Differences in fungi and oomycetes community **(A)** within fields and phenological stages of pea plants and **(B)** among fields and phenological stages of pea plants. R-values were obtained using an ANOSIM test performed among Jaccard and Bray-Curtis dissimilarity matrices of each group, respectively. Sampling times T1, T2, and T3 correspond to the three phenological stages, pea emergence, elongation and flowering/grain maturation, respectively.

<b>A</b>		T1 vs T2	T1 vs T3	T2 vs T3
Woestyne	Presence/absence (Jaccard)	0.38 **	0.33 *	0.30 **
	Abundance (Bray-Curtis)	0.36 **	0.57 **	0.46 **
Ormelets	Presence/absence (Jaccard)	0.49 *	0.42 *	-0.04
	Abundance (Bray-Curtis)	0.52 *	0.60 *	-0.01

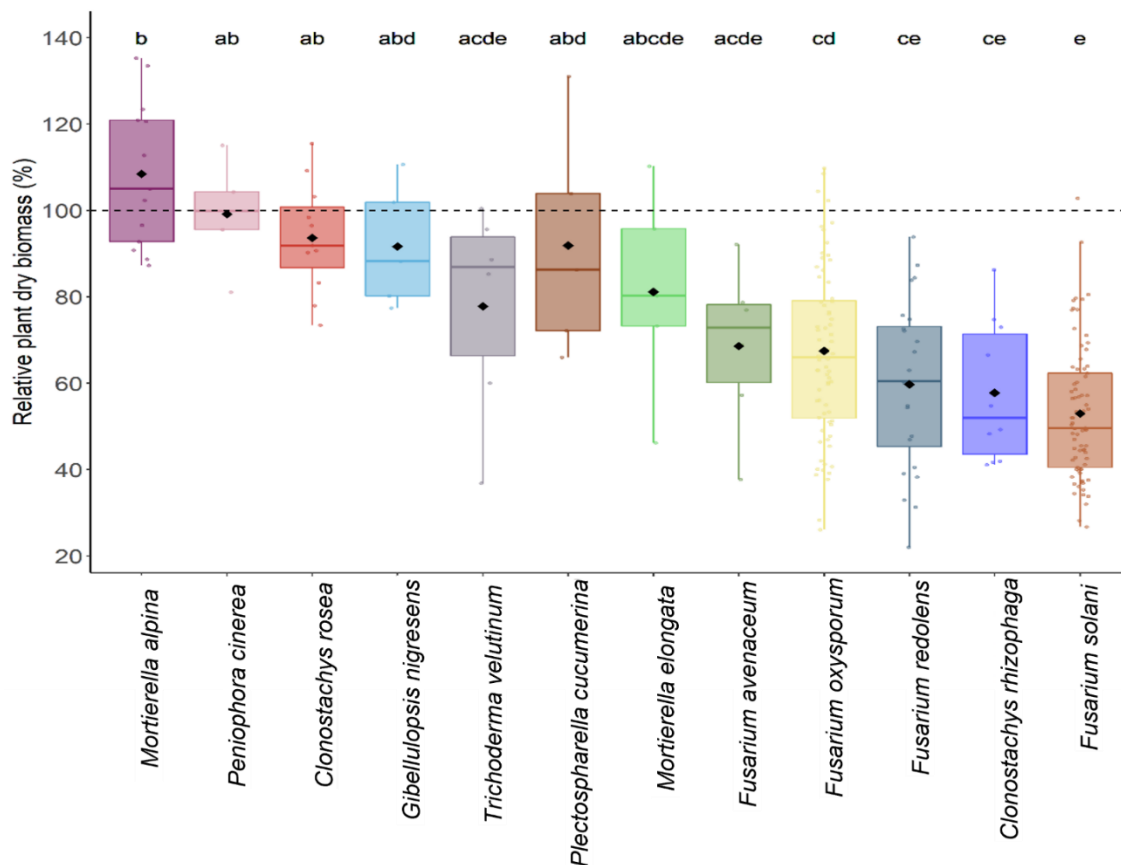
\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ; vs = versus

<b>B</b>	Woestyne vs Ormelets			
	T1	T2	T3	Overall
Presence/absence (Jaccard)	0.58 ***	0.45 *	0.23 *	0.21 ***
Abundance (Bray-Curtis)	0.61 ***	0.40 *	0.49 **	0.20 ***

### 3.3 Pathogenicity of fungi and oomycetes isolates

The pathogenicity of 317 isolates identified using molecular markers was assessed *in vitro*. Koch's postulates were systematically fulfilled for all of the 88 tested isolates. Considering the aseptic conditions in the *in vitro* test tubes, the Koch's postulates were considered to be fulfilled for the tests carried out thereafter. Seventy-eight percent of the 317 tested isolates led to visible symptoms on pea plants (considering at least 2 symptomatic plants among the 8 replicates). Fifty-four percent of these 317 isolates led to significant plant biomass reduction in comparison with the negative control (Dunnett's t test,  $p < 0.05$ ; Supplementary data 3 and 4 – Annexe 2). On average, isolates of *F. solani* caused the most severe reduction in pea biomass followed by *C. rhizophaga*, *F. redolens*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, and *Trichoderma velutinum* (Figure 19). The difference in biomass reduction was significant between *F. solani* isolates and *F. oxysporum* isolates (Tukey HSD,  $p < 0.05$ ).



**Figure 19** : Boxplot representation of the mean relative dry biomass of plants (RBp) obtained in the *in vitro* pathogenicity assay for the isolates of each species. Results are only reported for species including at least five isolates. Each coloured dot represents the RBp value of one fungal isolate. Black dots represent the average among RBp values within each species. The dashed horizontal line represents the dry biomass level of the non-inoculated control. Black letters indicate the significance of average values, a same letter indicating a same group (One-way ANOVA, Tukey's HSD post hoc test,  $p < 0.05$ ).

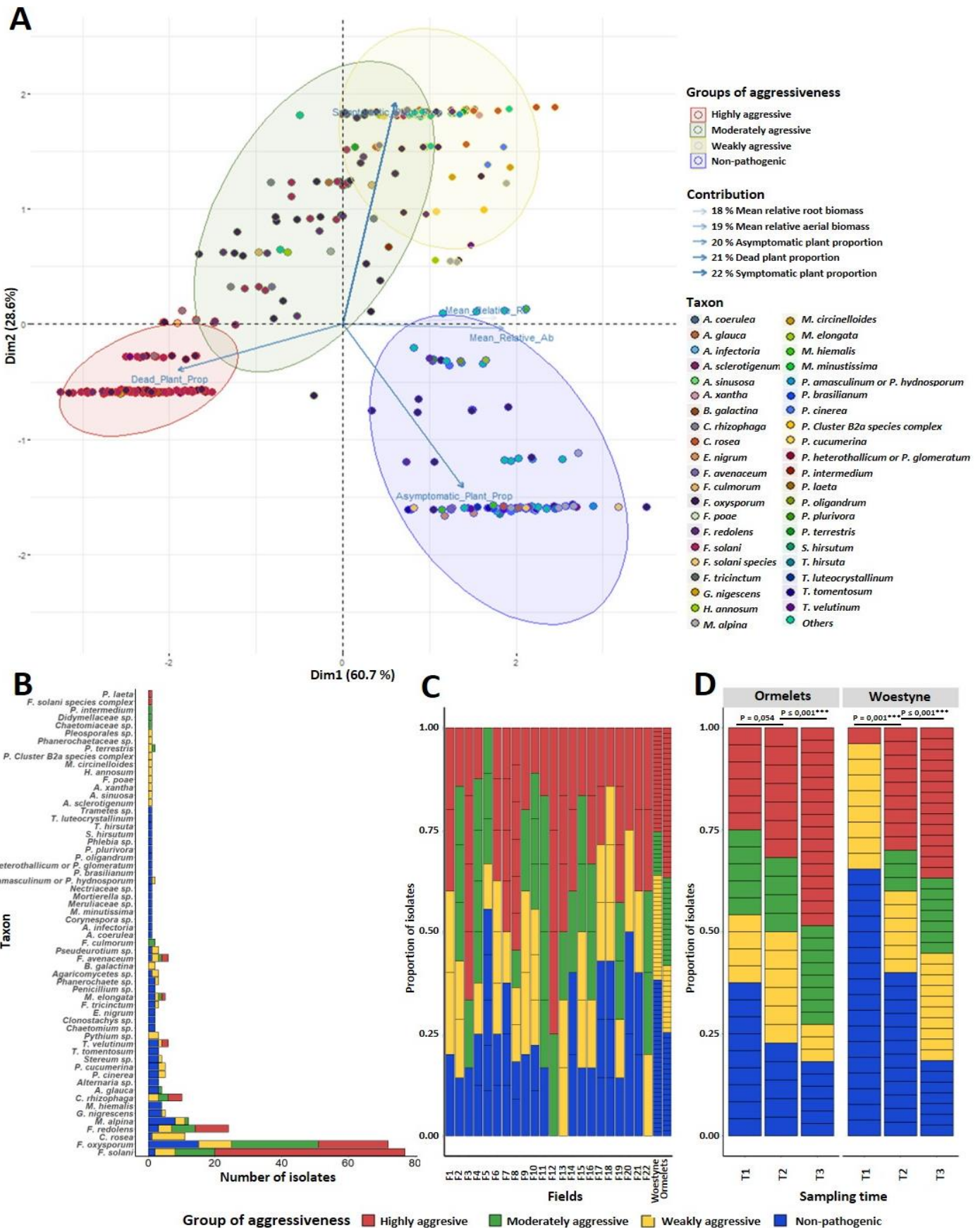
A PCA performed on pathogenicity variables allowed us to classify the various isolates in four groups of aggressiveness levels, ranging from highly aggressive to non-pathogenic (Figure 20-A). The highly pathogenic group gathered 99 isolates (31.2%), the moderately pathogenic group gathered 58 isolates (18%), the weakly pathogenic group gathered 68 isolates (21.5%) and the non-pathogenic group gathered 92 isolates (29%).

Among the 77 isolates of *F. solani* tested, 74% were classified as highly aggressive, 15.6% as moderately aggressive, 7.8% as weakly aggressive and 2.6% as non-pathogenic (Figure 20-B). Ninety-five percent of the isolates of *F. solani* also led to significant reduction of pea dry biomass in comparison with the negative control (Dunnett's t test,  $p < 0.05$ ; supplementary data 3 and 4). A similar distribution of isolates among aggressiveness categories was observed for *C. rhizophaga* (10 isolates tested) and *F. redolens* (24 isolates tested), with respectively 40% and 41.7% of isolates classified as highly aggressive, 30% and 29.2% as moderately aggressive, 30% and 16.7% as weakly aggressive and only 0 and 12.5% as non-pathogenic (Figure 20-B). Respectively 90% and 79% of the isolates of these two species led to significant biomass reduction in comparison to the negative control ( $p < 0.05$ , supplementary data 3 et 4 – Annexe 2). Isolates of *F. oxysporum* (72 isolates tested) were more evenly distributed among groups of aggressiveness with respectively 29.2%, 36.1%, 13.9% and 20.8% of highly, moderately, weakly aggressive, and non-pathogenic isolates (Figure 20-B). This classification is also supported by the biomass reduction data with 72% of the *F. oxysporum* isolates leading to significant biomass reduction in comparison with the negative control ( $p < 0.05$ ; supplementary data 3 and 4 – Annexe 2). Two isolates of *F. avenaceum* and *Trichoderma velutinum* (among 6 isolates tested for each species) were classified as highly aggressive, 1 as moderately aggressive, and 3 as weakly aggressive to non-pathogenic (Figure 20-B). Two isolates of these two species also led to significant biomass reduction in comparison with the negative control ( $p < 0.05$ ; supplementary data 3 and 4 – Annexe 2). In addition, several species isolated with low frequencies (from 1 to 5 isolates) gathered isolates classified as moderately to highly aggressive (Figure 20-B). This was the case for *Amyloporia xantha*, *Adustoporia sinuosa*, *Acremonium sclerotigenum*, *Baltazaria galactina*, *Gibulloopsis nigrescens*, *Heterobasidion annosum*, *Peniophora cinerea*, *P. laeta*, *Mortierella alpina*, *M. elongata*, *Mucor circinelloides*, *Fusarium culmorum*, *F. poae*, *F. tricinctum*, *Pythium intermedium*, *P. terrestris* and *Plectosphaerella cucumerina* (Figure 20-B). It should be noted that two isolates of



*Epicoccum nigrum* significantly reduced the plant dry biomass compared to the negative control but were classified as non-pathogenic as they caused no symptoms on the inoculated plants ( $p < 0.05$ ; supplementary data 3 and 4 – Annexe 2).

The proportion of isolates in each group of aggressiveness varied among sampled fields (Figure 20-C). Zero to 80% of the isolates were highly aggressive and 0 to 70% were moderately aggressive, depending on the field. For the first sampling campaign in 22 fields, the number of different taxa including highly aggressive isolates varied from 0 to 6 depending on the field. The proportion of isolates in each group of aggressiveness also varied among sampling times (i.e. phenological stages) in the two fields sampled in 2018 (Figure 20-D). It was nearly significantly different between T1 and T2 in the field of Ormelets (Pearson's Chi-square test;  $p = 0.055$ ) and significantly different between T1 and T2 in the field of Woestyne (Pearson's Chi-square test;  $p < 0.001$ ). It was significantly different in both fields between T2 and T3 ( $p < 0.001$ ). The proportions of isolates categorised as non-pathogenic to weakly aggressive decreased progressively between T1 and T3 whereas the proportions of isolates categorised as moderately to highly aggressive increased. At the same time, the number of different taxa including highly aggressive isolates progressively increased from one and six at T1 in the fields of Woestyne and Ormelets, respectively to 14 and 16 at T3 in the fields of Woestyne and Ormelets, respectively (Figure 20-D).



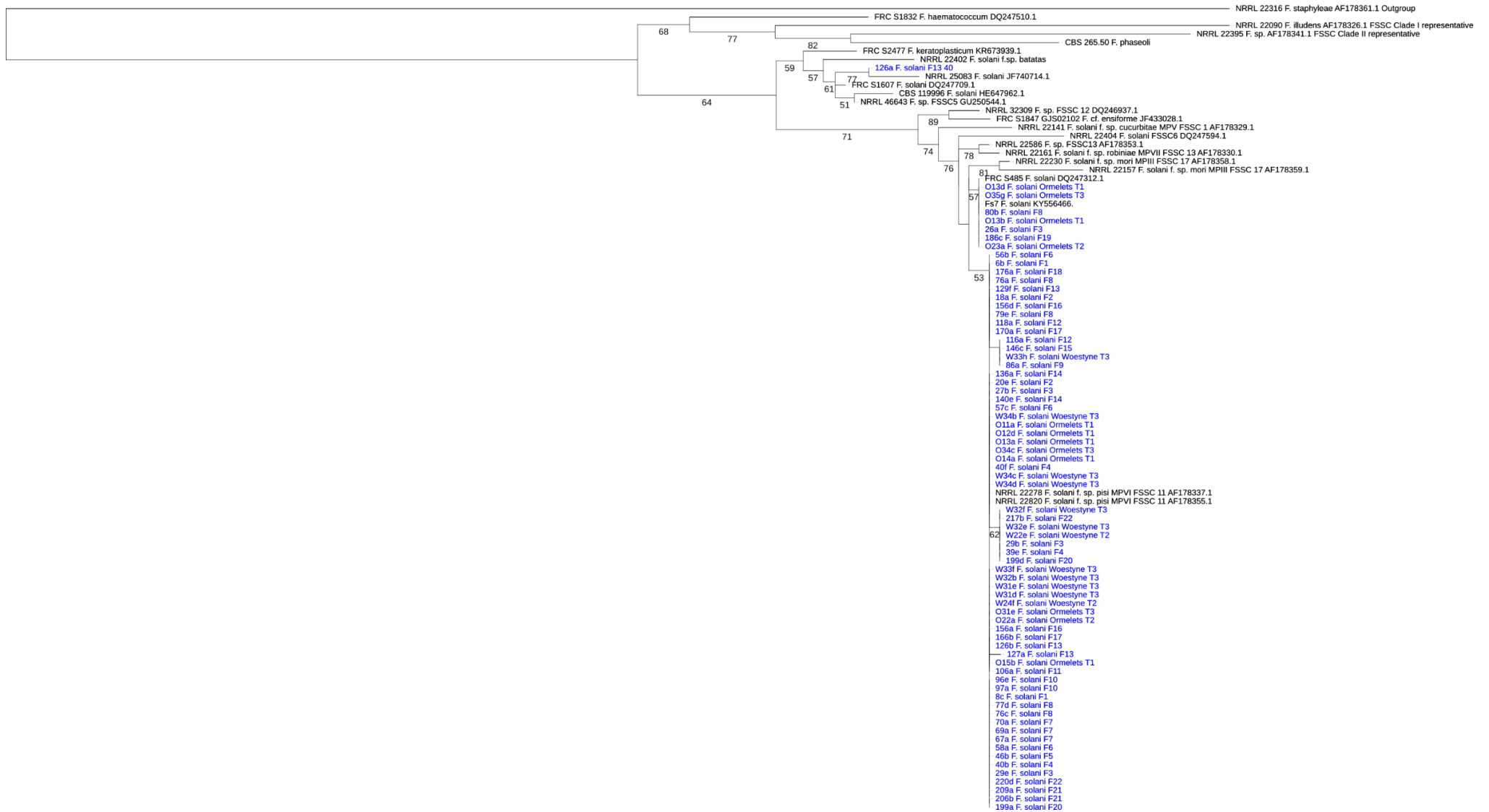
**Figure 20 :** (A) Principal component analysis (PCA) biplot showing variables (represented by arrows) measured during pathogenicity tests and isolates of each species (represented by coloured points). Ellipses represent four groups of aggressiveness (from non-pathogenic to highly aggressive) regrouped based on k-means clustering algorithm. "Others" regroup all isolates unidentified at the species level. (B) Number of isolates of each species in each group of aggressiveness. (C) Proportion of isolates of each group of aggressiveness by field of origin (D) Proportion of isolates of each group of aggressiveness by sampling time (i.e. phenological stage) in the fields of Woestyne and Ormelets. Vertical lines in bars separate different isolates in Fig. 5-C and 5-D. P values were obtained using Pearson's Chi-square test.

### 3.4 Genetic diversity among the isolates of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*

Given the presence of several *formae specialis* within *F. oxysporum* and *F. solani* and the predominance of these species among the isolates from diseased pea roots, a phylogenetic analysis was performed for each of these species based on the partial *TEF1* sequences of the isolates of this study and of reference isolates. For each of these species, a ML tree permitted to phylogenetically refine the taxonomic position of the isolates in relation to several reference strains.

The genetic diversity among the isolates of *F. solani* of this study was low (Figure 21). The 72 isolates were distributed into six sequence types (ST), among which four ST including 64 isolates were very closely related. These ST grouped with two reference strains of *F. solani* f. sp. *pisi* (NRRL22278 and NRRL22820) belonging to the *Fusarium solani* species complex (FSSC) clade 11. A fifth ST was closely related to the four others; it included 7 isolates together with two reference strains of *F. solani*: the FRC S485 reference strain also belonging to the FSSC clade 11 and the Fs7 strain of the *Fusarium pisi* comb. nov. lineage (formerly *F. solani* f. sp. *pisi*) proposed by Šišić *et al.* 2018a. Two reference sequences of *F. solani* f. sp. *mori* appeared to be the most closely related neighbours of the five ST grouping 71 isolates of *F. solani* analysed in this study. Finally, the last ST, including only one isolate, was distantly related to all other isolates. This isolate was highly aggressive; other highly aggressive isolates were distributed in the five other ST.

Tree scale: 0.01



**Figure 21** : Phylogenetic tree of *Fusarium solani* based on Maximum likelihood (ML) analysis of partial TEF1 sequences. Values at nodes indicate ML bootstrap supports greater than 50%. The tree was rooted with the TEF1 sequence of the reference strain NRRL 22316 of *Fusarium staphyleae*. *F. solani* isolates of this study are represented in blue. Reference strains are represented in black. Alphanumeric designations next to reference strains and species names indicate respectively the three-locus haplotypes and mating population (MP) as described in O’Donnell et al. (2008). These designations are followed by the Genbank accession number of their TEF1 sequence. The field of origin and the sampling time (for the isolates collected in 2018) are indicated next to the isolate and species names. The fields are described in Table 12.

The 69 isolates of *F. oxysporum* analysed in this study were distributed into eleven ST, which were spread in six clusters (Figure 22). All clusters gathered isolates from different fields, except cluster C that regrouped only isolates from the field of Ormelets. The clusters A, E and F gathered the large majority (81%) of the *F. oxysporum* isolates of this study. Cluster A included the reference strain PG67, cluster E included the reference strains PG58 and PG60 and cluster F included the reference strains PG57, which were isolated from root rotted peas in the United Kingdom (UK). Clusters E and F also included *F. oxysporum* reference strains isolated from root necrosis of pea in Denmark (Isolates 306 and 330 in cluster E and isolate 314 in cluster F). Cluster D gathered 5 isolates of the 2018 sampling campaign together with strains previously reported as *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (FOP) race 2 (i.e. PG2, R2, CBS183.85 , NRRL3631). Lastly, the 5 isolates of the field of Ormelets were included in cluster C together with the UK strain PG63 and the Danish isolate322 and isolate302.

In addition, some isolates of *F. solani* and *F. oxysporum* collected from the same symptomatic plant were genetically different. For example, the isolates O13a and O13b of *F. solani*. They were isolated from a same symptomatic plant of the field of Ormelets and, they were both highly aggressive but they were identified as belonging to two different ST. Isolates of *F. oxysporum* O31d and O31g, O32f and O32d, O25b and O25c, and W35d and W35e isolated in each case from a same plant were included in clusters C and D, E and D, A and D, and E and F, respectively.

Tree scale: 0.01



**Figure 22** : Phylogenetic tree of *Fusarium oxysporum* based on Maximum Likelihood (ML) analysis of partial TEF1 sequences. Values at nodes indicate ML bootstrap support greater than 50%. The tree is rooted with the TEF1 sequence of *F. redolens* O34b isolated in this study. Reference strains are represented in black. *F. oxysporum* isolates of this study are represented in blue. The field of origin and the sampling time (for the isolates collected in 2018) are indicated next to the isolate and species names. The fields are described in Table 12.

## 4. Discussion

The first aim of this study was to characterize the composition of the pea root rot complex throughout the pea cropping area in the north of France and to investigate the evolution of its composition along a cropping season. To this end, endophytic fungi and oomycetes were isolated from root symptomatic tissues of pea plants sampled in 22 fields of green pea at the flowering/grain maturation stage in 2017, and in two fields along the 2018 cropping season.

Isolation frequencies and pathogenicity tests highlighted the predominant role of *Fusarium* spp. in the pea root disease. *F. solani*, *F. oxysporum*, and *F. redolens* were by far the most frequently isolated fungal species from symptomatic pea roots. They were isolated from respectively 91%, 72%, and 10% of the symptomatic plants sampled in 2017 and from respectively 80%, 57%, and 33% of the symptomatic plants sampled in 2018. The pathogenicity on green pea was confirmed on the cv. Firenze for the majority of the isolates of these three species.

*F. oxysporum* was the most frequently isolated species in this study. The phylogenetic analysis revealed the genetic proximity of the isolates from northern France with *F. oxysporum* isolated from root-rotted peas in United Kingdom (UK) and with isolates from pea and soil from Denmark (Skovgaard et al. 2002; Jenkins et al. 2021). Indeed, the clades A, E, and F revealed by the phylogenetic tree included the large majority of the *F. oxysporum* isolates of this study (81%). They were respectively included in the clade 8 (based on the PG67 reference strain), the closely related clade 6 (based on PG58 and PG60 reference strains) and the clade 7 (based on PG57 and NRRL36228 reference strains) of *F. oxysporum* isolated from root rotted peas in the Yorkshire, Lincolnshire and Suffolk (UK) as highlighted by Jenkins et al. (2021). Clusters E and F also included *F. oxysporum* reference strains (isolate306, isolate330 and isolate314) isolated from root necrosis of pea in Denmark. They corresponded to clade III highlighted by Skovgaard et al. (2002) using MLST. Five isolates of the 2018 sampling campaign, gathered in the cluster D, corresponded to clade 5 highlighted by Jenkins et al. (2021). This clade included strains previously reported as FOP race 2 (i.e. PG2, R2, CBS183.85, NRRL3631). Jenkins et al. (2021) observed that the UK isolates from the clade 6, 7 and 8 were phylogenetically distinct from FOP race 1 and race 2 and possessed only up to one or two *Secreted In Xylem (SIX)* genes (*SIX6* or *SIX14*) rather than nine in FOP race 1 and five in FOP

race 2. They thus suggested that UK isolates mainly did not belong to FOP race 1 and 2, except one strain of the clade 5. This strain was proposed to be part of a putative race 2<sup>s</sup>, a variant of FOP race 2, because it possesses only three *SIX* genes (*SIX1*, *SIX6* and *SIX13*). This hypothesis is supported by the presence of monogenic resistance to FOP race 1 and race 2 in several pea cultivars, which could lead to a counter-selection of these races (Grajal-Martin & Muehlbauer 2002; Infantino et al. 2006). Moreover, isolates from Denmark and UK caused various degrees of brown to black foot and root rot rather than wilt in pathogenicity assays on peas (Skovgaard et al. 2002; Jenkins et al. 2021). These symptoms are similar to those obtained with the majority of *F. oxysporum* isolates in the pathogenicity tests performed in our study. These isolates caused none to severe root rot symptoms. However, they were in some cases accompanied with wilting of pea plants. The development of wilt symptoms for some isolates could be due to the presence of more *SIX* genes in their genome than in UK isolates. Indeed, the acquisition of six genes responsible for wilt through horizontal gene transfer has already been shown (Does et al. 2008; Rocha et al. 2016). Favourable conditions for disease development of the *in vitro* pathogenicity tests carried out in our study could also have enhanced the severity of the symptoms in comparison with real agricultural conditions, and thus be responsible for these wilting symptoms. Therefore, it is not possible to assimilate the isolates of this study to FOP. Thus it would be interesting to further test the host range of these *F. oxysporum* isolates by carrying out pathogenicity assays and to assess the putative presence of *SIX* genes to confirm or infirm the above mentioned hypothesis.

*F. solani* was the second most isolated fungi in this study and was found to often co-occur with *F. oxysporum*. Furthermore, isolates of *F. solani* were shown to be the most aggressive ones. The phylogenetic analysis based on *TEF1* sequences allowed to refine the taxonomic position of the *F. solani* isolates within the *Fusarium solani* species complex (FSSC), for which the phylogeny has been partially resolved using multilocus phylogenetic approaches (O'Donnell and Gray 1995; O'Donnell 2000; Zhang et al. 2006; O'Donnell et al. 2008). Indeed, the morphological species initially defined as *F. solani* (Nelson et al. 1983), is actually a complex of more than 60 phylogenetically distinct species (Coleman et al. 2016). Some of these phylogenetic species have been shown to correspond to specific *formae speciales* and/or to specific mating populations of *Nectria haematococca* (MPs I to VII) formerly defined in order to class plant pathogenic isolates (Matuo and Snyder 1973; O'Donnell and Gray 1995;



O'Donnell 2000; O'Donnell et al. 2008). The tree topology resulting from our analysis was consistent with that obtained by Šišić et al. 2018a with *TEF1* sequences and with that obtained by O'Donnell et al. (2008) using a MLST approach. All the isolates of this study were part of the *F. solani* species complex (FSSC) clade III, as defined by O'Donnell et al. (2008). This analysis revealed that the large majority (99%) of our isolates of *F. solani* were phylogenetically very close to *F. solani* f. sp. *pisi* (*Nectria heamatococca* MP VI) reference strains FRC S485, Fs7, NRRL22278 and NRRL22820 (Zhang et al. 2006; O'Donnell et al. 2008; Šišić et al. 2018a). These strains are part of a phylogenetically distinct species referred as FSSC 11, based on a multilocus haplotype numbering 11 (O'Donnell et al. 2008). FSSC 11 diverges from the closely related multilocus haplotypes FSSC 17 and FSSC 13, corresponding respectively to the *forma specialis mori* (strains NRRL 22230 and NRRL 22157) and the *forma specialis robiniae* (strain NRRL 22161) (O'Donnell 2000; O'Donnell et al. 2008; Šišić et al. 2018a). This three multilocus haplotypes (11, 13, and 17) are all nested within the strongly supported FSSC Clade III (O'Donnell and Gray 1995; O'Donnell 2000; O'Donnell et al. 2008). More recently, this phylogenetic species FSSC 11 has been proposed by Šišić *et al.* 2018a, as *Fusarium pisi* comb. nov. lineage. The belonging to this lineage with a high level of host specialisation for pea could explain the high level of aggressiveness of the majority of the *F. solani* isolates of this study. Indeed, 90% of the isolates of this species were categorised as moderately to highly aggressive. Genes and mechanisms behind the virulence of *F. solani* f. sp. *pisi* (FSSC 11- MP VI) on peas have been well studied (Coleman 2016). The virulence is particularly linked to a cluster of six Pea Pathogenicity (*PEP*) genes (*PDA1*, *PEP1-PEP5*) located on a supernumerary chromosome and expressed during the pea infectious process (Coleman 2016). However, the host spectra of *F. solani* f. sp. *pisi* is not restricted to pea. It has already been shown that this *formae specialis* has different hosts and is also pathogenic on chickpea (*Cicer arietinum*), sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), and non-legume hosts such as ginseng (*Panax ginseng*), and mulberry tree (*Morus alba*) (Matuo and Snyder 1972; Westerlund et al.1974; Vanetten 1978). Šišić *et al.* 2018a also isolated *F. solani* isolates belonging to this lineage from three different legumes (host subterranean clover, winter vetch and faba bean) in addition to pea, and confirmed its large host spectrum by inoculating and reisolating this fungus from more than 58 accessions of 10 legumes including 25 asymptomatic hosts. It thus would be interesting to further investigate the host spectrum of *F. solani* isolated in this study by performing

pathogenicity assays on various hosts. Results could give information on the plant species to avoid in the crop rotation in order to prevent the inoculum build-up.

*F. redolens* was less frequently isolated than *F. oxysporum* and *F. solani* but was nevertheless present in 27% of the sampled fields in 2017 and 33% of the sampled plants in 2018. Most of the isolates were highly pathogenic on green pea, with 70.8% of isolates classified as moderately to highly aggressive. This pathogen is thus an important concern for green pea in Northern France, especially because it is also pathogenic on wheat that is frequently included in crop rotation (Taheri et al. 2011). These results are however in contrast with several studies that found *F. redolens* causing mostly weak symptoms of root rot on tested plants, and only in rare cases wilt symptoms indistinguishable from those caused by *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Persson et al. 1997; Taheri et al. 2011; Chittem et al. 2015).

*Fusarium solani*, *F. oxysporum* and *F. redolens* were often reported to co-occur in pea root rot lesions (Persson et al. 1997; Chittem et al. 2015; Jenkins 2018). Similar species composition and frequencies were observed in the UK (Jenkins 2018). As previously discussed, *F. oxysporum* populations pathogenic on pea in Northern France and in the UK are genetically closely related. This similarity among the composition of the pea root rot complex and among *F. oxysporum* populations could be explained by the relatively low distance between the North of France and the UK, both area sharing a similar climate. However, in Canada and several other countries of central and Northern Europe, *F. avenaceum* was the most frequently isolated species (Persson et al. 1997; Feng et al. 2010; Chittem et al. 2015; Baćanović-Šišić et al. 2018; Chatterton et al. 2019). In our study, the prevalence of *F. avenaceum* in the prospected fields was only of 14% of the sampled fields in 2017 and 10% of the sampled plants in 2018. However, several isolates showed a high level of aggressiveness on pea. This pathogen should be monitored due to its large host spectrum across several crops (Gossen et al. 2016). For example in Canada, crop rotations with canola are suspected to have increasingly upgraded population levels of *F. avenaceum* until this pathogen became the main concern on pulse crops (Feng et al. 2010). A Disease Note reporting the presence and pathogenic activity of the four species of *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. solani*) in the parasitic complex responsible for root rot of peas was published in Plant Disease (Gibert et al 2021a).

*C. rhizophaga* was isolated with a lower but not negligible frequency in comparison with

*F. solani*, *F. oxysporum* and *F. redolens*. All the isolates of this species were found pathogenic and highly aggressive on pea, at a similar aggressiveness level as *F. redolens* isolates. *C. rhizophaga* was already reported to cause wilt on chickpea (Abang et al. 2009; Dugan et al. 2011) and on several other plants such as water chestnut (*Eleocharis dulcis*) and *Dendrocalamus giganteus* (Zizzerini et al. 2010; Yang et al. 2019). However, to our knowledge, this is the first report of *C. rhizophaga* as a pathogen on pea.

In addition to these major root rot pathogens of peas in terms of frequencies and aggressiveness, several others species have been detected. At least 60 distinct species (37 species identified in 2017, 38 species identified in 2018, including 15 species in common) were identified using molecular tools among the 646 fungi and oomycetes isolated over the two years. Thirty-seven species were identified in samples originating from the 22 fields prospected in 2017 and 38 were found in 2018. This level of diversity is in accordance with a similar study carried out in western Canada where 40 distinct species from 21 fields were identified in 2014-2015 (Taheri al. 2017). However, the majority of these species were isolated at a very low frequency. For example in 2017, 26 species were isolated from a maximum of two plants at the flowering/grain maturation stage among the 22 sampled plots. Moreover, no oomycete was isolated in 2017. This fact may be due to particularly hot and dry weather conditions during the cultivation period. *Fusarium* spp. are well adapted to hot and dry conditions while the development of oomycetes such as *Pythium* spp. and *A. euteiches* is favoured by humid conditions and cooler temperatures (Kerr 1964; Pieczarka and Abawi 1978; Tu 1994; Wu et al. 2018). The isolation protocol using Petri dishes and a non-selective medium may be also involved. It may lead to an underestimation of the majority of oomycetes of the pea root complex, particularly in the presence of fast growing fungi such as *Fusarium* spp. and when using plant surface disinfection (Chatterton et al. 2015; Taheri et al. 2017b; Chatterton et al. 2019). Indeed, following this unsuccessful isolation of oomycetes in 2017, a technical change in the isolation procedure was performed between the two years in order to improve the chances of isolating oomycetes. Several *Pythium* species were recovered from symptomatic plants collected at the elongation stage (T2) and the flowering/grain maturation stage (T3) in the two plots monitored in 2018. Curiously, they were not detected at plant emergence (T1), even though *Pythium* spp. are often associated with damping-off and root rots of pea seedlings (Hwang et al. 2000). These results still confirmed the co-occurrence of *Pythium* spp. and *Fusarium* spp. in pea root rot. Such co-occurrence were reported in different countries, and

*Pythium* ssp. were often isolated at low rates (Kerr 1963; Tu 1991; Oyarzun et al. 1993; Persson et al. 1997). This co-occurrence is significant considering the fact that *Pythium* species could induce synergistic effects on the severity of symptoms when they are co-inoculated with *F. oxysporum* or *F. solani* on pea and bean (Kerr 1963; Pieczarka and Abawi 1977). However, most of the isolates belonging to the species *P. terrestris*, *P. intermedium* and *P. amasculinum/hydno sporum* that were pathogenic on pea caused moderate symptoms in pathogenicity tests, in accordance with previous observations for other *Pythium* species (Kerr 1963; Persson et al. 1997). *Pythium terrestris* appeared to be widespread in Northern France. It was already isolated using baiting plants in association with *A. euteiches* from soils of different fields of the North of France, including the Woestyne field (Paul 2002; Gibert et al. 2021b). Therefore, the absence of *A. euteiches* isolates in the root-rotted peas sampled from this infested field was surprising. However, *A. euteiches* is a pathogen hardly isolatable from diseased peas, and molecular techniques such as PCR or qPCR are more adapted to detect its presence in pea roots than microbiological methods (Chatterton et al. 2019).

Beyond oomycetes, several isolates of fungal species rarely isolated were also shown to be pathogenic in *in vitro* pathogenicity tests. They were classified from weakly to highly aggressive. Some of these species, such as *F. tricinctum* and *F. culmorum*, have already been isolated from diseased pea root, or isolated and confirmed as pathogenic on pea (Persson et al. 1997; Taheri et al. 2017a). Several other species such as *A. sinuosa*, *A. sclerotigenum*, *A. xantha*, *B. galactina*, *H. annosum*, *M. elongata*, *M. circinelloides*, *F. poae*, *P. cinerea*, *P. laeta*, *P. cucumerina*, *P. intermedium*, and *Trichoderma velutinum*, isolated at a low frequency were found moderately to highly aggressive. To our knowledge, these species have never been reported as pathogenic on pea before.

*Fusarium poae*, *P. cucumerina* and *P. intermedium* are well known to cause root and collar rots of several plant species (Stanghellini et al. 1988; Metzger et al. 2007; Stenglein 2009; Carlucci et al. 2012). *Adustoporia sinuosa*, *A. xantha*, *P. cinerea*, *P. laeta* and *H. annosum* are known as wood-decomposing Basidiomycota. Some of them, such as *H. annosum*, can be responsible for root rot on various tree species (Asiegbu et al. 2005). In contrast, *M. elongata* and *Trichoderma velutinum* are common soil dwellers better known for their plant health benefits than for causing root rot in plant (Li et al. 2018; Mayo-Prieto et al. 2019). These results obtained in *in vitro* pathogenicity tests should be confirmed in conditions close to those encountered in fields. The very low isolation frequency of these species suggests that they are

in most cases opportunistic microorganisms colonising root rot lesions and benefiting from a trophic relationship with pea rather than being the primary cause of symptoms. Indeed, opportunistic agents are often defined as commensal or environmental microbes that cause disease in compromised hosts (Charkowski 2016).

In addition, as previously discussed for oomycetes, the real prevalence and abundance of these rarely isolated fungi could be underestimated due to their poor growth on a generalist medium compared to *Fusarium* spp. They also could play a role in the symptoms severity through additive or synergistic effects, or on the contrary, play a beneficial role through competition for the trophic resources with the major pathogens. Thus, it would be interesting to confirm their prevalence and diversity when associated to pea with root rot symptoms using molecular approaches such as metabarcoding analysis of the ITS loci. A comparative approach with communities associated with healthy peas would make it possible to know if they are related to the parasitic complex or if they are part of the healthy pea rhizobiome. For example, such approach was already used to reveal the diversity of oomycete communities of rhizospheric soils associated with healthy and diseased peas (Taheri al. 2017).

At last, our study showed that communities of cultivable fungi and oomycetes associated with pea root rot change over the cropping season. Firstly, the composition of the fungal flora appeared to be significantly different in diseased roots of young pea plants between the two fields studied. The initial soil inoculum of each field, as well as its recruitment by the pea seedlings of different varieties *via* the seed and root exudates as well as pedoclimatic factors could explain such differences (Nelson 2018). Among a large diversity of seed-borne endophytic and soil-borne epiphytic microorganisms which can proliferate during seed germination and seedling growth, fungal pathogens such as *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. can proliferate in the spermosphere under the effect of seed exudates (Nelson 2018). Flavonoids and carbohydrates exudated by seeds and roots induce the germination of macroconidia and chlamydozoospores of *F. solani* f. sp. *pisi* (Short and Lacy 1976; Ruan et al. 1995). Indeed, important pathogens such as *Fusarium* spp. have already penetrated the roots and caused symptoms at T1, especially in the Ormelets plot, although they were present in low abundance at this stage. The level of dissimilarity in the cultivable species composition of rotted roots between the two plots decreased along the cropping season, to converge at flowering/grain maturation stage toward a more similar species composition, mainly dominated by *F. solani*, *F. oxysporum* and *F. redolens*. Some pathogens, such as *C. rhizophaga*

and *Pythium* spp., were isolated from the root lesions at a more advanced phenological stage (T2), indicating that they colonised the plant later in the season. Lastly, the final composition observed at flowering/grain maturation stage in 2018, largely dominated by *Fusarium* spp., was similar to that observed in the 22 fields sampled at the same stage in 2017. More importantly, this study showed that those shifts in cultivable fungal and oomycete communities along the cropping season reflected the proportions of pathogenic and non-pathogenic isolates found in the diseased roots: the proportion of isolates categorised as non-pathogenic to weakly aggressive decreased progressively along the cropping season in favour of moderately to highly pathogenic isolates. Concurrently, the proportion of pathogens in the root lesions increased as the pea grows and as symptoms increased, making the ecological niche less suitable for non-pathogenic fungi.

Root rot in peas is very often attributed to *A. euteiches* and the fight against this disease is oriented towards the predictive diagnosis based on the inoculum density of this oomycete, as well as towards the search for genes of resistance to this pathogen. Our study shows that this disease is caused by a parasitic complex dominated by a few species of *Fusarium* but in which unexpectedly, appear fungal species such as *C. rhizophaga*, which will have to be reckoned with to implement a comprehensive approach to control the disease and encourage the cultivation of legumes, at least in France, and probably also in other regions affected by root rot of legumes.

## 5. References

- Abang, M., Kabbabeh, S., Ahmed, S., Murad, S., Chilvers, M., Peever, T., & Schroers, H. (2009). First report of chickpea wilt caused by *Clonostachys rhizophaga* in Syria. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0666A>
- Amaral-Zettler, L. A., McCliment, E. A., Ducklow, H. W., & Huse, S. M. (2009). A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA Genes. *Plos One*, *4*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006372>
- Asiegbu, F. O., Adomas, A., & Stenlid, J. (2005). Conifer root and butt rot caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. S.l. *Molecular Plant Pathology*, *6*(4), 395–409. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2005.00295.X>
- Baćanović-Šišić, J., Šišić, A., Schmidt, J. H., & Finckh, M. R. (2018). Identification and characterization of pathogens associated with root rot of winter peas grown under organic management in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, *151*(3), 745–755. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1409-0>
- Basu, P. K. (1975). Yield loss conversion factors for common root rot severity of processing peas. *Proceedings of the Canadian Phytopathological Society*, *42*, 19–20.
- Blume, M., & Harman, G. (1979). *Thielaviopsis basicola*—Component of the pea root-rot complex in New-York State. *Phytopathology*, *69*(8), 785–788. <https://doi.org/10.1094/Phyto-69-785>
- Bunyard, B. A., Nicholson, M. S., & Royse, D. J. (1996). Phylogeny of the genus *Agaricus* inferred from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Fungal Genetics and Biology*, *20*(4), 243–253. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1996.0039>
- Carlucci, A., Raimondo, M. L., Santos, J., & Phillips, A. J. L. (2012). *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia*, *28*, 34–48. <https://doi.org/10.3767/003158512X638251>
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, *91*(3), 553–556. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Chang, K. F., Hwang, S. F., Ahmed, H. U., Fu, H., Zhou, Q., Strelkov, S. E., & Turnbull, G. D. (2017). First report of *Phytophthora sansomeana* causing root rot in field pea in Alberta, Canada. *Crop Protection*, *101*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.008>
- Charkowski, A. O. (2016). Opportunistic pathogens of terrestrial plants. In C. J. Hurst (Ed.), *The Rasputin Effect: When Commensals and Symbionts Become Parasitic* (pp. 147–168). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-28170-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28170-4_7)
- Charrad, M., Ghazzali, N., Boiteau, V., & Niknafs, A. (2014). NbClust: An R package for determining the relevant number of clusters in a data set. *Journal of Statistical Software*, *61*(1), 1–36. <https://doi.org/10.18637/jss.v061.i06>
- 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), 288–289. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-14-0905-PDN>
- Chatterton, S., Harding, M. W., Bowness, R., McLaren, D. L., Banniza, S., & Gossen, B. D. (2019). Importance and causal agents of root rot on field pea and lentil on the Canadian prairies, 2014-2017. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *41*(1), 98–114. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1547792>
- Chittem, K., Mathew, F. M., Gregoire, M., Lamma, R. S., Chang, Y. W., Markell, S. G., Bradley, C. A., Barasubiye, T., & Goswami, R. S. (2015). Identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with root rots of field pea in North Dakota. *European Journal of Plant Pathology*, *143*(4), 641–649. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0714-8>
- Clarkson, J. D. S. (1978). Pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with foot-rots of peas and beans. *Plant Pathology*, *27*(3), 110–117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1978.tb01093.x>
- Coleman, J. J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology*, *17*(2), 146–158. <https://doi.org/10.1111/mpp.12289>
- Cooke, D. E., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., & Brasier, C. M. (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, *30*(1), 17–32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1202>
- Correll, J. C. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility Tests. *Phytopathology*, *77*(12), 1640. <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-1640>

- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, *9*(8), 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Davet, P., & Rouxel, F. (1997). Détection et isolement des champignons du sol. 203 p. Paris: INRA ed. ISBN 2-7380-0731-7
- Does, H. C. V. D., Lievens, B., Claes, L., Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. C., & Rep, M. (2008). The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environmental Microbiology*, *10*(6), 1475–1485. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01561.x>
- Dugan, F. M., Lupien, S. L., & Chen, W. (2011). *Clonostachys rhizophaga* can delay and reduce emergence of chickpea but does not consistently induce wilt in Washington State. *Phytopathology*, *101*(6), S46–S46.
- Dyer, P., & Ingram, D. (1990). An improved test for evaluating the pathogenicity of isolates of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* on pea. *Annals of Applied Biology*, *117*(2), 469–472. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1990.tb04234.x>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Mounier, A., & Steinberg, C. (2015). *Fusarium* diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach. *Journal of Microbiological Methods*, *111*, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.01.026>
- Feng, J., Hwang, R., Chang, K. F., Hwang, S. F., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., Conner, R. L., & Turnbull, G. D. (2010). Genetic variation in *Fusarium avenaceum* causing root rot on field pea. *Plant Pathology*, *59*(5), 845–852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02313.x>
- Foyer, C. H., Lam, H.-M., Nguyen, H. T., Siddique, K. H. M., Varshney, R. K., Colmer, T. D., Cowling, W., Bramley, H., Mori, T. A., Hodgson, J. M., Cooper, J. W., Miller, A. J., Kunert, K., Vorster, J., Cullis, C., Ozga, J. A., Wahlqvist, M. L., Liang, Y., Shou, H., ... Considine, M. J. (2016). Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature Plants*, *2*(8), 16112. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2016.112>
- Fuchs, J. G., Thuerig, B., Brandhuber, R., Bruns, C., Finckh, M. R., Fliessbach, A., Mader, P., Schmidt, H., Vogt-Kaute, W., Wilbois, K.-P., & Lucius, T. (2014). Evaluation of the causes of legume yield depression syndrome using an improved diagnostic tool. *Applied Soil Ecology*, *79*, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.02.013>
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, *2*(2), 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00413.x>
- Grajal-Martin, M., J., et Muehlbauer F., J., (2002). « Genomic location of the Fw gene for resistance to *Fusarium* wilt race 1 in peas. » *Journal of Heredity* *93*, no 4: 291-93. <https://doi.org/10.1093/jhered/93.4.291>.
- Gibert, S., Edel-Hermann, V., Gautheron, E., Gautheron, N., Sol, J. M., Capelle, G., Galland, R., Bardon-Debats, A., Lambert, C., & Steinberg, C. (2021a). First report of *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium redolens* and *Fusarium solani* causing root rot in pea in France. *Plant Disease*. Accepted for publication.
- Gibert, S., Edel-Hermann, V., Moussa Mcolo, R., Gautheron, E., Michel, J., Bernaud, E., Gautheron, N., Sol, J. M., Capelle, G., Galland, R., Bardon-Debats, A., Lambert, C., & Steinberg, C. (2021b). Risk assessment of *Aphanomyces euteiches* root rot disease: Quantification of low inoculum densities in field soils using droplet digital PCR. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02325-5>
- Gossen, B. D., Hwang, S. F., Conner, R. L., & Chang, K. F. (2011). Managing the *Ascochyta* blight complex on field pea in western Canada. *4*, 7.
- Gossen, B. D., Conner, R. L., Chang, K.-F., Pasche, J. S., McLaren, D. L., Henriquez, M. A., Chatterton, S., & Hwang, S.-F. (2016). Identifying and managing root rot of pulses on the Northern Great Plains. *Plant Disease*, *100*(10), 1965–1978. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0184-FE>
- Gouy, M., Tannier, E., Comte, N., & Parsons, D. P. (2021). Seaview version 5: A multiplatform software for multiple sequence alignment, molecular phylogenetic analyses, and tree reconciliation. In K. Katoh (Ed.), *Multiple Sequence Alignment: Methods and Protocols* (pp. 241–260). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7_15)



- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Harveson, R. M., Pasche, J. S., Porter, L., Chen, W., & Burrows, M. (Eds.). (2021). *Compendium of Pea Diseases and Pests, Third Edition*. The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890546567>
- Heyman, F., Blair, J. E., Persson, L., & Wikström, M. (2012). Root rot of pea and faba bean in southern Sweden caused by *Phytophthora pisi* sp. nov. *Plant Disease*, 97(4), 461–471. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-12-0823-RE>
- Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal. Biometrische Zeitschrift*, 50(3), 346–363. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- Husson, F., Josse, J., & Lê, S. (2008). FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, 25. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Hwang, S. F., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Chang, K. F., Howard, R. J., & Thomas, A. G. (2000). Effect of temperature, seeding date, fungicide seed treatment and inoculation with *Fusarium avenaceum* on seedling survival, root rot severity and yield of lentil. *Canadian Journal of Plant Science*, 80(4), 899–907.
- Infantino, A., Kharrat, M., Riccioni, L., Coyne, C. J., McPhee, K. E., & Grunwald, N. J. (2006). Screening techniques and sources of resistance to root diseases in cool season food legumes. *Euphytica*, 147(1/2), 201–221. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-6963-z>
- Jenkins, S. (2018). Examining identity, phylogeny and Pathogenicity factors in *Fusarium* species affecting pea [Phd, University of Warwick]. <http://webcat.warwick.ac.uk/record=b3420697~S15>
- Jenkins, S., Taylor, A., Jackson, A. C., Armitage, A. D., Bates, H. J., Mead, A., Harrison, R. J., & Clarkson, J. P. (2021). Identification and expression of secreted in xylem pathogenicity genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 593140. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.593140>
- Kassambara, A. (2020). *ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots* (0.4.0) [Computer software]. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
- Kassambara, A., & Mundt, F. (2020). *factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses* (1.0.7) [Computer software]. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>
- Kassambara, A. (2021). *Rstatix* [R]. <https://github.com/kassambara/rstatix> (Original work published 2018)
- Kerr, A. (1963). The root rot *Fusarium* wilt complex of peas. *Australian Journal of Biological Sciences*, 16(1), 55–69.
- Kerr, A. (1964). The influence of soil moisture on infection of peas by *Pythium ultimum*. *Australian Journal of Biological Sciences*, 17(3), 676–685.
- Kraft, J. M., & Pflieger, F. L. (2001). *Compendium of pea diseases and pests*. (J. M. Kraft & F. L. Pflieger, Eds.). American Phytopathological Society (APS Press).
- Lamichhane, J. R., & Venturi, V. (2015). Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: A growing trend. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00385>
- Le May, C., Onfroy, C., Moussart, A., Andrivon, D., Baranger, A., Pilet-Nayel, M. L., & Vandemark, G. (2018). Genetic structure of *Aphanomyces euteiches* populations sampled from United States and France pea nurseries. *European Journal of Plant Pathology*, 150(2), 275–286. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1274-x>
- Li, F., Chen, L., Redmile-Gordon, M., Zhang, J., Zhang, C., Ning, Q., & Li, W. (2018). *Mortierella elongata*'s roles in organic agriculture and crop growth promotion in a mineral soil. *Land Degradation & Development*, 29(6), 1642–1651. <https://doi.org/10.1002/ldr.2965>
- McKinnon Edwards, S. (2020). lemon: Freshing Up your 'ggplot2' Plots. R package version 0.4.5. <https://CRAN.R-project.org/package=lemon>
- Magrini, M.-B., Anton, M., Cholez, C., Corre-Hellou, G., Duc, G., Jeuffroy, M.-H., Meynard, J.-M., Pelzer, E., Voisin, A.-S., & Walrand, S. (2016). Why are grain-legumes rarely present in cropping systems despite their environmental and nutritional benefits? Analyzing lock-in in the French agrifood system. *Ecological Economics*, 126, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2016.03.024>
- Matuo, T., & Snyder, W. (1972). Host virulence and *Hypomyces* stage of *Fusarium solani* f. sp. *pisii*. *Phytopathology*, 62(7), 731–735. <https://doi.org/10.1094/Phyto-62-731>

- Matuo, T., & Snyder, W. (1973). Use of morphology and mating populations in identification of *Formae speciales* in *Fusarium solani*. *Phytopathology*, 63(5), 562–565. <https://doi.org/10.1094/Phyto-63-562>
- Mayo-Prieto, S., Marra, R., Vinale, F., Rodriguez-Gonzalez, A., Woo, S. L., Lorito, M., Gutierrez, S., & Casquero, P. A. (2019). Effect of *Trichoderma velutinum* and *Rhizoctonia solani* on the metabolome of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 549. <https://doi.org/10.3390/ijms20030549>
- Melzer, M. S., Yu, H., Labun, T., Dickson, A., & Boland, G. J. (2016). Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. from field crops in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38(3), 367–374. <https://doi.org/10.1080/07060661.2016.1199596>
- Metzger, R., Belbahri, L., Calmin, G., Badin, N., & Lefort, F. (2007). First report of *Pythium intermedium* causing root rot on *Rosa canina* rootstock in France. *Plant Disease*, 91(8), 1055–1055. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-8-1055B>
- Moussart, A., Even, M. N., Lesné, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02679.x>
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press.
- Nelson, E. B. (2018). The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil*, 422(1–2), 7–34. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3289-7>
- O'Donnell, K., & Gray, L. E. (1995). Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(5), 709–716. <https://doi.org/10.1094/mpmi-8-0709>
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2044–2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
- O'Donnell, K. (2000). Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca* *Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 92(5), 919–938. <https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061237>
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Aberra, D., Kistler, H. C., Aoki, T., Orwig, N., Kimura, M., Bjørnstad, S., & Klemsdal, S. S. (2008). Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 45(11), 1514–1522. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.09.002>
- O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A., Riley, R., Zitomer, N. C., Colyer, P., Waalwijk, C., Lee, T. van der, Moretti, A., Kang, S., Kim, H.-S., Geiser, D. M., Juba, J. H., Baayen, R. P., Cromey, M. G., Bithell, S., ... Sarver, B. A. J. (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 46(12), 936–948. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.08.006>
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V., A., R., G., Crous, P., W., Geiser, D., M., and Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43(5), 583–95. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., & Wagner, H. (2020). *vegan: Community Ecology Package* (2.5-7) [Computer software]. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Oyarzun, P., & Loon, J. van. (1989). *Aphanomyces euteiches* as a component of the complex of foot and root pathogens of peas in Dutch soils. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95(5), 259–264. <https://doi.org/10.1007/BF01977730>
- Oyarzun, P., Gerlagh, M., & Hoogland, A. E. (1993). Pathogenic fungi involved in root rot of peas in the Netherlands and their physiological specialization. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99(1), 23–33. <https://doi.org/10.1007/BF01974782>
- Parker, M., Melzer, M., Boland, G., & Broders, K. (2013). Diversity of *Rhizoctonia solani* associated with canola, wheat, and pea in Alberta, Manitoba, and Saskatchewan. *Phytopathology*, 103(6), 111–111.
- Paul, B. (2002). *Pythium terrestris*, a new species isolated from France, its ITS region, taxonomy and its comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters*, 212(2), 255–260. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00756-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00756-5)

- Persson, L., Bodker, L., & Larsson-Wikstrom, M. (1997). Prevalence and pathogenicity of foot and root rot pathogens of pea in southern Scandinavia. *Plant Disease*, 81(2), 171–174. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.171>
- Peters, R. D., & Grau, C. R. (2002). Inoculation with non-pathogenic *Fusarium solani* increases severity of pea root rot caused by *Aphanomyces euteiches*. *Plant Disease*, 86(4), 411–414. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.4.411>
- Pieczarka, D. J., & Abawi, G. S. (1977). Synergistic interaction between *Pythium ultimum* and *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* and antagonistic interaction between *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* on snap beans. *Proceedings of the American Phytopathological Society*.
- Pieczarka, D. J., & Abawi, G. S. (1978). Influence of soil water potential and temperature on severity of *Pythium* root rot of snap beans. *Phytopathology*, 68(5), 766–772.
- Quillévéré, A., Le Roy, G., Moussart, A., Pilet-Nayel, M.-L., & Le May, C. (2016). Genetic and phenotypic diversity of pea isolates of *Aphanomyces euteiches* in France. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28355.40487>
- Quillévéré-Hamard, A., Le Roy, G., Moussart, A., Baranger, A., Andrivon, D., Pilet-Nayel, M.-L., & Le May, C. (2018). Genetic and pathogenicity diversity of *Aphanomyces euteiches* populations from pea-growing regions in France. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1673. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01673>
- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), 84–98. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832842>
- Reyes, A. A. (1980). Pea root rot development and associated pathogens in Ontario fields. *Plant Disease*, 64(4), 392–393.
- Robideau, G. P., de Cock, A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., Désaulniers, N., Eggertson, Q. A., Gachon, C. M. M., Hu, C.-H., Küpper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. C. P., Zhang, Y., Bonants, P. J. M., Ristaino, J. B., & Lévesque, C. A. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1002–1011. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- Rocha, L. O., Laurence, M. H., Ludowici, V. A., Puno, V. I., Lim, C. C., Tesoriero, L. A., Summerell, B. A., & Liew, E. C. Y. (2016). Putative effector genes detected in *Fusarium oxysporum* from natural ecosystems of Australia. *Plant Pathology*, 65(6), 914–929. <https://doi.org/10.1111/ppa.12472>
- Ruan, Y. J., Kotraiah, V., & Straney, D. C. (1995). Flavonoids stimulate spore germination in *Fusarium solani* pathogenic on legumes in a manner sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(6), 929–938. <https://doi.org/10.1094/MPMI-8-0929>
- Rubiales, D., Fondevilla, S., Chen, W., Gentzbittel, L., Higgins, T. J. V., Castillejo, M. A., Singh, K. B., & Rispaill, N. (2015). Achievements and challenges in legume breeding for pest and disease resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1–3), 195–236. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.898445>
- Schmitthenner, A. F., & Hilty, J. W. (1962). Method for studying postemergence seedling root rot. In *Phytopathology* (Vol. 52). Amer phytopathological soc 3340 pilot knob road, St paul, MN 55121.
- Short, G., & Lacy, M. (1976). Carbohydrate exudation from pea seeds—Effect of cultivar, seed age, seed color, and temperature. *Phytopathology*, 66(2), 182–187. <https://doi.org/10.1094/Phyto-66-182>
- Šišić, A., Baćanović-Šišić, J., Al-Hatmi, A. M. S., Karlovsky, P., Ahmed, S. A., Maier, W., de Hoog, G. S., & Finckh, M. R. (2018a). The 'forma specialis' issue in *Fusarium*: A case study in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Scientific Reports*, 8, 1252. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19779-z>
- Šišić, A., Baćanović-Šišić, J., Karlovsky, P., Wittwer, R., Walder, F., Campiglia, E., Radicetti, E., Friberg, H., Baresel, J. P., & Finckh, M. R. (2018b). Roots of symptom-free leguminous cover crop and living mulch species harbor diverse *Fusarium* communities that show highly variable aggressiveness on pea (*Pisum sativum*). *Plos One*, 13(2), e0191969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191969>
- Šišić, A., Baćanović-Šišić, J., Schmidt, H., & Finckh, M. R. (2018c). First report of *Didymella lethalis* associated with roots of pea, subterranean clover, and winter vetch in Germany, Switzerland, and Italy. *Plant Disease*, 102(12), 2642–2643. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0837-PDN>
- Šišić, A., Baćanović-Šišić, J., Schmidt, H., & Finckh, M. R. (2020). Root pathogens occurring on pea (*Pisum sativum*) and faba bean (*Vicia faba*) in Germany. In M. Brka, E. Omanović-Miklićanin, L. Karić, V. Falan, & A. Toroman (Eds.), *30th Scientific-Experts Conference of Agriculture and Food Industry* (pp. 69–75). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-40049-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-40049-1_8)

- Skovgaard, K., Bodker, L., & Rosendahl, S. (2002). Population structure and pathogenicity of members of the *Fusarium oxysporum* complex isolated from soil and root necrosis of pea (*Pisum sativum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 42(3), 367–374. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00337-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00337-9)
- Soylu, S., & Dervis, S. (2011). Determination of prevalence and incidence of fungal disease agents of pea (*Pisum sativum* L.) plants growing in Amik plain of Turkey. *Research on Crops*, 12(2), 588–592.
- Stanghellini, M., White, J., Tomlinson, J., & Clay, C. (1988). Root-rot of hydroponically grown cucumbers caused by zoospore-producing isolates of *Pythium intermedium*. *Plant Disease*, 72(4), 358–359. <https://doi.org/10.1094/PD-72-0358>
- Stenglein, S. (2009). *Fusarium poae*: A pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology*, 91, 25–36. <https://doi.org/10.4454/jpp.v91i1.621>
- Taheri, A. E., Chatterton, S., Foroud, N. A., Gossen, B. D., & McLaren, D. L. (2017a). Identification and community dynamics of fungi associated with root, crown, and foot rot of field pea in western Canada. *European Journal of Plant Pathology*, 147(3), 489–500.
- Taheri, A. E., Chatterton, S., Gossen, B. D., & McLaren, D. L. (2017b). Metagenomic analysis of oomycete communities from the rhizosphere of field pea on the Canadian prairies. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(9), 758–768. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0099>
- Taheri, A. E., Hamel, C., Gan, Y., & Vujanovic, V. (2011). First report of *Fusarium redolens* from Saskatchewan and its comparative pathogenicity. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33(4), 559–564. <https://doi.org/10.1080/07060661.2011.620631>
- Tedersoo, L., & Lindahl, B. (2016). Fungal identification biases in microbiome projects. *Environmental Microbiology Reports*, 8(5), 774–779. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12438>
- Tu, J. C. (1991). Etiology, biology and control of a soilborne root rot complex of green peas. *Plant Protection Bulletin (Taipei)*, 33(1), 17–35.
- Tu, J. C. (1994). Effects of soil compaction, temperature, and moisture on the development of the *Fusarium* root rot complex of pea in southwestern Ontario. *Phytoprotection*, 75(3), 125–131.
- Vanetten, H. (1978). Identification of additional habitats of *Nectria haematococca* mating population .6. *Phytopathology*, 68(11), 1552–1556. <https://doi.org/10.1094/Phyto-68-1552>
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4238–4246. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>
- Westerlund, F. V., Campbell, R. N., & Kimble, K. A. (1974). Fungal root rots and wilt of chickpea in California. *Phytopathology*, 64(4), 432–436.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wicker, E., Hullé, M., & Rouxel, F. (2001). Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology*, 50(4), 433–442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00590.x>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (2nd ed.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Wickham, H. & Bryan, J. (2019). readxl: Read Excel Files. R package version 1.3.1. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L. D., François, R., Golemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T. L., Miller, E., Bache, S. M., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D. P., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wilke, C., O., (2020). cowplot: Streamlined plot theme and plot annotations for 'ggplot2'. R package version 1.1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=cowplot>
- Wille, L., Messmer, M. M., Studer, B., & Hohmann, P. (2019). Insights to plant-microbe interactions provide opportunities to improve resistance breeding against root diseases in grain legumes. *Plant Cell and Environment*, 42(1), 20–40. <https://doi.org/10.1111/pce.13214>
- Willsey, T., Chatterton, S., & Carcamo, H. (2019). Interactions between the root rot pathogen *Fusarium avenaceum* and the pea leaf weevil (*Sitona lineatus*) in field pea. *Crop Protection*, 116, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.08.027>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.07.006>
- Yang, X., Zhang, A.-F., Gu, C.-Y., Zang, H.-Y., & Chen, Y. (2019). First report of *Clonostachys rhizophaga* as a pathogen of water chestnut (*Eleocharis dulcis*) in Anhui Province of China. *Plant Disease*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201900198709>
- Zazzerini, A., Quaglia, M., & Marani, O. (2010). First report of *Clonostachys rhizophaga* as a pathogen of *Dendrocalamus giganteus* in Mozambique. *Plant Disease - PLANT DIS*, 94, 372–372. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0372C>
- Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D. A., Nalim, F. A., Summerbell, R. C., Padhye, A. A., & Geiser, D. M. (2006). Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 2186–2190. <https://doi.org/10.1128/JCM.00120-06>
- Zitnick-Anderson, K., & Pasche, J. S. (2016). First report of *Aphanomyces* root rot caused by *Aphanomyces euteiches* on field pea in North Dakota. *Plant Disease*, 100(2), 522–523. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0649-PDN>
- Zitnick-Anderson, K., del Rio Mendoza, L. E., Forster, S., & Pasche, J. S. (2020). Associations among the communities of soil-borne pathogens, soil edaphic properties and disease incidence in the field pea root rot complex. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04745-4>

## First report of *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium redolens* and *Fusarium solani* causing root rot in pea in France

(Article accepté pour publication dans la revue *Plant disease*)

S. Gibert<sup>1,2</sup>, V. Edel-Hermann<sup>1,†</sup>, E. Gautheron<sup>1</sup>, N. Gautheron<sup>1</sup>, J. M. Sol<sup>2</sup>, G. Capelle<sup>2</sup>, R. Galland<sup>2</sup>, A. Bardou-Debats<sup>2</sup>, C. Lambert<sup>2</sup>, and C. Steinberg<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Agroécologie, AgroSup Dijon, INRAE, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

<sup>2</sup>Société BONDUELLE SAS, Rue Nicolas Appert - BP 17, 59653 Villeneuve d'Ascq – CEDEX, France

<sup>†</sup>Corresponding Author : V. Edel-Hermann; email : veronique.edel-hermann@inrae.fr

**Keywords:** Pea, France, root rot, *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. solani*

**Funding:** Simon Gibert was financially supported by a PhD funding from Bonduelle SAS (59653 Villeneuve d'Ascq, France) and the National Association of Technical Research (ANRT) (CIFRE n°2017/0852).

Pea (*Pisum sativum* L.) is a commonly cultivated legume in France. It can be affected by root rot diseases caused by a pathogenic complex of soilborne fungi (Harveson et al. 2021). Symptomatic peas with black rot lesions on their root system, sometimes associated with stunting, yellowing or wilting of the aerial parts, were collected in 2017 and 2018 in the Hauts-de-France, a pea-producing region in France. Fungal colonies were obtained from diseased roots, purified by single-spore culturing, and cultivated on potato dextrose agar and carnation leaf agar to characterize them morphologically. Sixteen isolates, with morphological characteristics similar to those of *Fusarium* (Nelson et al. 1983), were identified using the translation elongation factor 1- $\alpha$  gene (*TEF1*) (O'Donnell et al. 2015). *TEF1* was amplified with primers EF1/EF2 (O'Donnell et al. 1998) or primers Fa/Ra (Edel-Hermann et al. 2015) and sequenced. Their GenBank acc. nos. are MW694287 through MW694302. A BLAST search showed that the sequences of strains MIAE07688, MIAE07689, MIAE07690, and MIAE07691 had 100% similarity with sequences of *F. avenaceum*, and 98.6 to 100% similarity with the sequence KU587615 of *F. avenaceum* collected from symptomatic pea in Canada. The sequences of strains MIAE07692, MIAE07693, MIAE07694, and MIAE07695 had 100% similarity with sequences of *F. oxysporum* collected from symptomatic peas in UK (acc. nos. MT630325, MT630331, MT630325, and MT630322, respectively). The sequences of strains MIAE07696, MIAE07697, MIAE07698, and MIAE07699 showed 100% similarity with sequences of *F. redolens*, and 99.3 to 99.5% similarity with the sequence KU587620 of

*F. redolens* collected from symptomatic pea in Canada. The sequences of strains MIAE07700, MIAE07701, MIAE07702, and MIAE07703 showed 99 to 100% similarity with sequences of *F. solani*, and 99.7 to 100% similarity with the sequence KY556458 of *F. pisi* comb. nov. lineage (formerly *F. solani* f. sp. *pisi*) (Šišić et al. 2018). To assess pathogenicity, surface-sterilized pea seeds (cv. Firenze) were placed on malt agar and after 48 h, germinated seeds were transferred into sterile glass tubes containing 20 ml of Hoagland's No. 2 basal salt mixture at 1.6 g/liter added with 8 g/liter of agar. They were inoculated 5 days post germination with 1 ml of a conidial suspension at  $10^5$  conidia/ml or sterile deionized water for the control plantlets. Eight tubes per strain and eight control tubes were prepared. The tubes were incubated in a growth chamber at 25°C day / 23°C night and 16 h light / 8 h dark for 30 days. The control plantlets were asymptomatic. The four *F. avenaceum* strains caused brown rot symptoms on the roots and wilting of aerial parts, leading to 62 to 100% of dead plantlets. The four *F. oxysporum* strains caused discolored to brown symptoms on the roots and wilting of the aerial parts, causing 100% death. The four *F. redolens* strains caused honey-colored to brown symptoms on the roots and wilting of the aerial parts, leading to 75 to 100% of dead plantlets. Finally, the four *F. solani* strains caused brown to black rot symptoms on the entire root systems up to the base of the stem, causing 100% death. Strains reisolated from infected plants had the same morphological characteristics as the inoculated strains. To our knowledge, this is the first report of *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. redolens* and *F. solani* pathogenic in pea in France. A large sampling and isolation campaign is currently being performed to determine the contribution of each pathogen.

### **References:**

- Edel-Hermann, V., et al. 2015. J. Microbiol. Methods 111:64. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.01.026>
- Harveson, R. M., et al. 2021. Compendium of Pea Diseases and Pests, 3rd Edition. APS Press, St. Paul, MN, USA. <https://doi.org/10.1094/9780890546567.fm>
- Nelson, P. E., et al. 1983. *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. University Park, PA, USA. ISBN: 978-0-271-00349-8
- O'Donnell, K., et al. 1998. PNAS 95:2044. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
- O'Donnell, K., et al. 2015. Phytoparasitica 43:583. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>
- Šišić, A., et al. 2018. Sci. Rep. 8:1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19779-z>

## CHAPITRE IV

Pourritures racinaires du pois dans le nord de la France : analyse comparative de la diversité des communautés fongiques et oomycètes associées aux plantes symptomatiques et asymptomatiques





## 1. Introduction

Dans la plupart des pays producteurs, un des obstacles majeurs à la culture de légumineuses et plus spécifiquement à la culture du pois, qu'il soit fourrager, protéagineux ou potager est le risque qu'un inoculum pathogène présent dans le sol provoque des pourritures racinaires entraînant jusqu'à 80% de pertes de rendement. En effet, cette maladie est causée par un complexe parasitaire composé de nombreuses espèces de champignons et d'oomycètes d'origine tellurique (Gossen et al. 2016 ; Harveson et al. 2021). En France, l'oomycète *Aphanomyces euteiches* était jusqu'à présent considéré comme la cause principale de la maladie et le rôle d'autres microorganismes associés aux symptômes de pourritures racinaires a été sous-estimé, voire ignoré. Les autres agents du complexe parasitaire n'ont jamais été identifiés de façon exhaustive et la composition de ce complexe reste encore inconnue. Des isolements microbiologiques sur milieux de culture à partir de plantes symptomatiques, conjugués à des tests de pathogénicité sur pois, ont révélé une grande diversité de champignons et d'oomycètes responsables de la maladie dans les champs de pois potager du nord de la France (chapitre III). Les agents pathogènes les plus fréquents et les plus préoccupants sont *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, et dans une moindre mesure *F. avenaceum* et *Clonostachys rhizophaga*. De nombreuses autres espèces, notamment plusieurs basidiomycètes, ont été identifiées mais isolées avec une faible prévalence. L'abondance réelle de ces champignons dans les racines symptomatiques pourrait cependant être sous-estimée en raison de leur croissance lente sur milieu généraliste comparativement aux *Fusarium* spp. De même, malgré l'utilisation de milieux de culture spécifiques, peu d'oomycètes ont été retrouvés et tous appartenaient au genre *Pythium*. *Aphanomyces euteiches*, dont l'inoculum était pourtant avéré dans le sol d'une des parcelles à partir desquelles les pois symptomatiques ont été échantillonnés, n'a pas été isolé (Gibert et al. 2021). Il s'agit toutefois d'un microorganisme difficilement isolable à partir de plantes récoltées au champ, et son absence dans les symptômes observés reste questionnable. Au Canada, par exemple, sa présence était ignorée jusqu'à sa mise en évidence récente, par des techniques moléculaires comme la PCR ou la PCR quantitative, dans des symptômes initialement attribués aux *Fusarium* sur la base de méthodes classiques d'isolement sur milieu de culture (Chatterton et al. 2015, 2019). L'utilisation de techniques moléculaires apparaît

donc bien adaptée à la détection de ces organismes appartenant au complexe parasitaire mais difficiles à isoler.

Les méthodes de métagénomique ciblées pourraient permettre d'identifier de manière plus exhaustive la composition du complexe parasitaire et plus largement celle des communautés de champignons et d'oomycètes qui lui sont associées. Le metabarcoding est une approche déjà largement utilisée pour explorer la microflore bactérienne ou fongique non cultivable d'environnements divers, et son utilisation pour détecter les agents phytopathogènes est en plein développement (Tedersoo et al. 2019). Cette approche consiste à amplifier par PCR de manière spécifique, à partir d'ADN extrait d'un échantillon environnemental, un fragment d'ADN marqueur de la communauté recherchée et à procéder à son séquençage à haut débit. Des taxons sont alors assignés à chaque type de séquence obtenu par comparaison avec des bases de données de séquences de références (Nilsson et al. 2019). Le metabarcoding permet ainsi de connaître la composition et l'abondance relative des taxons présents dans l'échantillon originel. Pour l'identification des champignons et des oomycètes, la région internal transcribed spacer (ITS) de l'ADN ribosomique est généralement utilisée comme séquence marqueur. Les séquences ITS sont en effet reconnues comme le barcode universel pour l'identification des champignons et des oomycètes (Schoch et al. 2012 ; Kõljalg et al. 2013 ; Sapkota & Nicolaisen 2015 ; Riit et al. 2016). Des bases de données de séquences assez complètes comme UNITE, nécessaires à l'assignation taxonomique, sont notamment disponibles (Nilsson et al. 2018).

A l'aide de méthodes d'extraction d'ADN adaptées, le metabarcoding permet d'avoir aisément accès à la diversité des communautés microbiennes du compartiment racinaire de la plante hôte mais également de sa rhizosphère (Abdelfattah et al. 2018). Il semble ainsi particulièrement bien adapté à l'analyse des communautés associées au complexe parasitaire du pois, de façon complémentaire aux stratégies d'isolement sur milieux de culture utilisées dans le chapitre III. L'identification des organismes associés au complexe parasitaire n'est cependant possible que via une approche comparative de la composition des rhizobiomes de plantes symptomatiques et de plantes asymptomatiques provenant de la même parcelle. Une telle approche comparative permet également de caractériser des communautés microbiennes préférentiellement associées aux pois asymptomatiques et d'identifier des taxons susceptibles d'héberger des candidats utilisables en lutte biologique. De même, la mise

en relation de la diversité des rhizobiomes associés aux plantes symptomatiques ou aux plantes asymptomatiques avec certains facteurs tels que les paramètres édaphiques, les variétés cultivées ou les pratiques culturales, pourrait permettre d'identifier ceux ayant un impact favorable ou défavorable au développement de la maladie.

De façon complémentaire à l'approche microbienne classique décrite dans le chapitre III, nos objectifs dans ce chapitre sont d'effectuer une analyse comparative moléculaire de la diversité des communautés de champignons et d'oomycètes présentes dans le sol rhizosphérique et dans les tissus racinaires de plantes symptomatiques et asymptomatiques collectées au stade de la floraison/maturation des graines en 2017 (15 parcelles) et à trois stades phénologiques en 2018 (suivi de deux parcelles). Plus concrètement, les objectifs de cette analyse sont i) de déterminer la composition des communautés de champignons et d'oomycètes associées aux pourritures racinaires, ii) de caractériser l'évolution de cette composition au cours de la culture du pois, iii) de déterminer les conditions favorables ou défavorables à l'évolution de la composition du complexe parasitaire et iv) d'identifier d'éventuels taxons candidats en lutte biologique.

Pour cela, un travail d'analyse moléculaire par metabarcoding reposant sur le séquençage à haut débit de la région ITS a été mis en oeuvre. Cette approche est classiquement basée sur la technologie de séquençage Illumina (MiSeq ou HiSeq). Cependant cette technologie ne permet pas de séquencer des fragments de taille supérieure à 550 pb en « paired-end » (2 x 300 pb). Cette limite de taille conduit à séquencer de façon distincte la région ITS1 ou la région ITS2 pour le metabarcoding des eucaryotes (Siegel-Hertz et al. 2018 ; Nilsson et al. 2019), aboutissant à une identification taxonomique fréquemment limitée au niveau du genre. Nous avons donc choisi d'utiliser une technique de séquençage plus récente basée sur la technologie SMRT (Single Molecule Real-Time) sur système Sequel II, proposée par Pacific Biosciences (PacBio). Cette technique permet le séquençage de longs fragments d'ADN (plus de 10 Kb), offrant ainsi la possibilité de séquencer la région ITS entière et d'améliorer considérablement l'identification taxonomique des séquences jusqu'à l'espèce (Tedersoo et al. 2018). Malheureusement, des problèmes techniques rencontrés lors de cette étape de séquençage par la plateforme prestataire ont retardé l'obtention des résultats et n'ont pas permis de les intégrer dans ce manuscrit. Des adaptations techniques, toujours en cours, sont nécessaires pour réaliser le séquençage et finaliser les analyses.

Ces travaux engagés ont néanmoins nécessité un investissement important comprenant les collectes d'échantillons sur le terrain, leur traitement, l'extraction des ADN, la mise au point des conditions de PCR et la production des produits d'amplification destinés au séquençage à haut débit.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Campagnes d'échantillonnage

Les campagnes d'échantillonnage sont les mêmes que celles présentés dans le chapitre III. Elles ont été menées en 2017 et 2018 dans le bassin de production de pois de la région Hauts-de-France (France). Pour chaque champ échantillonné, les coordonnées GPS, l'historique des cultures, la variété de pois cultivée et les dates de semis ont été collectés auprès des agriculteurs (Table 12 du chapitre III). En 2017, 22 parcelles de pois potagers réparties dans tout le bassin de production du pois ont été sélectionnés sur la base de la présence avérée de pourritures des racines (Figure 16 et Table 12 du chapitre III). L'échantillonnage et le traitement des échantillons relèvent de la procédure décrite dans la partie matériels et méthodes du chapitre III. Cependant, cinq plantes aux parties aériennes saines et bien développées, et sans symptômes apparents à la base de la tige, considérées comme asymptomatiques, ont été récoltées en plus des plantes symptomatiques dans chaque parcelle. Les sols rhizosphériques de chaque plante ont également été récupérés. Au laboratoire, le sol rhizosphérique a été soigneusement retiré du système racinaire. Pour sept des 22 parcelles échantillonnées en 2017, les racines de pois dont les parties aériennes semblaient saines présentaient en réalité des symptômes de pourriture racinaire importants. Ces sept parcelles (F2, F3, F6, F11, F13, F14, F16) ont donc été exclues de l'analyse comparative par metabarcoding. Pour chaque échantillon collecté en 2018, le sol rhizosphérique a été placé dans un pilulier, congelé et lyophilisé.

Les échantillons de sol collectés en parcelles destinés à l'analyse des paramètres physico-chimiques ont été traités selon la méthodologie décrite dans le chapitre III.

## 2.2 Préparation de communautés microbiennes artificielles

Des souches de champignons et d'oomycètes issues de la Collection de micro-organismes d'intérêt agro-environnemental (MIAE, INRAE Dijon, France) ont été sélectionnées afin de réaliser deux communautés artificielles (« mocks ») destinées à servir de témoins pour le séquençage ciblant respectivement les champignons et les oomycètes (Tableau 18). Les souches ont été cultivées à 25 °C sur milieu potato dextrose agar (PDA, 39 g.L<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich) pendant 15 jours. Le mycélium développé en surface de chaque boîte de Petri a été gratté et utilisé pour les extractions d'ADN. Chacune des deux communautés a été construite en effectuant un mélange équimolaire à 10 ng.µL<sup>-1</sup> des ADN de chaque souche sélectionnée.

**Tableau 18** : Composition des communautés artificielles de champignons et d'oomycètes utilisées comme témoins dans le séquençage à haut débit

Mock	Espèces	Souches
Mock 1 : Champignons	<i>Fusarium oxysporum</i>	MIAE 47
	<i>Fusarium solani</i>	O21c
	<i>Mortierella elongata</i>	MIAE 1779
	<i>Mucor circinelloides</i>	MIAE 1805
	<i>Phialocephala xalapensis</i>	MIAE 968
	<i>Penicillium brevicompactum</i>	MIAE 151
	<i>Pharenochaete</i> sp.	D90b
	<i>Rhizoctonia solani</i>	MIAE 1730
	<i>Stereum</i> sp.	186h
	<i>Trichoderma hamatum</i>	MIAE 454
Mock 2 : Oomycètes	<i>Aphanomyces euteiches</i>	MIAE1625 (RB84)
	<i>Globisporangium heterothallicum</i>	OOMY1
	<i>Globisporangium ultimum</i>	OOMY5
	<i>Phytophthora parasitica</i>	MIAE 12
	<i>Phytophthora tropicalis</i>	MIAE 1718

## 2.3 Extractions d'ADN

### 2.3.1 Extractions d'ADN de sol

Chaque échantillon de sol rhizosphérique a été broyé mécaniquement à l'aide d'un blender en effectuant 4 passages de 5 s à vitesse maximale, séparés par des pauses de 10 s. Les ADN ont été extraits à partir de 2 g de sol rhizosphérique lyophilisé selon le protocole présenté dans le chapitre I (Plassart et al. 2012), avec trois répétitions pour chaque échantillon. Une matrice de lyse contenant 4 g de billes de silice de 0,1 mm de diamètre

(matrice de lyse B en vrac, MP-Biomedicals, New York, USA), 5 g de billes de céramique de 1,4 mm de diamètre (matrice de lyse D en vrac, MP-Biomedicals), huit billes de verre de 4 mm de diamètre et 8 mL d'un tampon de lyse contenant 100 mM de Tris-HCl (pH 8), 100 mM d'EDTA (pH 8), 100 mM de NaCl, 2 % de SDS et de l'eau ultra-pure ont été ajoutés à chaque échantillon de sol. L'ADN total a été extrait par lyse mécanique à l'aide de l'instrument FastPrep-24™ Classic (MP-Biomedicals). L'ADN a été purifié avec un kit NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) conformément aux recommandations du fabricant. Les échantillons d'ADN ont été élués dans 60 µL de tampon d'éluion SE du kit NucleoSpin® Soil et conservés à -20 °C jusqu'aux analyses. Les ADN ont fait l'objet d'une dilution préalable à 0.5 ng.µL<sup>-1</sup> (ciblage des champignons) et 5 ng.µL<sup>-1</sup> (ciblages des oomycètes) avec de l'eau ultra-pure avant les amplifications PCR.

### **2.3.2 Extractions d'ADN de plantes, champignons et oomycètes**

Les ADN ont été extraits à partir de 100 mg de tissus racinaires lyophilisés ou de mycélium à l'aide du kit FastDNA® SPIN (MP Biomedicals, Eschwege, Allemagne) conformément aux recommandations du fabricant.

Les échantillons d'ADN ont été quantifiés par fluorométrie à l'aide d'un kit de coloration QuantiFluor (Promega, Madison, Wisconsin, États-Unis) et d'un système TECAN, conformément aux instructions du fabricant.

Les ADN de plantes ont fait l'objet d'une dilution à 0.5 ng.µL<sup>-1</sup> avec de l'eau ultra pure avant les amplifications par PCR. Les échantillons ont été conservés au congélateur à -20°C jusqu'aux analyses.

## **2.4 Amplification par PCR**

Les couples d'amorces adaptées à l'amplification par PCR des ITS de la plus grande diversité possible de champignons et d'oomycètes ont été déterminés d'après la littérature. La région ITS a été amplifiée par PCR en utilisant les couples d'amorces ITS1Fngs/ITS4ngs pour les champignons et ITS1oo/ITS4ngs pour les oomycètes (Tableau 19). Les conditions favorables à l'amplification de ces fragments à partir des ADN extraits de sols, de racines de

pois, et de mycélium (mocks) ont été déterminées par des tests effectués préalablement à l'analyse des échantillons.

**Tableau 19** : Séquences des amorces utilisées pour les amplifications spécifiques de la région « internal transcribed spacer » (ITS) de champignons et d'oomycètes

Amorces	Séquences*	Références
ITS1Fngs-PacBio	/5AmMC6/ <b>gcagtcgaacatgtagctgactcaggtcac</b> GGTCATTAGAGGAAGTAA	Oja et al. 2015
ITS4ngs-PacBio	/5AmMC6/ <b>tggatcactgtgcaagcatcacatcgtag</b> TCCTSCGCTTATTGATATGC	Oja et al. 2015
ITS1oo-PacBio	/5AmMC6/ <b>gcagtcgaacatgtagctgactcaggtcac</b> GGAAGGATCATTACCACAC	Riit et al. 2016, 2018

\*Les séquences comprennent le bloqueur (en bleu) et l'adaptateur (en rouge) (suivant le protocole PacBio), suivis de la séquence des amorces proprement dites.

Les PCR ont été réalisées dans des mélanges réactionnels de 25 µL contenant le tampon 1X KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (KAPA Biosystems), 0,3 µM de chaque amorce, 1 ng d'ADN pour cibler les champignons, ou respectivement 1 ng d'ADN de plante ou 5 ng d'ADN de sol pour cibler les oomycètes, et de l'eau ultra pure.

Les PCR ont été initiées par une incubation de 3 min à 95 °C suivie de cycles de 30 s à 95 °C, 30 s à 55 °C, 1 min à 72 °C puis terminée par une extension finale de 10 min à 72 °C. Le nombre de cycles a été adapté à chaque cible à amplifier en fonction de l'origine de chaque ADN matrice : 23 et 30 cycles pour cibler respectivement les champignons et les oomycètes à partir d'ADN de plante, et 30 et 38 cycles pour cibler respectivement les champignons et les oomycètes à partir d'ADN de sol.

La taille et la qualité des amplicons obtenus ont été vérifiées par électrophorèse sur gels d'agarose 2%.

## 2.5 Séquençage PacBio

Les amplicons ont été envoyés à séquencer à la Plateforme GENTYANE (Génotypage et séquençage en Auvergne) de Clermont-Ferrand. Le séquençage doit être effectué avec des SMRT Cell 8M sur l'instrument Sequel II de PacBio. Les analyses sont en cours.





## CHAPITRE V

Biocontrôle du complexe parasitaire responsable  
des pourritures racinaires du pois



## Avant-propos

---

Les pourritures racinaires du pois constituent une préoccupation majeure pour les producteurs. Elles sont dues à un complexe de champignons et d'oomycètes pathogènes d'origine tellurique contre lequel peu de solutions de contrôle sont disponibles. L'intégration de résistances génétiques aux principaux agents du complexe parasitaire dans les cultivars de pois potager commerciaux est une voie de lutte prometteuse mais aucun cultivar résistant n'est encore disponible sur le marché. Les rotations culturales de longue durée privilégiant les espèces non-hôtes représentent à ce jour la seule méthode de lutte utilisée avec une certaine efficacité. La lutte biologique, via l'utilisation d'agents de biocontrôle microbiens, apparaît comme une piste intéressante pour accompagner l'utilisation future de cultivars résistants et la gestion culturale de la maladie. Son utilisation est notamment promue par la réglementation européenne dans un contexte de transition agroécologique (Directive européenne 2009/128/EC). La diversité des mécanismes d'action antagoniste des agents de biocontrôle microbiens apparaît particulièrement bien adaptée à la lutte contre un complexe parasitaire composé de multiples espèces aux caractéristiques écologiques variées. Cependant, malgré la multiplicité des études ayant montré une efficacité de certains agents de biocontrôle microbiens pour lutter contre le complexe parasitaire du pois, aucun n'est à ce jour homologué pour cet usage et commercialement disponible en France (DGAL/SASPP/2021-200). La démarche du travail présenté dans ce chapitre a donc consisté à rechercher parmi les produits de biocontrôle homologués ou en cours de développement, ceux ayant des activités de bio-protection des plantes contre les espèces composant le complexe parasitaire mais utilisées dans d'autres pathosystèmes, et de mesurer leur efficacité contre les agents pathogènes du complexe parasitaire du pois. Pour des raisons de calendrier, liées aux contraintes de la culture du pois et au calendrier de la thèse, les produits sélectionnés ont tout d'abord été testés au champ, en microparcelles expérimentales. Devant l'absence de résultats probants, nous avons choisi de cibler davantage les produits de biocontrôle pour les tester *in vitro* et en serre, contre les trois principaux agents pathogènes du complexe parasitaire du pois en France, mis en évidence dans les chapitres précédents : *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium solani* et *F. oxysporum*. Ce travail a fait l'objet du stage de Master 2 de Madison Van't Klooster. Cependant, des difficultés techniques ont été rencontrées durant les

expérimentations et n'ont pas permis d'obtenir des résultats probants. Le comité de suivi de thèse réuni en septembre 2019 a donc proposé l'abandon de l'axe « Biocontrôle du complexe parasitaire du pois » afin de focaliser les travaux de recherche sur les autres parties du projet de thèse, jugées prioritaires.

## 1. Introduction

Les pourritures racinaires du pois (*Pisum sativum*) sont une contrainte majeure dans la plupart des zones de culture intensive de pois à travers le monde, car elles peuvent engendrer des pertes de rendement considérables (Gossen et al. 2016 ; Harveson et al. 2021). Le complexe parasitaire qui en est à l'origine est composé de nombreuses espèces de champignons et d'oomycètes d'origine tellurique (Gossen et al. 2016 ; Taheri et al. 2017 ; Harveson et al. 2021). L'oomycète *Aphanomyces euteiches* ainsi que des champignons du genre *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. oxysporum* et *F. solani*) en sont les agents pathogènes les plus préoccupants (Gossen et al. 2016 ; Harveson et al. 2021 ; Gibert et al. 2021a, 2021b). D'autres agents pathogènes d'importance notamment des oomycètes des genres *Pythium* et *Phytophthora* et des champignons comme *F. redolens*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola*, ou *Didymella* spp. sont également fréquemment associés aux lésions racinaires (Blume & Harman 1979 ; Tu 1991 ; Oyarzun et al. 1993 ; Persson et al. 1997 ; Gossen et al. 2011 ; Parker et al. 2013 ; Melzer et al. 2016 ; Chatterton et al. 2019 ; Šišić et al. 2018). Plus récemment, une autre composante du complexe parasitaire, *Clonostachys rhizophaga*, a été identifiée dans la région des Hauts-de-France (Chapitre III).

Cette diversité d'espèces implique des caractéristiques physiologiques, écologiques et pathogéniques variées aboutissant à l'absence de méthode de lutte contre la maladie. Ainsi, des traitements appliqués en enrobage de semences, comme le métalaxyl, les carbendazime, pencycurone, iprodione ou le thirame ont montré leur efficacité contre les fontes de semis dues à certains de ces agents mais restent inefficaces contre les pourritures racinaires apparaissant plus tard dans la saison (Hwang et al. 2001, 2007 ; Chang et al. 2011 ; Silva et al. 2013). La plupart des fongicides sont de plus inopérants contre les oomycètes qui disposent d'une composition pariétale et de voies métaboliques qui leur sont propres (Wakelin et al. 2002). Ils restent également indésirables dans la plupart des zones de culture de pois en raison de leur toxicité et de leurs impacts négatifs sur l'environnement. La sélection de variétés de pois résistantes est une option de contrôle plus prometteuse. Des résistances monogéniques dominantes contre différentes races de *F. oxysporum* f. sp. *lisi*, dont certaines sont déjà intégrées dans des cultivars commerciaux de pois potager et fourrager, sont connues de longue date (McPhee et al. 2012 ; Porter et al. 2014 ; Jain et al. 2015). Plusieurs *loci* de caractères quantitatifs (QTL) contrôlant des résistances partielles à *A. euteiches*, et de manière

indépendante, à *F. solani* f. sp. *pisi*, ont également été caractérisés dans les programmes de sélection de pois (Lavaud et al. 2016 ; Desgroux et al. 2018 ; Coyne et al. 2019 ; Williamson-Benavides et al. 2020). Cependant aucun cultivar de pois potager résistant à ces deux agents pathogènes majeurs n'est encore disponible sur le marché. La gestion de l'inoculum pathogène des parcelles, via des rotations longues privilégiant les espèces non-hôtes, ou chez les légumineuses, des variétés résistantes de vesce ou de féveroles, reste à ce jour la principale manière de lutter avec efficacité contre les agents pathogènes du complexe parasitaire et notamment *A. euteiches* (Moussart et al. 2009, 2013). La persistance dans le sol des propagules de certaines espèces, comme les oospores d'*A. euteiches*, peut cependant nécessiter des rotations longues posant des problèmes de gestion des surfaces agricoles (Papavizas and Ayers 1974). En outre, le principe des rotations longues ne permet pas vraiment le contrôle d'agents pathogènes au large spectre d'hôtes, comme *F. avenaceum* (Šišić et al. 2018; Moparthi et al. 2021 ; Safarieskandari et al. 2021).

Parallèlement à la gestion culturale et au développement de cultivars résistants aux agents pathogènes, la lutte biologique est une piste prometteuse. Dans l'Union Européenne, la directive européenne 2009/128/EC, qui instaure un cadre législatif communautaire pour une utilisation des pesticides en accord avec le développement durable, en promeut l'usage de protection des plantes via l'utilisation de méthodes dites « non chimiques ». Le règlement (CE) N° 1107/2009 intègre l'emploi des produits de biocontrôle parmi les méthodes de lutte biologique. Ce règlement régit la mise sur le marché des produits de biocontrôle, et notamment celle des agents de biocontrôle microbiens, au côté des substances actives d'origine naturelle qui exercent une action générale ou spécifique sur les organismes nuisibles aux végétaux. La multiplicité des modes d'actions de ces agents microbiens, qu'il s'agisse d'antagonisme direct, comme le parasitisme, l'antibiose ou la compétition pour les nutriments ou l'espace, ou indirect, comme la promotion de la croissance ou l'induction des réactions de défense de la plante hôte, apparaît particulièrement bien adaptée à la gestion d'un complexe parasitaire (Alabouvette et al. 2006, 2009). De nombreux agents de biocontrôle microbiens, qu'ils soient d'origine fongique ou bactérienne, ont ainsi montré des effets bénéfiques en réduisant les symptômes de pourritures racinaires du pois, en agissant contre un ou plusieurs agents du complexe parasitaire. Ainsi, plusieurs champignons mycorhiziens à arbuscules du genre *Glomus* sont des antagonistes connus d'*A. euteiches* (Rosendahl 1985 ; Kjoller &

Rosendahl 1996 ; Slezack et al. 2000 ; Thygesen et al. 2004). Plusieurs souches de *Clonostachys rosea*, dont la souche ACM941 commercialisée sous le nom de DONguard®, ont montré des effets intéressants sur l'émergence du pois et la gravité de la pourriture des racines liée à *A. euteiches* mais également à la plupart des agents pathogènes du complexe parasitaire dont *F. solani* f. sp. *pisi* et *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Castejon-Munoz & Oyarzun 1995 ; Xue 2003a, 2003b). Certaines souches non pathogènes de *F. oxysporum* ont également été rapportées pour leur efficacité contre *F. solani* f. sp. *pisi* et *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Oyarzun et al. 1994 ; Mandeel 2006 ; Alabouvette et al. 2009). Enfin, de nombreuses bactéries des genres *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ou de l'espèce *Burkholderia cepacia*, associées ou non à des traitements fongicides des semences, ont montré des effets positifs sur l'émergence du pois et la gravité de la pourriture des racines liée à *A. euteiches*, *Pythium* spp. ou encore *F. solani* f. sp. *pisi* (Parke 1991 ; Bowers & Parke 1993 ; Wakelin et al. 2002 ; Wang et al. 2003 ; Negi et al. 2008 ; Pieta & Pastucha 2008 ; Godebo et al. 2020 ; Riaz et al. 2021).

Cependant, malgré la multiplicité des études ayant révélé l'efficacité d'agents de biocontrôle microbiens pour lutter contre des composantes du complexe parasitaire responsable de pourritures racinaires du pois, peu ont dépassé le stade de la recherche et aucun de ces agents n'est à ce jour homologué pour cet usage et commercialement disponible en France. Ce paradoxe révèle tout d'abord la difficulté technique de passer des études de laboratoire aux applications en grandes cultures. Il reflète également les freins des processus réglementaires d'autorisation de mise sur le marché nécessaire à leur commercialisation. L'étude présentée dans ce chapitre s'est focalisée sur des agents de biocontrôle en cours de développement ou déjà homologués pour d'autres usages en France (DGAL/SASPP/2021-200). La démarche a consisté à rechercher parmi les produits de biocontrôle disponibles, ceux ayant des activités de bio-protection des plantes contre les espèces composant le complexe parasitaire mais utilisés dans d'autres pathosystèmes, et à mesurer leur efficacité contre les trois principaux agents pathogènes du complexe parasitaire du pois en France : *A. euteiches*, *F. solani* et *F. oxysporum*. Les objectifs de ce travail ont été d'évaluer ces produits de biocontrôle i) *in vitro*, en boîtes de Petri pour étudier leur aptitude à inhiber le développement de ces trois agents pathogènes, ii) en serre, pour évaluer leur aptitude à prévenir l'infection du pois par ces trois agents pathogènes et iii) au champ en microparcelles expérimentales, pour tester leur aptitude à contrôler l'infestation des cultures de pois potager.



## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Matériel biologique

#### 2.1.1 Agents pathogènes

Les agents pathogènes testés lors des essais *in vitro* et en serre ont été sélectionnés parmi les isolats caractérisés dans le Chapitre III de cette thèse et au sein de la collection de Microorganismes d'Intérêt Agro-Environnemental (MIAE) de l'UMR Agroécologie d'INRAE de Dijon. Il s'agit de la souche d'*A. euteiches* RB84 (MIAE01624) ainsi que des souches de *F. solani* 26a et *F. oxysporum* 8b isolées de racines de pois symptomatiques échantillonnées respectivement dans les parcelles F2 (Sainte-Marie-Cappel) et F1 (Bavinchove) dans le département du Nord de la France. La virulence et l'agressivité de ces souches sur pois (cv. Firenze) ont été confirmées lors de tests *in vitro* (Chapitre III).

#### 2.1.2 Agents de biocontrôle

Les produits de biocontrôle ont été sélectionnés parmi les produits homologués en France au 1/01/2018, commercialisés à l'étranger ou parmi des produits en cours de développement (*F. oxysporum* Fo47 ; Alabouvette et al. 2009). Les informations indiquées par les fournisseurs concernant le nom des produits, le ou les organismes actifs ainsi que les cibles potentielles, sont données dans le Tableau 20.

Les sept produits de biocontrôle sélectionnés ont été testés lors des essais au champ. Seuls les champignons *F. oxysporum* Fo47, *C. rosea* ACM941 du DONguard® (*C. rosea* DG ; Adjuvant plus) et l'oomycète *P. oligandrum* M1 ATCC38472 du Polyversum® (*P. oligandrum* PV ; De Sangosse) ont été utilisés pour les tests *in vitro* et en serre.

#### 2.1.3 Variétés de pois

Deux variétés de pois potager couramment cultivées dans le nord de la France et sensibles aux pourritures racinaires, Crécerelle (GSN-Blondeau, Bersee, France) et Firenze (Vilmorin, La Méniltré, France), ont été utilisées pour l'essai au champ. Les tests en serre ont été effectués sur la variété Firenze, réputée pour être plus sensible aux pourritures racinaires. Ces deux variétés présentent toutefois une résistance à la race 1 de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (GEVES, 2020).

**Tableau 20** : Produits de biocontrôle homologués ou en développement sélectionnés pour être testés *in vitro*, en serre et au champ

Nom du produit	Fournisseur <sup>a</sup>	Organismes actifs <sup>b</sup>	Cibles connues <sup>c</sup>	Concentration finale <sup>d</sup>	Références
PRESTOP®	Lallemand Plant Care	<i>Clonostachys rosea</i> J1446	<i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Phytophthora</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.	0,5 g/m <sup>2</sup>	<a href="http://www.lallemandplantcare.com">www.lallemandplantcare.com</a> ; Mcquilken et al. 2001 ; Chatterton & Punja 2009
ASPERELLO™ T34 Biocontrol®	Biobest	<i>Trichoderma asperillum</i> T34	<i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp., <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	0,5 g/m <sup>2</sup>	<a href="http://www.biobestgroup.com">www.biobestgroup.com</a> ; Cotxarrera et al. 2002 ; Trillas et al. 2006 ; Borrero et al. 2012 ; Estévez-Geffriaud et al. 2020
REMEDIER®	Isagro	<i>Trichoderma gamsii</i> icc080 + <i>T. asperillum</i> icc012	<i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp., <i>Thielaviopsis basicola</i> , <i>R. solani</i>	0,25 g/m <sup>2</sup>	<a href="http://www.isagro.com">www.isagro.com</a> ; Woo et al. 2014 ; Gerin et al. 2018
TRIANUM-G®	Koppert Biological Systems	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai T-22 et ITEM-908	Pythiacées, <i>Fusarium</i> spp., <i>R. solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	2,5 g/m <sup>2</sup>	<a href="http://www.koppert.fr">www.koppert.fr</a> ; European Food Safety Authority 2013 ; Woo et al. 2014
Polyversum®	De Sangosse	<i>Pythium oligandrum</i> M1 ATCC38472*	<i>Fusarium</i> spp., <i>S. sclerotiorum</i>	0,01 g/m <sup>2</sup>	<a href="http://www.desangosse.fr">www.desangosse.fr</a> ; Anastassiadou et al. 2020
Fo47	Collection MIAE	<i>Fusarium oxysporum</i> Fo47*	<i>Fusarium</i> spp.	3,7.10 <sup>7</sup> conidies/m <sup>2</sup>	Alabouvette 1999 ; Edel-Hermann et al. 2009 ; Aime et al. 2013
DONguard®	Adjuvant Plus	<i>C. rosea</i> *	<i>F. solani</i> f. sp. <i>pisi</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> , <i>Didymella</i> spp., <i>R. solani</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>Alternaria alternata</i>	/	<a href="http://www.adjuvantsplus.com">www.adjuvantsplus.com</a> ; Xue 2003a, 2003b

<sup>a</sup> Fournisseurs des produits à la date des essais de biocontrôle

<sup>b, c</sup> Noms des souches et des organismes cibles indiqués par les fournisseurs ; MIAE : microorganismes d'intérêt pour l'agriculture et l'environnement (INRAE, Dijon) ; \* agents de biocontrôle testés *in vitro* et en serre

<sup>d</sup> Doses appliquées lors de l'essai au champ. / = enrobage de semences pour le DONguard®

## 2.2 Tests de confrontations *in vitro*

Chaque agent de biocontrôle sélectionné (*F. oxysporum* Fo47, *C. rosea* DG et *P. oligandrum* PV) a été testé en confrontation sur milieu potato dextrose agar (PDA, 39 g.L<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) avec chacune des trois souches pathogènes retenues (*A. euteiches* RB 84, *F. solani* 26a et *F. oxysporum* 8b) afin de mettre en évidence des effets antagonistes potentiels. Pour cela, les agents de biocontrôle et les agents pathogènes fongiques et oomycètes ont été cultivés respectivement sur milieu PDA et sur milieu corn meal agar (CMA, 10 g.L<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich), à 24°C pendant 7 jours. Pour chaque test de confrontation, un implant de gélose d'une culture pure de l'agent de biocontrôle a été disposé sur une boîte de Petri de milieu PDA à 40 mm d'un implant de gélose d'une culture pure d'un agent pathogène. Les témoins ont été inoculés avec un implant gélosé d'une culture de l'agent pathogène ou de l'agent de biocontrôle seul, disposé au centre d'une boîte de Petri sur milieu PDA. Chaque modalité a été répétée sept fois. L'ensemble des boîtes de Petri a été placé en incubation à 24°C pendant 10 jours. La croissance radiale de chaque colonie mycélienne a été mesurée dans l'axe des deux colonies avec un pied à coulisse électronique toutes les 24 h pendant 4 jours. La présence d'éventuelles plages d'inhibitions a été observée visuellement jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour post-inoculation.

## 2.3 Essai en serre

### 2.3.1 Préparation des inoculums

Les champignons *F. oxysporum* Fo47, *C. rosea* DG, *F. solani* 26a et *F. oxysporum* 8b ont été cultivés séparément sur milieu PDA à 24°C pendant 7 jours. Le matériel biologique s'étant développé à la surface des boîtes de Petri a été récupéré à l'aide d'une oese puis inoculé dans des erlenmeyers contenant 5 mL de milieu potato dextrose broth (Sigma-Aldrich) et incubé en incubateur-agitateur à 25°C et 125 rpm pendant 5 jours. Les conidies de chaque culture ont ensuite été récupérées par filtration sur filtres en verre fritté de 100 µm de porosité. Les filtrats ont été placés dans des tubes de 50 mL en polypropylène à fond conique et ont été concentrés et lavés 3 fois à l'eau stérile par centrifugations successives de 5 min à 6000 g. Les conidies obtenues ont été suspendues dans 5 mL d'eau osmosée stérile, dénombrées par comptage à la cellule de Malassez puis conservées (24 h maximum) à 4°C jusqu'à l'inoculation.

Avant l'inoculation, les suspensions ont été ajustées à la concentration souhaitée avec de l'eau osmosée stérile.

Les oomycètes *P. oligandrum* PV et *A. euteiches* RB 84 ont été cultivés sur milieu CMA à 24°C pendant 8 jours. Pour chaque souche, une fiole de Roux contenant 150 mL de milieu Oat Meal Broth (bouillon à 20 g.L<sup>-1</sup> de flocons d'avoine broyés, chauffé à 80°C pendant 1h ; Gangneux et al. 2014) a été inoculée avec cinq implants de 1 cm de diamètre et incubée pendant 3 semaines à 25°C. Le matériel biologique a été récupéré à l'aide d'une oese stérile et broyé avec un homogénéisateur Ultra-Turaxx® (IKA, Staufen, Allemagne) dans 10 mL de milieu Oat Meal Broth. Le broyat a ensuite été filtré sur une soie à bluter stérile Nitex® 03-48/31 (Sefar, Heiden, Suisse) de maille 48 µm. Le filtrat a été récupéré dans des tubes de 50 mL en polypropylène à fond conique puis centrifugé à 3000 g pendant 5 min. Les culots obtenus ont été suspendus dans 5 mL d'eau osmosée stérile et les oospores dénombrées par comptage à la cellule de Malassez. La quantité d'inoculum obtenue s'est avérée insuffisante et n'a pas permis d'effectuer la totalité des tests prévus (voir partie Résultats). Les résultats ne sont donc pas présentés pour les modalités incluant *P. oligandrum* PV et *A. euteiches* RB 84.

### 2.3.2 Mise en place et suivi de l'essai

L'essai a été effectué suivant un dispositif expérimental en alvéoles de type pots forestiers contenant 350 mL de substrat composé d'un mélange de 70 % vermiculite et de 30 % de billes d'argile (Figure 23).



Figure 23 : Dispositif de l'essai en serre 5 jours (A et B) et 7 jours (C) post-semis

Chaque agent de biocontrôle, *F. oxysporum* Fo47, *C. rosea* DG et *P. oligandrum* PV, a été testé en co-inoculation avec chacun des agents pathogènes du complexe parasitaire, *F. solani* 26a, *F. oxysporum* 8b et *A. euteiches* RB 84 (les résultats ne sont pas présentés pour les modalités incluant *P. oligandrum* PV et *A. euteiches* RB 84, voir ci-dessus). Pour chaque couple agent pathogène/agent de biocontrôle, le substrat stérile présent dans une alvéole a été co-inoculé 5 jours avant le semis avec un inoculum d'un agent de biocontrôle et un inoculum d'un agent pathogène. Les substrats des témoins ont été inoculés avec l'agent pathogène seul, l'agent de biocontrôle seul ou non inoculés. Les inoculums ont été calibrés à  $10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> de substrat. Chaque modalité compte huit répétitions techniques.

Préalablement aux semis, des semences de pois (cv. Firenze, Vilmorin, France) ont été désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium ( $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  de Cl<sub>2</sub> disponible) pendant 10 min et rincées trois fois dans de l'eau osmosée stérile. Les graines des lots destinés aux modalités avec agents de biocontrôle ont été immergées pendant 5 h dans 200 mL d'une suspension de l'agent de biocontrôle à  $10^5$  spores.mL<sup>-1</sup>. Les graines des lots destinés aux modalités témoins non-inoculés et aux agents pathogènes seuls ont été immergées dans 200 mL d'eau osmosée stérile pendant 5 h. Pour compenser d'éventuelles pertes en pré-émergence, deux graines ont été semées dans chaque alvéole et une des deux plantules a été retirée une semaine après le semis. Les plantules ont été arrosées  $5 \times 20$  s par jour durant toute la durée du test avec une solution nutritive NPK 3.10 (teneurs égales en azote, phosphore et potassium) avec un goutteur. Suivant les besoins, un arrosage par brumisation d'eau osmosée a été effectué 2 à 3 fois par jour. L'ensemble de l'essai a été placé en conditions semi-contrôlées dans un compartiment de serre à 25°C jour/23°C nuit,  $80 \pm 10$  % d'humidité, avec une photopériode de 16 h de lumière/ 8 h d'obscurité. Les plantules ont été dépotées à 28 jours post-semis et 33 jours post-inoculation.

Pour les modalités inoculées avec *F. solani* 26a et *F. oxysporum* 8b, la sévérité des symptômes observés sur les racines a été évaluée suivant une échelle qualitative de 0 à 6 adaptée de Schneider & Kelly (2000) : 0 = plante saine, pas de symptôme ; 1 = lésions marron à noires inférieures à 1 cm sur un côté de la racine pivot ; 2 = lésions marron à noires inférieures à 1 cm sur plus d'un côté de la racine pivot ; 3 = lésions marron à noires comprises entre 1 et 2 cm sur l'intégralité la racine pivot ; 4 = lésions marron à noires supérieures à 2 cm sur le pivot mais les racines latérales sont saines et en place ; 5 = lésions marron à noires supérieures à 2

cm sur le pivot mais les racines latérales présentent des lésions ou se disloquent ; 6 = plante morte. Des isollements ont été effectués à partir des racines symptomatiques sur milieu PDA (incubées à 24°C pendant 48 h) pour vérifier la présence de l'agent pathogène inoculé. Après les notations, les racines et les parties aériennes de chaque plante de toutes les modalités ont été coupées au niveau du collet et placées respectivement dans des tubes en plastique de 5 mL et dans des enveloppes en papier. Les échantillons ont été séchés dans une étuve à 80°C pendant 48 h et pesés avec une balance de précision.

## 2.4 Essai au champ

### 2.4.1 Préparation des inoculums

La souche *F. oxysporum* Fo47 a été cultivée dans du milieu malt liquide et incubée à 25°C sous agitation à 125 rpm pendant 5 jours. Les conidies ont été récupérées par filtration sur filtre en verre fritté de 100 µm de porosité. Les filtrats ont été concentrés par centrifugation de 20 min à 8000 g puis lavés à l'eau stérile et centrifugés pendant 10 min à 7000 g deux fois successivement. Les conidies obtenues ont été suspendues dans 30 mL d'eau stérile et dénombrées par comptage à la cellule de Malassez. La suspension a été ajustée à  $10^7$  conidies.mL<sup>-1</sup> avec de l'eau stérile dans un volume de 50 mL/microparcelle à traiter.

Les produits de biocontrôle commerciaux destinés à être appliqués par pulvérisation ont été préparés à la dose préconisée par le fournisseur 3 h avant pulvérisation (Tableau 20). Pour cela, la quantité nécessaire de chaque poudre de produit commercial a été pesée sur une balance de précision. Chaque poudre a ensuite été pré-diluée dans de l'eau osmosée stérile à hauteur de 50 mL par microparcelle à traiter. Les volumes de toutes les suspensions ont été réajustés avant pulvérisation avec 0,75 L d'eau.

L'agent de biocontrôle *C. rosea* DG a été appliqué en enrobage de semences. Pour cela, des graines de pois potager d'un lot de la variété Crécerelle et d'un lot de la variété Firenze ont été rincées deux fois à l'eau osmosée stérile 5 h avant le semis. Les graines ont ensuite été imbibées pendant 20 min dans une suspension de spores de *C. rosea* préparée dans de l'eau osmosée stérile à 2 g.L<sup>-1</sup>, à hauteur de 2,3 mL de suspension pour 1000 graines. Des graines de chaque variété destinées aux microparcelles témoins de cet agent de biocontrôle ont été imbibées dans de l'eau osmosée stérile pendant 20 min (2,3 mL pour 1000 graines). Une

nouvelle application foliaire de ce produit a été effectuée par pulvérisation 71 jours post-semis à une dose de 60 mg.m<sup>2</sup>.

#### **2.4.2 Mise en place de l'essai**

L'essai a eu lieu au domaine de l'Unité Expérimentale INRAE d'Epoisses (Bretenière, Côte-d'or France). La parcelle utilisée (parcelle H3) a été choisie car elle présente de nombreuses occurrences de pourritures racinaires du pois dans son historique de cultures. La présence d'*A. euteiches* y est avérée et le potentiel infectieux du sol, mesuré par un prestataire extérieur (Galys Laboratoire, Bethune, France) en amont de l'essai, était de 0,6 en 2017 (sur une échelle de 0 à 5 (Moussart et al. 2009)).

L'essai est composé de trois blocs de dimensions identiques (Figure 24). Chaque produit de biocontrôle a été inoculé sur des microparcelles rectangulaires de 13,5 m<sup>2</sup> (8,50 m × 1,50 m) avec une répétition par bloc et par variété de pois potager. Des microparcelles témoins adjacentes et de taille similaire aux parcelles traitées ont été utilisées pour prendre en compte la dispersion hétérogène de l'inoculum pathogène dans le champ. Les graines de pois ont été semées au semoir automatique (Wintersteiger, Contres, France) à une densité de 18 graines par mètre en rangs espacés de 20 cm (6 rangs par microparcelle).

Chaque microparcelle a été subdivisée en deux demi-parcelles de 4,5 m<sup>2</sup> (3 m × 1,50 m) chacune : une demi-parcelle pour effectuer des prélèvements de plantes symptomatiques durant l'essai et une demi-parcelle pour mesurer le rendement à la fin de l'essai. Afin de prendre en compte l'imprécision de la moissonneuse à la récolte, les plantes semées sur une bande de 0,83 m<sup>2</sup> (1,25 m × 1,50 m) entre les deux demi-parcelles et de 0,95 m<sup>2</sup> (0,63 m × 1,50 m) aux extrémités des demi-parcelles ont été fauchées en cours d'essai et n'ont pas été prises en compte. Enfin, des pois ont été semés sur les bordures de 1,50 m de largeur au nord et sud de l'essai afin d'éviter les interactions avec les parcelles adjacentes. Trois produits de biocontrôle d'un autre projet ont également été testés lors de cet essai mais n'ont pas été pris en compte dans les résultats (Figure 24).

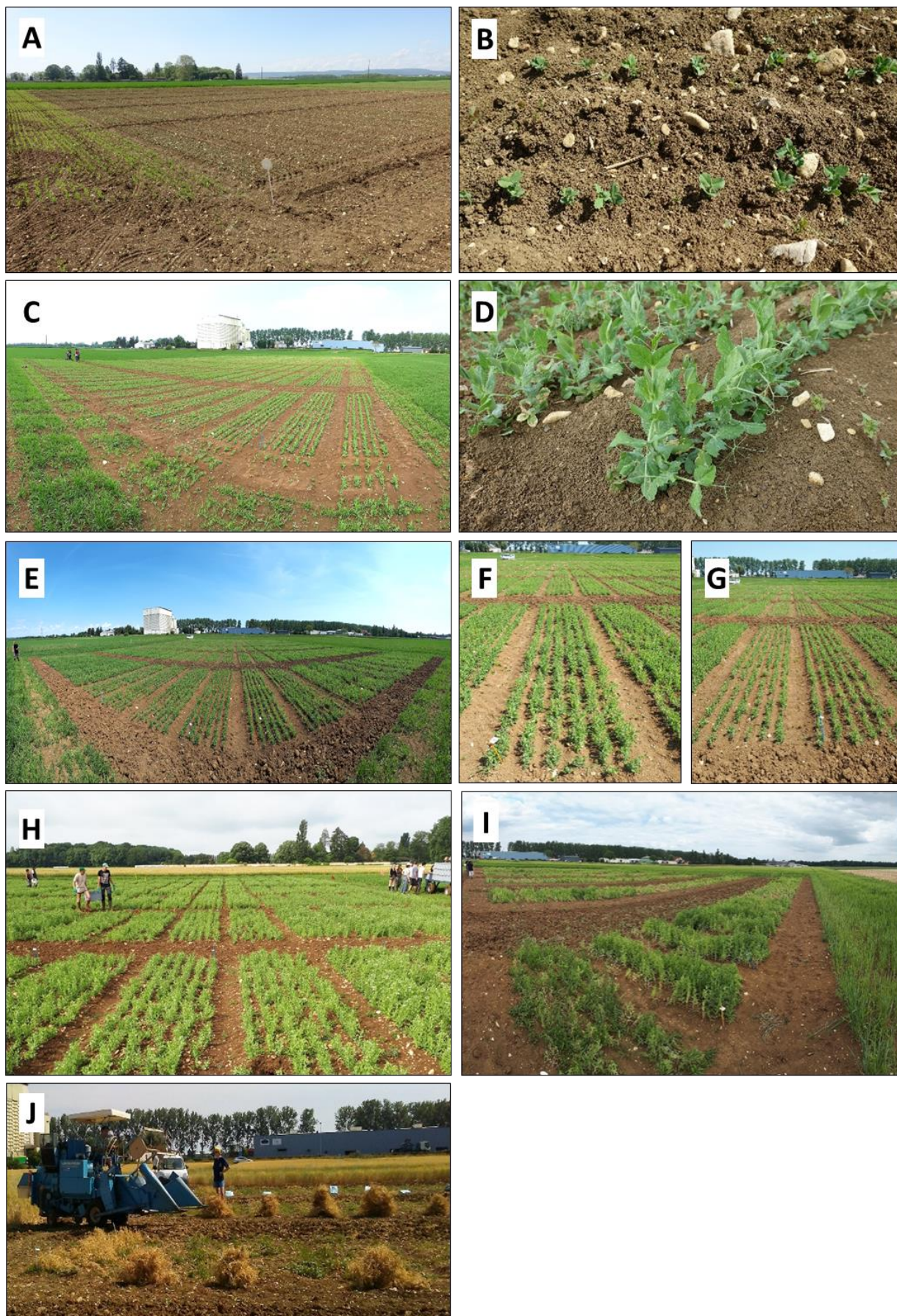




### 2.4.3 Conduite de l'essai

Le semis a été effectué le 11/04/2018 (Figure 25). Hormis *C. rosea* DG qui a été appliqué en enrobage de semences, les produits ont été pulvérisés suite au semis à la dose prescrite par le fournisseur (Tableau 20). Un arrosage de 20 L d'eau par m<sup>2</sup> a été effectué suite à l'inoculation à l'aide d'une rampe d'arrosage pour grandes cultures. Les microparcelles traitées avec *C. rosea* DG ont fait l'objet d'une nouvelle application foliaire de cet agent 71 jours post-semis à une dose de 60 mg/m<sup>2</sup>.

Afin de maintenir l'humidité du sol et de favoriser le développement du complexe parasitaire du pois, des irrigations supplémentaires de 20 L d'eau par m<sup>2</sup> ont été effectuées à l'aide d'une rampe d'arrosage de manière épisodique. Le désherbage des plantes adventices de la parcelle a été effectué de façon mécanique à 1,5 mois post-semis puis de façon manuelle à intervalles réguliers. Les demi-microparcelles destinées aux mesures de rendement ont été délimitées à l'aide d'un rotavator suite aux prélèvements nécessaires aux mesures d'indices nécrotiques racinaires (INR) effectués sur les demi-parcelles destinées aux prélèvements. La récolte a été effectuée le 03/07/2018 avec une moissonneuse. Des intempéries (orage violent) le jour de la récolte n'ont pas permis de récupérer les plantes du bloc 3 (des rafales de vent ont emporté les plantes récoltés). Les résultats de la récolte ne sont donc présentés que pour les données obtenues à partir des blocs 1 et 2.



**Figure 25** : Evolution de l'essai visant à tester des produits de biocontrôle au champ. Vision globale de la parcelle 2 semaines après le semis (A, B) ; 5 semaines après le semis (C, D) ; 6,5 semaines après le semis (E), cv. Crécerelle 6,5 semaines après le semis (F) et cv. Firenze 6,5 semaines après le semis (G) ; 7 semaines après le semis (H) ; 9 semaines après le semis (I) et à la récolte 12 semaines après le semis (J).

#### 2.4.4 Mesures effectuées

Un suivi basé sur des mesures de réflectance chlorophyllienne (normalized difference vegetation index, NDVI) a été effectué durant la culture. Les mesures de NDVI ont été effectuées à 44, 48, 54, 62 jours post-semis. Les données, nombreuses et très variables n'ayant révélé aucune différence significative entre les traitements, les résultats ne sont pas présentés. Des prélèvements de 10 plantes ont été effectués dans les demi-microparcelles dédiées 50 jours après le semis (la date a été fixée sur la base des résultats d'INR sur des prélèvements exploratoires en bordures). La sévérité des symptômes observés sur les racines a été évaluée selon un INR de 0 à 5 défini par Wicker et al. (2001) : 0 = aucun symptôme ; 1 = racines avec quelques lésions décolorées ou des radicelles de couleur miel ; 2 = zones décolorées ou de couleur miel couvrant au moins la moitié du système racinaire ; 3 = lésions de couleur miel couvrant au moins la moitié du système racinaire ; hypocotyle ou épicotyle décoloré et imbibé d'eau dans certains cas ; 4 = majeure partie du système racinaire de couleur miel à brun foncé et épicotyle ramolli ou brun ; 5 = plante morte. La biomasse fraîche des parties racinaires et des parties aériennes a été pesée sur une balance. Les parties racinaires et aériennes ont été séchées à l'étuve à 80°C pendant 48 h puis les biomasses ont été pesées avec une balance de précision. A la récolte, le rendement (poids frais et poids sec) et le poids de mille grains (PMG) de chaque demi-microparcelle traitée et de son témoin adjacent ont été mesurés avec une balance.

### 2.5 Analyses statistiques

Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel statistique R version 4.0.1 pour Windows (R Core Team 2020, ressource en ligne 1). Le package tidyverse v1.3.0 a été utilisé pour analyser l'ensemble des données (Wickham et al. 2019). Les tests statistiques ont été effectués avec les packages car (Fox & Weisberg 2019), rstatix (Kassambara 2021) et mulcomp (Hothorn et al. 2008).

Les comparaisons des biomasses des plantes sèches entre les modalités de l'essai en serre ont été effectuées par une analyse de variance ANOVA suivie de tests de comparaison deux à deux de Tukey. Les comparaisons des scores de pathogénicité ont été effectuées avec des tests de Kruskal-Wallis suivis de tests de comparaison deux à deux de Wilcoxon. Les hypothèses de

normalité et d'homogénéité des variances des résidus ont été vérifiées graphiquement et par des tests de Shapiro et de Levene, respectivement.

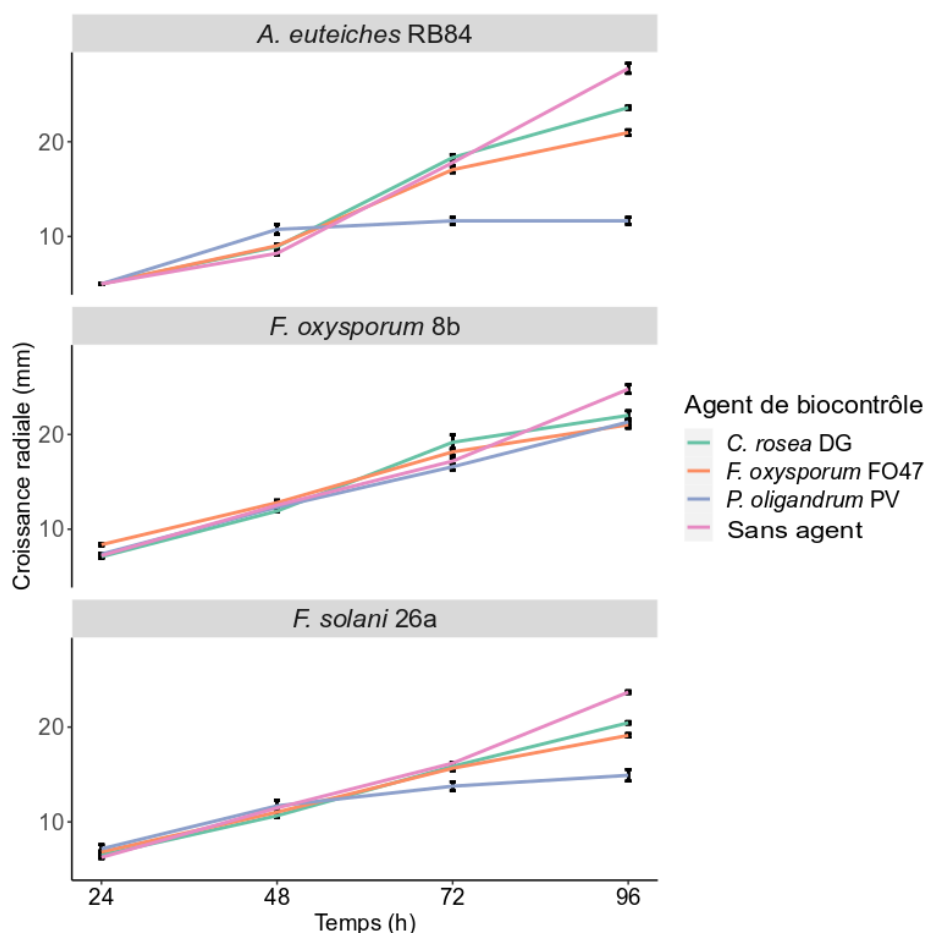
Pour l'essai au champ, pour chaque type de mesure, la moyenne des valeurs obtenues sur les microparcelles traitées a été comparée à la moyenne des valeurs obtenues sur les microparcelles témoins adjacentes non traitées par un test de Wilcoxon. Afin de comparer les produits de biocontrôle entre eux, tout en prenant en compte le témoin adjacent dans chaque modalité, le rapport entre la valeur obtenue pour chaque microparcelle traitée et celle obtenue pour son témoin adjacent non traité a été effectué. Les données ont été analysées par une analyse de variance ANOVA à deux facteurs (traitement et variété de pois). Les hypothèses de normalité et d'homogénéité des variances des résidus ont été vérifiées graphiquement et par des tests de Shapiro et de Levene, respectivement.



### 3. Résultats et discussion

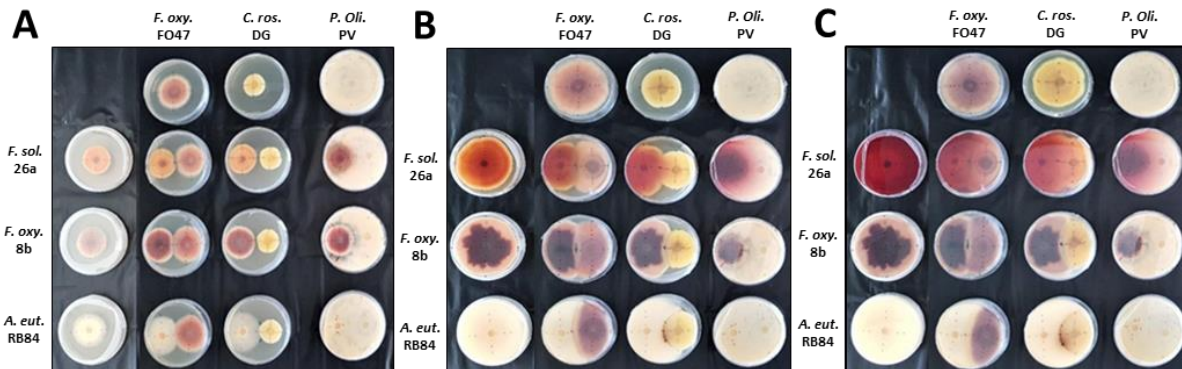
#### 3.1 Tests de confrontations *in vitro*

Les cinétiques de croissance des agents pathogènes sélectionnés placés en confrontation avec chacun des agents de biocontrôle sélectionnés sur milieu PDA, montrent une diminution significative de la vitesse de croissance pour toutes les modalités testées à partir de 96 h post-inoculation par comparaison avec le témoin sans agent de biocontrôle (Figure 26). Cette inhibition de croissance radiale est particulièrement marquée pour *A. euteiches* RB84 et *F. solani* 26a en présence de *P. oligandrum* PV, modalités pour lesquelles elle apparaît significative dès 72 h post-inoculation. Pour les autres modalités, l'inhibition de croissance radiale à 96 h, même si elle est significative, reste peu marquée notamment entre les trois agents de biocontrôle et *F. oxysporum* 8b.



**Figure 26** : Cinétique de croissance radiale des agents pathogènes durant 96 h dans les tests de confrontation entre les agents de biocontrôle sélectionnés (*Clonostachys rosea* du Donguard (DG), *Fusarium oxysporum* Fo47, et *Pythium oligandrum* du Polyversum (PV)) et les agents pathogènes du complexe parasitaire du pois (*Aphanomyces euteiches* RB84, *Fusarium solani* 26a et *F. oxysporum* 8b). Les tests ont été effectués sur milieu potato dextrose agar. Les barres d'erreurs de couleur noire représentent les erreurs standards calculées sur la base des réplicats techniques effectués.

L'observation des colonies entre 4 et 10 jours post-inoculation révèle cependant un antagonisme marqué, comparativement aux modalités témoins, entre ces trois agents de biocontrôle et *F. oxysporum* 8b (Figure 27).



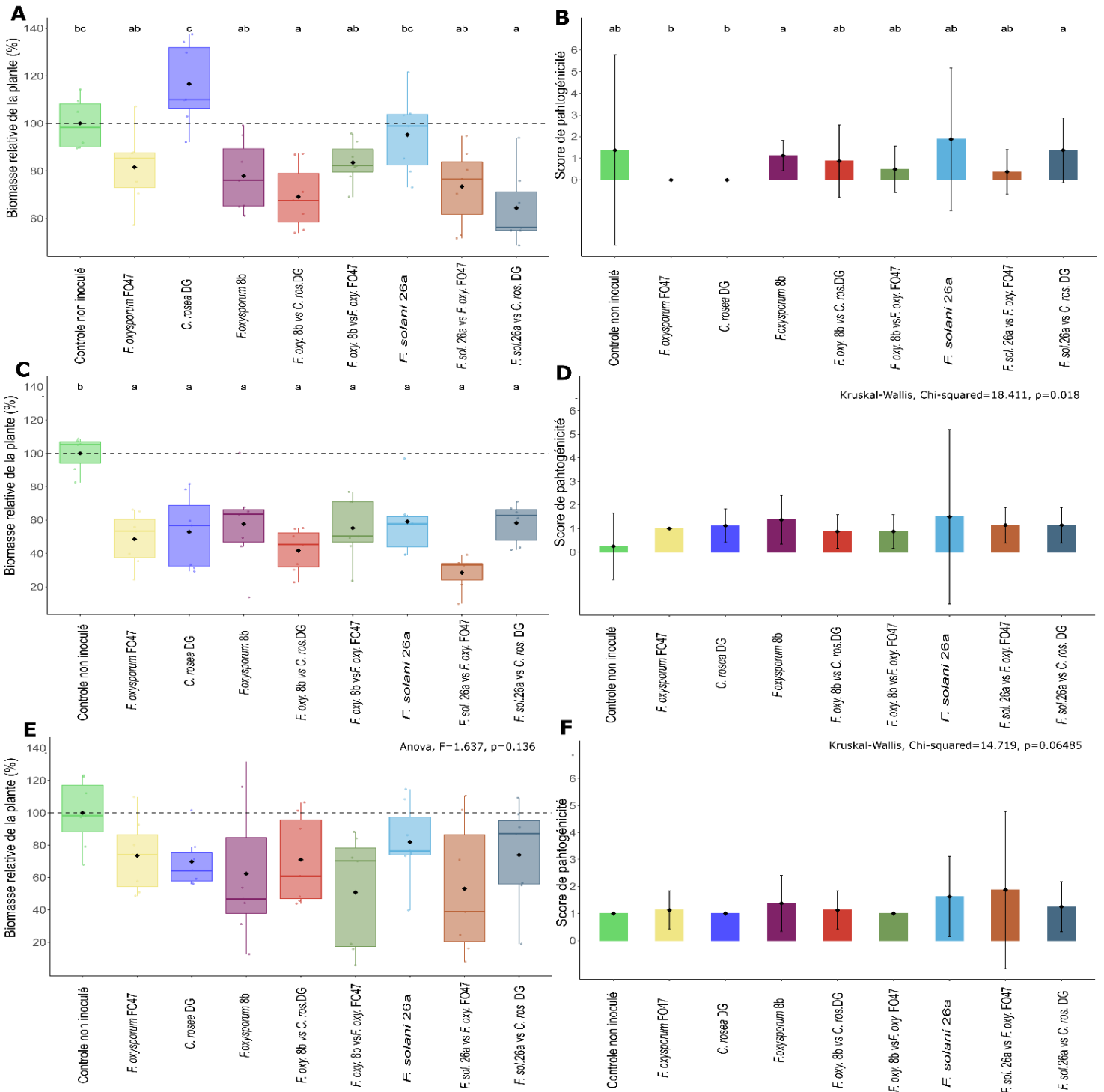
**Figure 27** : Photographies des tests de confrontation à 4 jours (A), 7 jours (B) et 10 jours (C) post-inoculation entre les agents de biocontrôle *Fusarium oxysporum* Fo47, *Clonostachys rosea* du Donguard (DG ; Endofine SI) et *Pythium oligandrum* du Polyversum (PV) et les agents pathogènes du complexe parasitaire du pois *Aphanomyces euteiches* RB84, *Fusarium solani* 26a et *F. oxysporum* 8b. Les tests ont été effectués sur milieu potato dextrose agar (Photographies de Madison Van't Klooster).

Au vu de ces tests *in vitro*, la souche de *P. oligandrum* PV présente le meilleur potentiel antagoniste contre les agents pathogènes testés. La croissance extrêmement rapide de cette souche sur milieu PDA pourrait être à l'origine de l'inhibition rapide de la croissance des agents pathogènes testés. La capacité de cette souche à coloniser rapidement son milieu expliquerait en partie son succès en tant qu'agent de biocontrôle. *P. oligandrum* est en effet connu pour coloniser de façon efficace aussi bien les tissus corticaux et vasculaires des racines que la rhizosphère et entrer en compétition pour les nutriments et l'espace avec la microflore endémique (Le Floch et al. 2005 ; Le Floch et al. 2007 ; Takenaka et al. 2008). L'absence de plage d'inhibition marquée lors de ces tests de confrontation en milieu gélosé est en accord avec le fait que le mycoparasitisme est une composante clef de l'antagonisme direct de *P. oligandrum* envers les agents pathogènes fongiques et les oomycètes (Benhamou et al. 2012). *F. oxysporum* Fo47 et *C. rosea* DG ont également inhibé la croissance de tous les agents pathogènes testés sans plage d'inhibition marquée. *C. rosea* DG est principalement connu pour agir par mycoparasitisme (Xue 2003a, 2003b). Fo47 est un antagoniste direct des souches pathogènes de *F. oxysporum* via des mécanismes de compétition pour les nutriments et la colonisation des racines (Couteaudier & Alabouvette 1990 ; Olivain et al. 2006). Il peut

également se montrer antagoniste d'oomycètes comme *P. ultimum* via des mécanismes d'antibiose et de mycoparasitisme (Benhamou et al. 2002). Ces trois agents de biocontrôle agissent également en stimulant la croissance et les réactions de défense de la plante hôte (Xue 2003a ; Benhamou et al. 2012 ; Aimé et al. 2013). Ces mécanismes d'action indirects nécessitent des tests en serre ou au champ pour être mis en évidence.

### 3.2 Essai en serre

Malheureusement, des difficultés techniques ont été rencontrées et n'ont pas permis d'obtenir des résultats probants. Concernant les oomycètes *A. euteiches* et *P. oligandrum*, il n'a pas été possible d'obtenir un inoculum en quantité suffisante pour inoculer toutes les modalités de l'expérimentation auxquelles ils étaient destinés. Ces modalités n'ont donc pas été exploitées. De plus, la météorologie exceptionnelle (canicules) des mois de juin et juillet 2019 n'a pas permis de maintenir les températures propices à la culture du pois et au développement des symptômes dans la serre accueillant l'expérimentation (températures supérieures à 30°C malgré le système de refroidissement). Ainsi, la sévérité des symptômes observés sur les racines de pois à la récolte s'est avérée globalement faible et non significativement différente entre les plantes inoculées avec l'agent de biocontrôle et les témoins non inoculés pour les répétitions 2 et 3 (Figure 28). Les biomasses sèches des plantes des modalités inoculées sont toutefois inférieures à celles des témoins non inoculés dans la plupart des cas, indiquant un effet non nul et négatif de l'inoculation sur la croissance de la plante hôte. L'espèce de l'agent pathogène a toutefois été réisolée de seulement 60 % des racines symptomatiques des plantes inoculées.

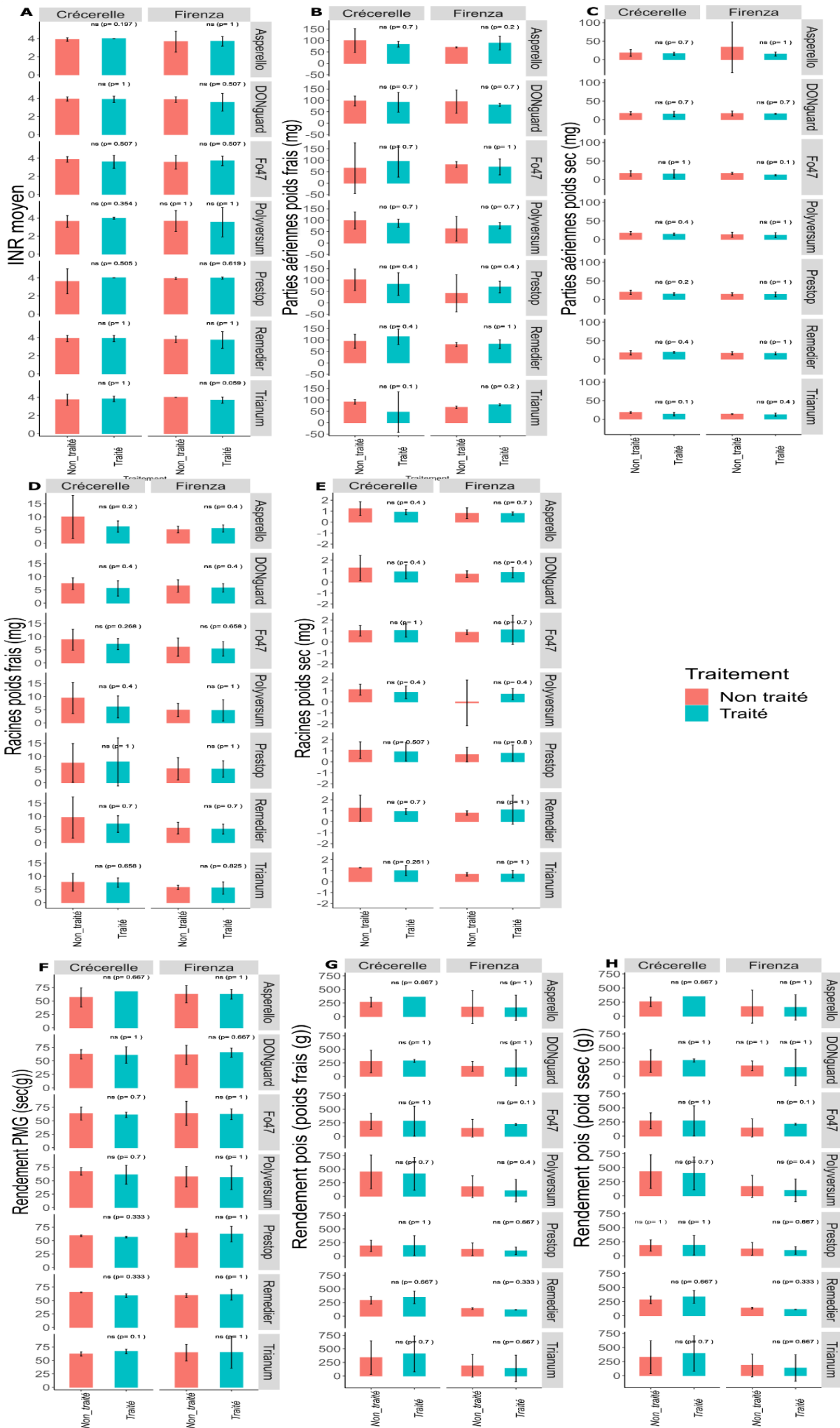


**Figure 28** : Résultats de l'essai en serre représentant la biomasse sèche de chaque modalité relativement au témoin non inoculé et les scores de pathogénicité respectivement pour la première répétition (A, B), la seconde répétition (C, D) et la troisième répétition (E, F). Les agents de biocontrôle *Fusarium oxysporum* Fo47, *Clonostachys rosea* du Donguard (DG ; Endofine SI) et *Pythium oligandrum* du Polyversum (PV) ont été testés contre les agents pathogènes *Aphanomyces euteiches* RB84, *Fusarium solani* 26a et *F. oxysporum* 8b. Les lettres noires indiquent la significativité des valeurs moyennes, une même lettre indiquant un même groupe (tests ANOVA et tests post hoc de Tukey (A, C, E) ou test de Kruskal-Wallis et tests post hoc de Wilcoxon (B, D, F),  $P < 0,05$ )

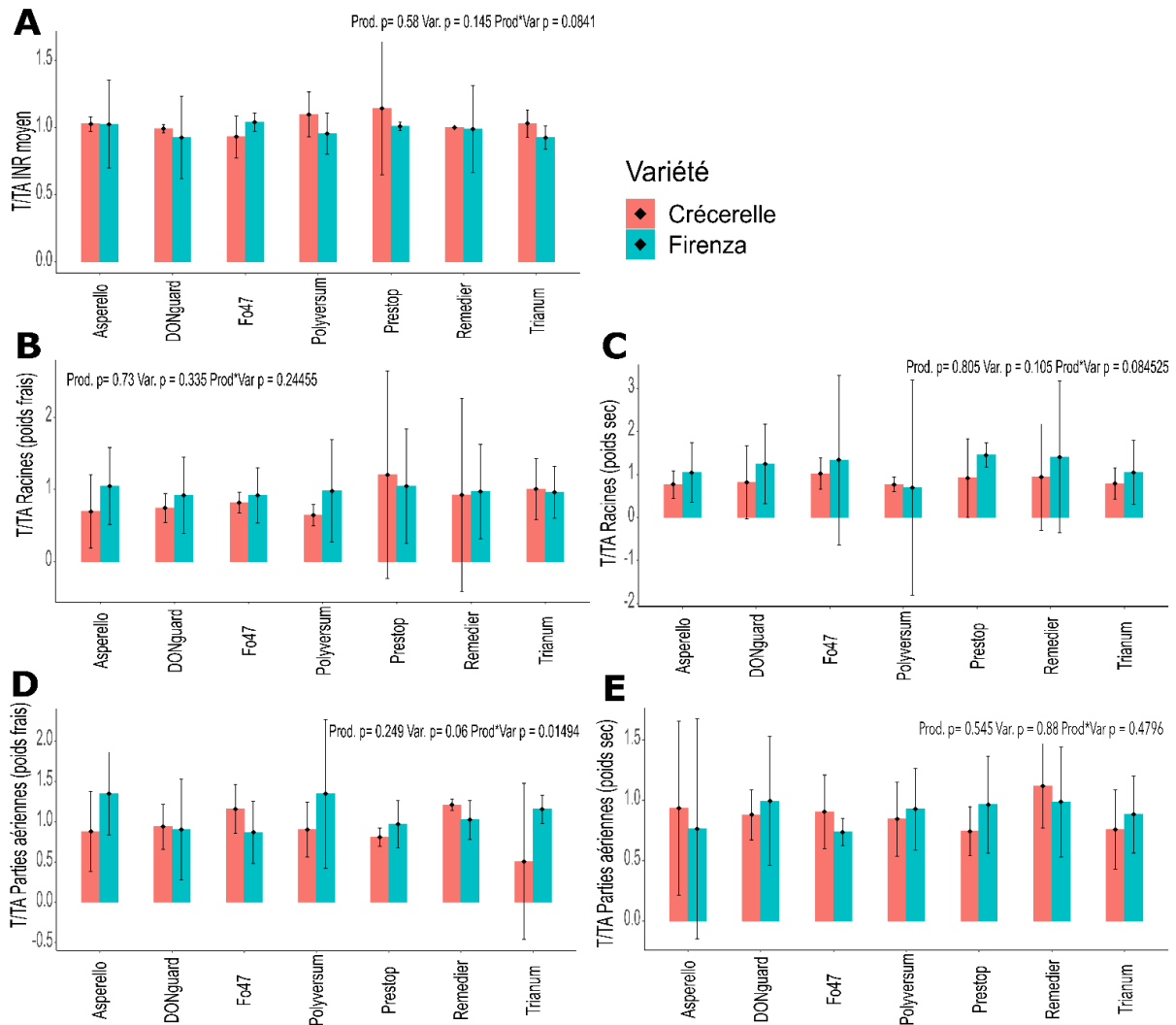


### 3.3 Essai au champ

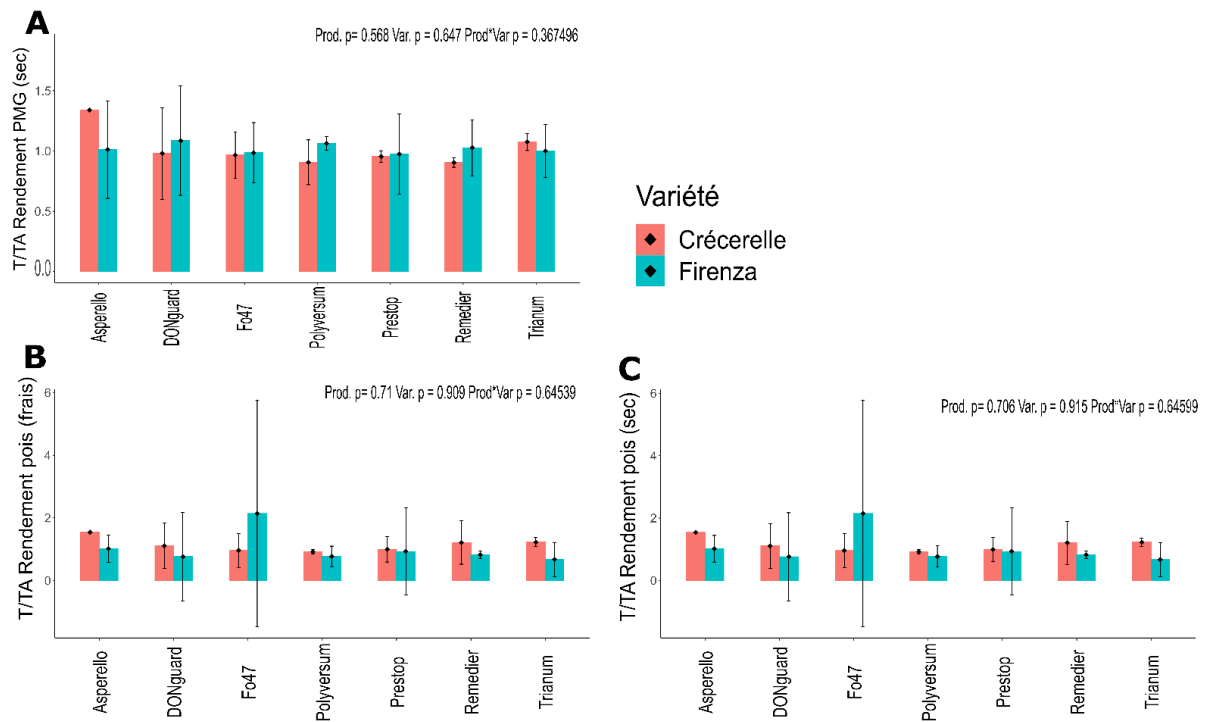
Aucun effet significatif des sept traitements n'a été observé sur toutes les mesures effectuées par rapport à leurs témoins respectifs (Figure 29). De même, aucune différence significative n'a été observée entre les différents traitements que ce soit pour les différents paramètres mesurés sur les prélèvements effectués à mi-culture (7 semaines post semis ; Figure 30) ou sur le rendement à la récolte (Figure 31). Les INR mesurés sur les plantes prélevées à mi-culture étaient globalement élevés et les rendements moyens en fin de culture très faibles (Firenza : 2,9 q/ha ; Crécerelle : 6,3 q/ha), indiquant que la pression pathogène sur la parcelle était peut-être trop importante pour mettre en évidence un effet des produits de biocontrôle. De plus, des symptômes différents de ceux causés par *A. euteiches* ont également été observés sur les prélèvements effectués. La multiplicité des agents pathogènes sur la parcelle d'étude reflétant la composition diversifiée du complexe parasitaire a peut-être été une limite à la mise en évidence d'un effet des produits de biocontrôle.



**Figure 29** : Essai au champ : comparaison directe des microparcelles traitées de chaque modalité à leurs témoins adjacents non traités pour les deux variétés de pois Crécerelle et Firenze. Les produits de biocontrôle testés sont décrits dans le tableau 1. Sont représentés l'indice nécrotique racinaire (INR) (A), le poids frais et le poids sec des parties aériennes (B, C) et des parties racinaires (D, E) des plantes prélevées à 7 semaines post-inoculation, et enfin le poids de mille grains (PMG) (F) et le rendement frais et sec en pois récolté à la fin de l'essai (G, H). Les p-values indiquées sur les graphiques sont issues de tests de Wilcoxon ; ns : non significatif.



**Figure 30** : Essai au champ : résultats des mesures effectuées à mi-culture (7 semaines post-semis) sur les demi-parcelles destinées aux prélèvements pour les deux variétés de pois Crécerelle et Firenze. Les ordonnées de chaque graphique représentent le ratio entre les valeurs obtenues pour la microparcelle traitée et son témoin adjacent non traité (T/TA) pour les valeurs d'indice nécrotique racinaire (INR) moyen (A), de poids frais et de poids sec des racines (B, C) et de poids frais et de poids sec des parties aériennes (D, E) des plantes prélevées. Les p-values représentées sur les graphiques ont été obtenues par une ANOVA à deux facteurs : produit de biocontrôle et variété de pois



**Figure 31** : Essai au champ : résultats des mesures effectuées à la récolte sur les « demi-parcelles rendements » pour les deux variétés de pois Crécerelle et Firenze. Les produits de biocontrôle testés indiqués en abscisse sont décrits dans le tableau 1. Les ordonnées de chaque graphique représentent le ratio entre les valeurs obtenues pour la microparcelle traitée et son témoin adjacent non traité (T/TA) pour le poids de mille grains (PMG) (A) et le rendement en pois frais et le rendement en pois sec (B, C). Les p-values représentées sur les graphiques ont été obtenues par une ANOVA à deux facteurs : produit de biocontrôle et variété de pois

## 4. Conclusion

Les expérimentations visant à tester des agents de biocontrôle contre les agents responsables des pourritures racinaires du pois potager ont impliqué des moyens techniques lourds à mettre en œuvre et ont malgré tout abouti à des résultats décevants. Les tests de confrontations *in vitro* sur milieu gélosé sont rapides et pratiques pour mettre en évidence les antagonismes entre agents de biocontrôle et agents pathogènes, mais restent peu informatifs sur l'efficacité réelle de l'agent de biocontrôle en présence de l'hôte. Les essais en serre sont un bon compromis pour palier à ce déficit des tests *in vitro* sur milieu gélosé. Cependant, les problèmes rencontrés lors de l'essai effectué en serre ont révélé la difficulté de travailler sur des organismes comme les oomycètes, dont l'obtention d'un inoculum viable en quantité suffisante pour ce type d'essai est délicate. Le faible développement des symptômes dû à la météorologie caniculaire exceptionnelle durant cet essai a également mis en évidence l'influence des conditions météorologiques sur l'expression du pouvoir pathogène des agents du complexe parasitaire du pois. Enfin, les essais au champ seraient les plus à même de fournir des résultats concluants quant à l'efficacité et à la faisabilité opérationnelle du contrôle biologique de la maladie via des agents microbiens en grande culture. Si les résultats de l'essai effectué se sont révélés négatifs, ils demeurent néanmoins informatifs quant aux limites du contrôle biologique des pourritures racinaires du pois via les agents testés. Ceux-ci, hormis le DONguard® et le Polyversum®, restent principalement destinés à une utilisation dans le domaine maraîcher et leur application aux grandes cultures sur des pathosystèmes différents de ceux qui ont prévalu à leur sélection et leur mise sur le marché n'est ainsi pas acquise. Des recherches centrées sur les conditions d'utilisation en grandes cultures de microorganismes antagonistes du complexe parasitaire du pois apparaissent nécessaires. Enfin, un travail de fond sur des stratégies d'application des agents de biocontrôle du complexe parasitaire visant à l'optimisation de leur colonisation et de leur maintien dans la rhizosphère du pois pourrait également être une piste envisageable pour en améliorer les effets.

Nous avons vu dans les chapitres précédents que plusieurs agents pathogènes, champignons et oomycètes, ayant des exigences écologiques différentes étaient responsables de la pourriture racinaire du pois, même si *A. euteiches* est le plus souvent incriminé (Oyarzun et al. 1993 ; Chatterton et al. 2019 ; Gibert et al. 2021a, 2021b). L'expression de l'activité pathogène de ces champignons et oomycètes est dépendante des conditions pédoclimatiques

et de la phénologie (physiologie) du pois. Il est donc difficile d'imaginer qu'un agent de lutte biologique seul, puisse contrôler plusieurs agents pathogènes différents durant toute la saison de culture et indépendamment de l'adversité climatique, *a fortiori* si cet agent n'a pas été sélectionné à partir de situations extrêmes au champ.

Pour tenter de proposer une solution de biocontrôle de ce complexe parasitaire, deux stratégies peuvent être envisagées. Elles ne sont pas antinomiques. La première reposerait sur la recherche non pas d'un agent de lutte biologique mais d'un consortium d'agents de biocontrôle, compatibles, capables de s'adapter à un panel de conditions environnementales grâce à la complémentarité de leurs exigences écologiques de telle sorte que l'une ou l'autre au moins des composantes de ce consortium puisse contrôler celles du complexe parasitaire quand elles s'expriment durant la culture du pois en grande culture. Un travail de recherche est nécessaire pour imaginer comment isoler, sélectionner, produire, formuler et ré-introduire ce consortium d'agents de biocontrôle dans le sol avant le semis du pois tout en tenant compte également des contraintes de la réglementation (Alabouvette et al. 2016). La seconde alternative est plus conservatoire et concerne la stimulation de la microflore indigène du sol. Elle repose sur les concepts de résistance des sols à des maladies d'origine tellurique, concepts partiellement expliqués par le rôle du microbiome dans la résistance du sol pour ce qui est des fusarioses vasculaires (Alabouvette 1999 ; Siegel-Hertz et al. 2018 ; Steinberg et al. 2019), du piétin échaudage du blé (Thomashow & Weller 1990 ; Palma-Guerrero et al. 2021) ou de la fonte de semis de betterave (Mendes et al. 2011) mais pour ces maladies, l'agent responsable est très souvent mono-spécifique et non pas un complexe parasitaire. La distribution en foyers de la pourriture racinaire du pois, tout comme le fait qu'il y ait des potentiels infectieux, au sens de Moussart et al. (Moussart et al. 2009 ; Crosson & Moussart 2011) variables d'une parcelle à l'autre permettent de supposer que le microbiote peut, là aussi, dans certaines conditions, contrôler les agents pathogènes responsables de la maladie. Cette notion de sols résistants à la pourriture racinaire du pois a été évoquée en Suède à la fin du siècle dernier (Persson et al. 1999 ; Persson & Olsson 2000) mais n'a pas été suffisamment exploitée pour mettre en évidence le rôle du microbiome, pour détecter des taxons ou caractériser des fonctions microbiennes susceptibles de contrôler la maladie (Daguerre et al. 2017). Un travail de recherche sur la base d'approches comparatives et d'outils moléculaires comme la métatranscriptomique est nécessaire pour identifier les groupes fonctionnels, qui au sein du

rhizobiome du pois, pourront contrôler l'activité des agents pathogènes tout en favorisant celle de bactéries symbiotiques et plus globalement favoriseront la croissance du pois. La rhizosphère est le théâtre d'interactions microbiennes déterminantes pour la plante et c'est à ce niveau qu'il faut pouvoir intervenir (Raaijmakers et al. 2009). Dans une approche agroécologique, ce sont des pratiques culturales appropriées comme le choix et le mélange de variétés, le semis direct, l'utilisation de couverts végétaux choisis, l'association de cultures complémentaires, qui doivent permettre de trouver la combinaison qui stimulera les groupes fonctionnels contrôlant l'activité du complexe parasitaire.

## CHAPITRE VI

Discussion générale et perspectives





Les pourritures racinaires du pois potager sont des maladies particulièrement préoccupantes pour les producteurs et l'industrie de transformation légumière française. Les professionnels du secteur sont en attente de solutions concrètes permettant de contrôler au mieux ces maladies afin de limiter l'impact économique qu'elles engendrent pour toute la filière. Dans le cadre de mon travail de thèse, j'ai tenté de contribuer, par des recherches à visée appliquée, à améliorer nos connaissances du complexe parasitaire responsable des pourritures racinaires du pois et à développer des méthodes permettant de contrôler les agents pathogènes impliqués.

Les solutions de lutte sont effectivement peu nombreuses à l'heure actuelle, et bien souvent peu optimales pour faire face à ces maladies d'origine tellurique dont l'inoculum est largement répandu dans les sols de parcelles agricoles. La diversité des agents pathogènes impliqués, révélée par le travail bibliographique effectué en amont de cette étude (Introduction, Annexe 1), explique en partie la complexité de la lutte contre ces maladies dont les agents causaux sont multiples. Cette importante diversité taxonomique cache des caractéristiques physiologiques, écologiques et pathogéniques variées qui réduisent le champ des possibles pour contrôler la maladie. Les exigences écologiques nécessaires à l'expression de l'activité infectieuse de chacun des agents pathogènes recouvrent une large gamme de conditions pédoclimatiques dans lesquelles ils peuvent l'exprimer. Cependant, des solutions de contrôle n'ont jusqu'à présent été recherchées que pour lutter contre l'un ou l'autre de ces agents pathogènes de façon indépendante. Le premier axe de ma thèse (Chapitres I et II) a ainsi été dédié au contrôle d'*Aphanomyces euteiches*, considéré comme la principale menace en France. Ce travail a consisté à améliorer la prédiction du risque lié à cet agent pathogène, afin de fournir à la profession un outil fiable d'aide à la décision dans le cadre d'une lutte basée sur l'évitement des parcelles infestées via des rotations culturales. Au-delà d'*A. euteiches*, la composition du complexe parasitaire du pois n'avait encore jamais fait l'objet de recherches en France. Pourtant, des symptômes attribuables à d'autres agents pathogènes qu'*A. euteiches*, notamment ceux du pied noir, sont souvent observés dans les champs de pois et peuvent être très problématiques pour les producteurs. Le deuxième axe de ma thèse (Chapitres III et IV) a donc porté sur la caractérisation du complexe parasitaire du pois potager responsable de pourritures racinaires en France. Ce travail a été effectué via des isollements microbiologiques de champignons et d'oomycètes de racines de pois symptomatiques et par

le test de leur pouvoir pathogène sur pois (Chapitre III). Une analyse comparative de la diversité des champignons et des oomycètes endophytes et rhizosphériques de pois sains et malades a également été initiée via une approche moléculaire de metabarcoding (Chapitre IV). Cependant, des problèmes techniques rencontrés lors du séquençage par la plateforme prestataire n'ont pas permis d'intégrer les résultats, qui sont toujours en attente, dans ce manuscrit. Enfin, le troisième axe de ma thèse a porté sur le biocontrôle de la maladie (Chapitre V). La démarche de ce travail a consisté à rechercher parmi des produits de biocontrôle homologués en France, ou en cours de développement, ceux ayant des activités de bio-protection des plantes contre les espèces composant le complexe parasitaire mais utilisés dans d'autres pathosystèmes. Leur efficacité pour lutter contre les agents pathogènes du complexe parasitaire du pois a été testée *in vitro*, en serre et au champ.

Jusqu'à présent, *A. euteiches* était considéré en France comme la principale cause de pourritures racinaires du pois (Wicker et al. 2001 ; Le May et al. 2018 ; Quillévéré-Hamard et al. 2018). Son émergence depuis les années 1990, liée à l'augmentation de la fréquence des cultures de pois dans les rotations culturales, n'a pas épargné le pois potager (Didelot & Chaillet 1995). La seule solution de lutte utilisée contre cet oomycète consiste actuellement à effectuer des rotations culturales de longues durées privilégiant les espèces non hôtes ou des variétés résistantes de vesce ou de féverole. Un outil prédictif de gestion du risque d'apparition de la maladie, basé sur des bio-essais consistant à faire pousser une plante d'une variété sensible de pois dans du sol collecté en parcelle a été mis au point afin d'identifier les parcelles permettant la culture du pois et d'optimiser le temps de rotation entre espèces sensibles (Moussart et al. 2009). Cependant, les acteurs du secteur ayant adopté ce test ont souvent constaté que sa faible reproductibilité altère la prédiction et conduit à semer quand il ne le fallait pas ou à l'inverse, à ne pas semer quand cela aurait été possible.

Dans ce contexte, la finalité de mes recherches était de développer un nouvel outil d'aide à la décision permettant de prédire le risque de pourritures racinaires en amont de la culture, de manière fiable et reproductible. Cet outil, destiné initialement au Groupe Bonduelle, pourra être utilisé par tous les producteurs de pois. Pour cela, la première partie de mes travaux de thèse ont été orientés vers deux objectifs principaux : i) mettre au point un outil de quantification moléculaire de l'inoculum d'*A. euteiches* dans les sols (Chapitre I) et ii)

définir une stratégie d'échantillonnage du sol adaptée à la distribution hétérogène de cet agent pathogène dans les sols de parcelles agricoles (Chapitre II). Ces deux objectifs sont des éléments clefs à mettre en œuvre à l'avenir dans la gestion du risque des pourritures racinaires du pois (Gossen et al. 2017).

Mes travaux visant à la quantification de l'inoculum d'*A. euteiches* ont initialement été basés sur l'utilisation de la PCR quantitative en temps réel (qPCR), qui est un outil moléculaire conventionnellement utilisé pour quantifier des microorganismes dans l'environnement (Edel-Hermann et al. 2011 ; Pollard & Okubara 2019 ; Lin et al. 2021). J'ai entrepris ce travail avec un jeu d'amorces ciblant de manière spécifique la région internal transcribed spacer (ITS) 1 d'*A. euteiches*, et qui avaient été testées avec succès sur des ADN de sols artificiellement inoculés en oospores (Gangneux et al. 2014). Malgré plusieurs mois de développement, les résultats obtenus par qPCR à partir d'ADN de sols de parcelles agricoles naturellement infestées par *A. euteiches* sont apparus peu reproductibles. Ce travail préliminaire a néanmoins mis en évidence le seuil de détection insuffisant de la qPCR (> 10 oospores/g de sol) et sa sensibilité aux inhibitions induites par des contaminants extraits du sol avec les ADN (acides humiques, composés phénoliques, argiles, etc) par rapport à la capacité d'*A. euteiches* à induire des symptômes à des densités d'inoculum très faibles (<10 oospores/g de sol) et à sa répartition hétérogène à l'échelle du gramme de sol. Des chercheurs suédois, et plus récemment canadiens, ont fait un constat similaire. Ils se sont heurtés au problème du seuil de détection insuffisant de la qPCR en recherchant un outil prédictif basé sur la quantification moléculaire de l'inoculum d'*A. euteiches* dans les sols plus précis que les tests en serres (Heyman 2008 ; Safarieskandari 2019). Je me suis alors investi dans le développement d'une méthode de quantification alternative à la qPCR, la PCR digitale (droplet digitale PCR, ddPCR). Cette méthode innovante a initialement été développée dans le domaine médical mais est encore peu utilisée en phytopathologie. Elle présente l'avantage d'être très sensible et permet donc de détecter des cibles d'ADN rares (Hindson et al. 2011). De plus, elle est moins sujette aux inhibitions d'amplification que la qPCR (Wood et al. 2019).

Ce développement méthodologique a nécessité un travail portant sur (i) l'optimisation de la méthode d'extraction d'ADN de sol, notamment la quantité de sol à utiliser et son homogénéisation, (ii) la mise au point des conditions de ddPCR, et enfin (iii) la validation de

l'outil avec 200 échantillons de sols provenant de quatre parcelles naturellement infestées par *A. euteiches*.

Les résultats de cette étude ont démontré la validité de la méthode développée pour quantifier de manière précise et reproductible l'inoculum d'*A. euteiches* dans les sols agricoles naturellement infestés. Deux séquences ont été ciblées, une partie de la séquence multicopie ITS1 et une séquence unique, à l'aide d'amorces spécifiques d'*A. euteiches* (Gangneux et al., 2014; Sauvage et al., 2007) et de sondes d'hydrolyse TaqMan spécifiques utilisées en duplex. Ces cibles ont été détectées et quantifiées conjointement avec succès à partir d'ADN génomique d'*A. euteiches*. La ddPCR a présenté une sensibilité suffisante pour quantifier de façon reproductible la cible multicopie ITS1 à partir d'ADN extraits de sols naturellement infestés. Contrairement à la qPCR, la ddPCR s'est révélée peu sensible aux inhibitions dues aux composés extraits du sol avec les ADN. Cette faible sensibilité aux inhibitions, due en grande partie à la compartimentation des réactions de PCR au sein des gouttelettes et à la lecture de l'amplification en point final, a permis d'utiliser une quantité d'ADN suffisante (200 ng par réaction) pour obtenir une mesure reproductible du nombre de cibles ITS1. Les résultats ont démontré que cette quantification reproductible n'est possible qu'à partir d'ADN extraits d'une quantité de sol suffisante (2 g) et convenablement homogénéisée par broyage. La séquence unique, si elle a pu être détectée, s'est cependant avérée trop peu fréquente pour pouvoir être quantifiée de façon reproductible dans les échantillons présentant des densités d'inoculum trop faibles. Sa quantification dans l'ensemble des échantillons de chaque parcelle a néanmoins permis de déterminer le nombre de copies d'ITS1 présentes en moyenne dans le génome haploïde des populations d'*A. euteiches* de chacune des parcelles étudiées. La relation entre les quantifications de ces deux cibles a permis de corriger le nombre de copies d'ITS1 détectées dans les échantillons de sol naturellement infestés pour estimer le nombre de génomes diploïdes d'*A. euteiches* par gramme de sol. Ce nombre est une estimation plus fidèle du nombre d'oospores diploïdes qui sont à la fois l'organe infectieux et l'organe de persistance de cet oomycète dans les sols.

Au-delà de la validité technique, les résultats ont confirmé le caractère prédictif de la mesure. Celui-ci a été vérifié par la mise en évidence d'une relation significative entre la sévérité des symptômes estimée lors des tests de potentiel nécrotique racinaire (PNR) et la densité d'inoculum (DI) d'échantillons de sols provenant de quatre parcelles naturellement

infestées par *A. euteiches*. Sur la base de cette relation, un modèle prédictif a été proposé pour prédire la gravité de la maladie à partir de la DI. Ce modèle prédictif apparaît probant en considérant les DI extrêmement faibles d'*A. euteiches* qui ont été utilisées pour l'analyse et la répartition très hétérogène de l'agent pathogène dans les sols naturellement infestés. Il a confirmé la capacité d'*A. euteiches* à induire des symptômes à partir de DI très faibles. Ainsi, une DI inférieure à 5 génomes diploïdes par gramme de sol (soit 5 oospores d'*A. euteiches*), apparaît suffisante pour dépasser un PNR de 1, correspondant au seuil au-delà duquel la culture est déconseillée en France. Ce niveau est cohérent avec les modèles précédemment établis à partir de sols artificiellement inoculés en oospores (Persson et al. 1999 ; Sauvage et al. 2007 ; Gangneux et al. 2014).

L'intervalle de confiance sur les prédictions de PNR est également acceptable pour un modèle construit avec des données issues d'échantillons de terrain. Ainsi, lors des tests de PNR effectués, seules les conditions climatiques ont été standardisées de façon à ce que la maladie s'exprime de façon optimale (Moussart et al. 2009). Des différences d'agressivité entre les populations d'*A. euteiches* de chaque parcelle ont également été écartées par des tests de pathogénicité d'isolats sur pois. Par ailleurs, chaque échantillon de sol est porteur d'une information de nature biotique et abiotique modulée par des interventions anthropiques (pratiques et historiques culturaux), propres à la parcelle dont il provient. Tous les paramètres biotiques et abiotiques associés aux échantillons de sol testés ne sont pas connus à l'avance et pourraient jouer un rôle régulateur de l'expression pathogène de l'inoculum d'*A. euteiches*. Des sols avec des niveaux variables d'expression de l'activité pathogène d'*A. euteiches* ont ainsi déjà été décrits lors de précédentes études (Oyarzun et al. 1997; Persson et al. 1999). Un niveau variable de réceptivité des sols analysés dans notre étude pourrait expliquer, au moins en partie, les effets propres à chaque parcelle, modulant la relation entre la densité d'inoculum et la sévérité de la maladie, révélés par le modèle construit. Des paramètres physico-chimiques pourraient également expliquer en partie ces différences. Certains paramètres édaphiques comme les ions  $Fe^{2+}$  ou le pH peuvent en effet être corrélés à la présence d'*A. euteiches* et d'autres paramètres comme le  $Ca^{2+}$  ou le  $K^+$  sont associés à la résistance de certains sols à la maladie (Heyman 2007 ; Persson 1998 ; Zitnick-Anderson et al. 2020a). D'autre part, la microflore du sol pourrait également être à l'origine de ces effets propres aux parcelles. Son rôle dans la régulation du développement et de l'expression pathogène des agents phytopathogènes telluriques via des mécanismes de

compétition, d'antibiose ou d'antagonisme vis-à-vis des agents pathogènes, ou bien de promotion de la croissance ou d'induction des réactions de défense de la plante hôte est très bien documenté (Garbeva et al. 2004 ; Alabouvette et al. 2009 ; Raaijmakers et al. 2009 ; Anees et al. 2010b ; Köhl et al. 2019 ; Steinberg et al. 2019). La microflore est notamment connue pour varier entre les zones saines et les zones où les pourritures racinaires se développent dans les champs de pois, suggérant qu'elle interagit avec le développement de la maladie (Xu et al. 2012a, 2012b ; Taheri et al. 2017a ; Chatterton et al. 2021). La présence d'autres agents pathogènes d'un même complexe parasitaire peut d'ailleurs avoir des effets antagonistes ou synergiques, modulant ainsi la sévérité de la maladie (Lamichhane & Venturi, 2015 ; Le May et al. 2009 ; Sagar & Sugha, 1997). Des effets synergiques ont notamment été constatés entre *A. euteiches* et des champignons du genre *Fusarium* non pathogènes ou pathogènes appartenant au complexe parasitaire du pois (Peters & Grau 2002 ; Willsey et al. 2017). La présence dans chacune des parcelles échantillonnées de plusieurs espèces de *Pythium*, notamment *P. terrestris*, provoquant des symptômes de pourritures racinaires proches de ceux causés par *A. euteiches*, pourrait ainsi être à l'origine de ce type d'effet.

Dans tous les cas, la prise en compte des paramètres environnementaux propres aux conditions de terrain dans le modèle développé valide l'utilisation, précédemment établie en sols inoculés, de l'inoculum naturel d'*A. euteiches* comme un bon indicateur du risque pour la culture de pois (Persson et al. 1999 ; Janvier et al. 2007 ; Sauvage et al. 2007 ; Gangneux et al. 2014). Ce modèle valide également la qualité de la méthode d'analyse développée et des mesures effectuées par ddPCR, ainsi que la pertinence d'utiliser cette technologie pour quantifier des cibles rares dans les sols naturellement infestés. L'outil développé présenté dans le Chapitre I apparaît ainsi comme une alternative très prometteuse aux tests PNR actuellement utilisés par la profession.

Suite à la validation de l'outil de quantification moléculaire de l'inoculum d'*A. euteiches* dans les sols de parcelles infestées, un travail statistique visant à définir une stratégie d'échantillonnage de sol adaptée à la distribution hétérogène de cet agent pathogène dans les sols de parcelles agricoles a été réalisé. Si les stratégies d'échantillonnage des plantes ou des adventices à la surface des parcelles agricoles ont fait l'objet de nombreuses études aboutissant à la proposition de modèles de distribution spatiale des espèces concernées (Bonneau et al. 2016 ; Somerville et al. 2020), les stratégies d'échantillonnage de sol pour

quantifier l'inoculum d'agents phytopathogènes telluriques par des méthodes moléculaires sont encore rares. Certes, de nombreuses études relatives au prélèvement et au traitement des échantillons de sol ont été publiées (Penton et al. 2016 ; Castle et al. 2019 ; Waymouth et al. 2020). Cependant aucune concernant la distribution des agents pathogènes dans le sol n'a abouti à la proposition de stratégies robustes d'échantillonnage à l'échelle de la parcelle, même si leur intérêt est toujours mis en avant (Ophel-Keller et al. 2008 ; Poole et al. 2015). L'obtention d'une mesure représentative d'une surface de sol donnée constitue pourtant un aspect primordial dans l'élaboration d'un modèle prédictif pour la gestion du risque pour la culture qui leur est associée. A cette fin, la détermination de la structuration de l'inoculum dans les parcelles est la première étape à réaliser (Moussart et al. 2009 ; Annes et al. 2010a ). L'utilisation d'outils géostatistiques déjà utilisés pour déterminer la structuration des populations microbiennes du sol à différentes échelles à partir d'échantillons d'ADN, apparaît comme une approche particulièrement intéressante (Constancias et al. 2015 ; Dunn et al. 2021). De récents travaux ont par exemple utilisé ces outils pour analyser des données issues de la quantification par qPCR de l'inoculum de *Plasmodiophora brassicae* afin d'établir sa structuration dans des parcelles infestées (Botero-Ramirez et al. 2021). Le besoin de stratégies d'échantillonnage robustes pour quantifier les agents phytopathogènes telluriques est réel et souligné par de nombreux auteurs (Ophel-Keller et al. 2008; Moussart et al. 2009; Wallenhammar et al. 2012; Gangneux et al. 2014; Gossen et al. 2016; Botero-Ramirez, et al. 2021).

Mon travail a été réalisé à la fois avec les mesures de DI et les mesures de PNR afin de laisser le choix aux futurs usagers d'utiliser la technique de quantification moléculaire développée ou les tests classiques basés sur les bio-essais. A partir de ces données spatialisées, mesurées sur des échantillons de sol de manière systématique selon une grille régulière, la démarche a consisté à i) déterminer de manière statistique, sans prise en compte de la structuration spatiale, le nombre théorique d'échantillons nécessaires à l'obtention d'une valeur moyenne à une précision souhaitée, ii) caractériser, par une analyse variographique, la structuration spatiale de la DI et du PNR du sol dans les parcelles infestées et iii) définir, par une analyse comparative de différentes stratégies d'échantillonnage établies par des simulations, une stratégie d'échantillonnage et un nombre d'échantillons appropriés pour obtenir une valeur moyenne de la parcelle pour la DI et pour le PNR.



Les résultats des simulations ont été cohérents avec la structuration spatiale de l'inoculum d'*A. euteiches* sous forme de foyers infectieux de densités et de tailles variables dans les parcelles infestées. L'inoculum de cet agent parasitaire est apparu distribué de manière agrégative sur des distances allant de 20 m à 82 m suivant la parcelle analysée. Ce résultat, le premier basé sur une quantification directe de l'inoculum d'*A. euteiches*, confirme l'existence de foyers de pourritures racinaires d'environ 800 m<sup>2</sup> à 1600 m<sup>2</sup> précédemment décrits en France (Moussart et al. 2009). Ce type de structuration agrégative est courant chez les organismes dont la dynamique infectieuse est de nature polycyclique (Campbell & Noe 1985 ; Bailey & Gilligan 1999 ; Ristaino & Gumpertz 2000 ; Willocquet et al. 2007 ; Wallenhammar et al. 2012). Cependant, d'autres facteurs, comme des caractéristiques biotiques et abiotiques du sol, la fréquence et la densité de culture de l'hôte ou encore certaines pratiques culturales impliquant le transport involontaire de sol sont susceptibles de jouer un rôle dans cette structuration (Campbell & Noe 1985 ; Wallenhammar 1996 ; Cao et al. 2009).

Dans nos résultats, les parcelles présentant le niveau d'infestation le plus faible sont celles où les foyers infectieux, de plus petites tailles, sont apparus les plus structurés. Une variance importante des valeurs de DI et du PNR a été constatée sur ces parcelles particulièrement hétérogènes, résultant en un nombre d'échantillons à prélever (estimé de manière théorique) très important.

Différentes stratégies d'échantillonnage (échantillonnage aléatoire simple (EAS) ou systématique suivant un tracé en diagonale, en losange, en W, en W tête-bêche ou en X) ont été testées sur des données générées par krigeages des quatre parcelles échantillonnées puis sur 100 simulations de parcelles infestées. L'analyse comparative de ces différentes stratégies d'échantillonnage a mis en évidence qu'un échantillonnage systématique suivant un tracé en W tête-bêche permet d'estimer la DI moyenne et le PNR moyen d'une parcelle de manière significativement plus précise qu'un EAS ou qu'un échantillonnage selon un tracé en diagonale comme actuellement pratiqué par la profession. Nos résultats invitent ainsi à reconsidérer la stratégie d'échantillonnage du sol actuellement utilisée par les producteurs de pois pour effectuer les tests de PNR. La conclusion de notre étude est soutenue par diverses études qui avait déjà pointé les lacunes de l'échantillonnage en diagonale comparativement à d'autres

tracés en cas d'agrégation spatiale de l'inoculum (Delp et al. 1986 ; Mihail & Alcorn 1987 ; Wallenhammar et al. 2012).

De façon concrète, la stratégie d'échantillonnage en W tête-bêche proposée consistera à prélever à intervalles réguliers, 46 échantillons de sol pour estimer la DI moyenne d'une parcelle d'une taille inférieure ou égale à 12 ha ou 20 échantillons de sol pour estimer son PNR moyen en s'accordant une erreur relative de 5% en moyenne. Cette collecte d'échantillons devra en outre être réalisée dans des conditions similaires à celles utilisées dans notre étude. Cela comprend des prélèvements de sol effectués entre 10 et 30 cm de profondeur, zone de persistance de l'inoculum d'*A. euteiches* et de développement des racines du pois (Moussart et al. 2009 ; Voisin et al. 2002). Pour la mesure de la DI, basée sur la quantification de séquences nucléotidiques spécifiques d'*A. euteiches*, la collecte devra être réalisée plusieurs mois après la culture du dernier hôte sensible sur la parcelle, afin d'éviter le plus possible de quantifier du mycélium d'*A. euteiches* ou de l'ADN libre issu de cellules mortes persistant dans le sol et à même de fausser le caractère prédictif de la mesure.

Finalement, les connaissances acquises et les verrous techniques levés dans le cadre des travaux présentés dans les Chapitres I et II permettent d'envisager une utilisation routinière de l'outil de prédiction développé pour le Groupe Bonduelle et les producteurs de pois. Par exemple, un dispositif basé sur ces mêmes outils (stratégie d'échantillonnage représentative, méthode d'extraction d'ADN de sol et outil de quantification de l'inoculum prédictif de la maladie) est utilisé en routine depuis plusieurs années en Australie pour la prédiction du risque lié à plusieurs agents pathogènes dans les cultures de céréales (Ophel-Keller et al. 2008 ; Poole et al. 2015). Dans le cas des pourritures racinaires causées par *A. euteiches*, des limites restent encore à lever concernant la viabilité économique et la validation opérationnelle d'un tel processus d'analyse à grande échelle.

Une collaboration a été engagée en ce sens avec l'entreprise I.A.G.E. (Ingénierie et Analyses en Génétique Environnementale - SAS, Montpellier, France) qui dispose de capacités d'analyse d'échantillons environnementaux par ddPCR. L'objectif de cette collaboration est de valider en conditions d'application à grande échelle, l'outil de quantification de l'inoculum d'*A. euteiches* en diminuant le nombre d'analyses à réaliser par parcelle testée. Pour cela, il est envisagé d'estimer la DI moyenne d'une parcelle à partir de mesures effectuées sur un échantillon de sol composite, constitué par le « pool » des échantillons prélevés en parcelle

(de volumes identiques) selon la stratégie en W tête-bêche proposée, plutôt que par la moyenne des mesures de DI effectuées sur tous ces échantillons de manière séparée. Cela implique une capacité d'homogénéisation des échantillons de sol suffisante pour que l'ADN extrait du pool soit représentatif de celui de la parcelle. L'obtention d'une valeur moyenne de DI ne nécessiterait alors qu'un nombre de mesures limité au nombre de pools effectués et au nombre de répétitions techniques de la mesure. La baisse substantielle du nombre d'analyses permettrait de diminuer les coûts liés à la main d'œuvre et aux réactifs nécessaires aux analyses pour s'approcher de celui des bio-essais actuellement en vigueur. Une fois cette étape franchie, il est envisagé de valider de façon définitive le processus analytique sur de nouvelles parcelles destinées à la culture du pois. Après validation, l'outil pourra être utilisé en routine afin de prédire le risque de pourritures racinaires du pois dans le bassin de production du Nord de la France. Il pourrait également s'appliquer à la prédiction du risque d'autres maladies causées par des agents pathogènes vivant tout ou partie de leur cycle dans le sol.

Au-delà des débouchés appliqués, la technique de quantification de l'inoculum d'*A. euteiches* dans les sols naturellement infestés permettra d'étudier avec précision l'épidémiologie de cet agent pathogène. Elle permettra notamment de quantifier finement l'impact des paramètres pédoclimatiques et anthropiques sur la structuration de son inoculum dans les sols. Elle permettra également, couplée avec des mesures de sévérité de la maladie, de déterminer l'effet de ces paramètres sur le développement de cet agent parasitaire et sur l'expression de son potentiel infectieux. La prise en compte de certains paramètres édaphiques peut notamment permettre d'affiner la prédiction de modèles centrés sur la quantification moléculaire de l'inoculum (Poole et al. 2015), ce qui constitue une piste d'amélioration de notre modèle prédictif.

L'amélioration de la prédiction du risque pour la culture pourrait également passer par la quantification de manière conjointe de l'ensemble des champignons et oomycètes du complexe parasitaire responsable de pourritures racinaires du pois. A cet effet, une perspective technique consisterait à utiliser la ddPCR en multiplexant différents sets d'amorces et sondes, chacun spécifique de l'un des agents pathogènes du complexe parasitaire afin de les quantifier de façon conjuguée. Ce type de dispositif a l'avantage de réduire le nombre d'analyses nécessaires et donc d'augmenter la rentabilité du processus

(Lievens & Thomma 2007). Cela impliquerait toutefois le développement de nouveaux équipements de ddPCR pourvus de plus de canaux analytiques que les deux existant actuellement (Digital Droplet PCR Application Guide, BioRad). Certains systèmes de PCR digitale, comme le Six-color Crystal Digital PCR™ (Stilla Technologies, France) proposent déjà jusqu'à six couleurs différentes, laissant envisager la réalisation de ce type d'analyse dans un futur proche (Madic et al. 2016 ; Madic et al. 2018). Les amorces spécifiques nécessaires pour détecter les principaux agents pathogènes, notamment certaines espèces de *Fusarium*, sont déjà disponibles et une telle approche multiplexe par qPCR à partir d'ADN de racines de pois symptomatiques a déjà été utilisée (Willsey et al. 2017 ; Zitnick-Anderson et al. 2018 ; Chatterton et al. 2019). Cependant, contrairement à *A. euteiches*, les espèces *F. oxysporum*, *F. redolens* et *F. solani* comprennent des souches non pathogènes ou aux niveaux d'agressivité très variables sur pois (Persson et al. 1997 ; Skovgaard et al. 2002; Taheri et al. 2011 ; Chittam et al. 2015 ; Šišić et al. 2018b ; Jenkins et al. 2021 ; Gibert et al. 2021b). Les *loci* conservés au cours de l'évolution tels que la région ITS ou le gène codant le facteur d'élongation 1- $\alpha$  (*TEF1*), sont le plus souvent utilisés pour l'identification de ces espèces mais ne permettent pas de différencier les souches pathogènes des souches non pathogènes (Okubara et al. 2013). Cela peut conduire à une absence de corrélation entre la DI de l'agent pathogène et la sévérité des symptômes observés sur la culture. L'identification de marqueurs spécifiques des souches pathogènes serait ainsi un axe de recherche à explorer. Les gènes codant pour les facteurs de virulence, comme par exemple certains gènes « Secreted In Xylem » (*SIX*) chez *F. oxysporum* ou les gènes « Pea Pathogenicity » (*PDA1*, *PEP1-PEP5*) chez *F. solani* seraient des candidats potentiels (Does et al. 2008 ; Coleman 2016 ; Rocha et al. 2016 ; Jenkins et al. 2021). Le gène *PEP3* a d'ailleurs déjà été utilisé pour quantifier l'inoculum de *F. solani* f. sp. *pisi* dans des sols inoculés en conidies (Etebu & Osborn 2010). Cependant, au-delà de la détection spécifique des souches pathogènes, la relation entre la DI et la sévérité des symptômes dans la culture est également affectée par les différents paramètres environnementaux. Ainsi, des travaux effectués au Canada sur la prédiction du risque de pourritures dues à *F. solani* et *F. avenaceum* par qPCR ont montré la difficulté d'établir cette relation en conditions de terrain pour ces espèces (Safarieskandari, 2019).

Les travaux portant sur la prédiction du risque lié aux différents agents pathogènes du complexe parasitaire du pois ainsi que sur les stratégies de contrôle à mettre en place, ne sont envisageables qu'en ayant une parfaite connaissance non seulement de la composition de ce complexe, mais aussi et de l'importance relative à un temps donné durant la culture, de chacune des espèces impliquées dans la sévérité des symptômes observés dans les champs. Ces deux aspects sont en effet variables suivant les zones géographiques (Wille et al. 2019). Ils dépendent de facteurs pédoclimatiques ainsi que de la présence et de l'abondance relative d'un inoculum pathogène. Ces dernières peuvent être régulées par la fréquence des espèces hôtes dans les rotations, que ce soit dans les cultures, les couverts végétaux ou les paillis (Moussart et al. 2013 ; Šišić et al. 2018b). Des démarches de caractérisation du complexe parasitaire ont été engagées dans des zones importantes de production de légumineuses et de pois, comme aux Etats Unis et au Canada (Feng et al. 2010 ; Taheri et al. 2011 ; Chittem et al. 2015 ; Gossen et al. 2016 ; Zitnick-Anderson & Pasche 2016 ; Taheri et al. 2017a, 2017b ; Wu et al. 2018 ; Chatterton et al. 2019 ; Zitnick-Anderson et al. 2020b) et dans le centre et le nord de l'Europe, notamment en Suède, au Danemark et aux Pays-Bas (Oyarzun & Loon 1989 ; Oyarzun et al. 1993 ; Persson et al. 1997), ainsi qu'en Allemagne (Bacanovic-Šišić et al. 2018b ; Šišić et al. 2020) et au Royaume-Uni (Clarkson 1978 ; Jenkins 2018). Etonnamment, la composition du complexe parasitaire responsable de pourritures racinaires chez le pois n'a jamais été étudiée en France où la maladie est classiquement et systématiquement imputée à *A. euteiches*.

Dans ce contexte, les objectifs des démarches engagées dans les Chapitres III et IV étaient de caractériser la composition du complexe parasitaire responsable de pourritures racinaires du pois potager dans le nord de la France et de déterminer l'évolution de sa composition au cours d'une saison culturale. Pour cela, deux campagnes d'échantillonnage ont été effectuées. La première, réalisée en 2017, a consisté à prélever des plantes saines et symptomatiques au stade floraison/maturation des graines dans 22 parcelles de pois potager où la présence de pourritures racinaires a été constatée. La seconde, réalisée en 2018, a consisté à prélever des plantes saines et symptomatiques accompagnées de leur sol rhizosphérique à trois stades phénologiques (post-émergence, élongation et floraison/maturation des graines) au cours d'une saison culturale dans deux parcelles de pois

potager infestées. Des prélèvements de sol ont également été effectués dans chacune de ces deux parcelles afin de connaître la diversité microbienne initiale des sols avant le semis.

L'approche pasteurienne, qui fait l'objet du chapitre III de ce manuscrit, a consisté à i) isoler des champignons et des oomycètes à partir de tissus symptomatiques des racines de plantes malades collectées au stade de la floraison/maturation des graines en 2017 et à trois stades phénologiques en 2018, ii) identifier les isolats à l'aide de critères morphologiques et/ou d'outils moléculaires, iii) évaluer leur pathogénicité par des bio-essais sur pois réalisés *in vitro*, iv) classer les espèces en fonction de leur prévalence et les isolats en fonction de leur niveau d'agressivité, et enfin v) analyser la dynamique des communautés de champignons et d'oomycètes cultivables associés aux symptômes au cours d'une saison de culture de pois.

Les résultats ont montré que trois espèces du genre *Fusarium*, *F. oxysporum*, *F. solani* et *F. redolens* sont les champignons responsables de pourriture racinaire du pois les plus représentés au sein du complexe parasitaire isolé des plantes symptomatiques prélevées en 2017 et en 2018 dans les parcelles du nord de la France (Gibert et al. 2021b). Une variabilité importante de l'agressivité entre les isolats au sein de chacune de ces espèces a toutefois été constatée, ce qui corrobore de précédentes études effectuées dans d'autres pays producteurs (Skovgaard et al. 2002 ; Šišić et al. 2018a, 2018b ; Jenkins et al. 2021).

*F. oxysporum* a été l'espèce la plus fréquemment isolée, causant dans la plupart des cas, lors des tests de pathogénicité effectués, des symptômes de pourritures racinaires ponctuellement accompagnés de flétrissements de la plante. Une analyse de diversité via des séquences partielles du gène *TEF1* a montré que la majorité de nos isolats de *F. oxysporum* étaient phylogénétiquement proches d'isolats du Royaume-Uni et du Danemark. Ils sont responsables de symptômes de pourritures racinaires plutôt que de flétrissements classiquement dus à *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Skovgaard et al. 2002 ; Jenkins et al. 2021). Ces symptômes pourraient avoir un lien, pour les isolats du Royaume-Uni au moins, avec la présence de seulement un ou deux gènes *SIX*, impliqués dans le processus de pathogénèse, contre plus de neuf gènes pour la race 1 et cinq pour la race 2 de *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, toutes les deux responsables de flétrissement prononcé du pois (Jenkins et al., 2021a). Les auteurs en ont déduit que leurs isolats ne faisaient pas partie de la forme spéciale *pisi*. Ainsi, nos isolats pourraient eux aussi ne pas être assimilés à cette forme spéciale.

*F. solani* a été isolé avec une fréquence légèrement inférieure à celle observée pour *F. oxysporum*, mais les tests de pathogénicité ont montré que les isolats de *F. solani* étaient les plus agressifs parmi ceux testés. L'analyse de leur diversité génétique a montré que 99 % des isolats de *F. solani* analysés dans notre étude appartiendraient à l'espèce *Fusarium pisi* comb. nov. proposée par Šišić et al. (2018a). Celle-ci comprend des souches de référence de l'haplotype *Fusarium solani* species complex (FSSC) 11, une espèce phylogénétiquement distincte au sein du complexe d'espèces *Fusarium solani* (FSSC). Elle regroupe les isolats pathogènes du pois référencés comme appartenant à la forme spéciale *pisii* ou à son téléomorphe *Nectria hoematococca* mating population (MP) VI (Matuo and Snyder 1973 ; O'Donnell & Gray 1995; O'Donnell 2000 ; O'Donnell et al. 2008). L'haplotype FSSC 11 diverge des haplotypes étroitement apparentés FSSC 17 et FSSC 13, correspondant respectivement à la forme spéciale *mori* et à la forme spéciale *robiniae* (O'Donnell 2000 ; O'Donnell et al. 2008 ; Šišić et al. 2018a). Le caractère très agressif des isolats pourrait être dû à leur appartenance à cette lignée dont les déterminants génétiques de la virulence sur le pois ont été très étudiés (Coleman 2016). Ils sont dus à un cluster de six gènes « Pea Pathogenicity » (*PDA1*, *PEP1* à *PEP5*) situés sur un chromosome surnuméraire. Ces gènes sont exprimés durant le processus infectieux. Les souches de *F. solani* f. sp. *pisii* et plus généralement de la lignée *F. pisi* comb. nov., sont d'autant plus préoccupantes que leur spectre d'hôtes n'est pas limité au pois mais comprend plusieurs espèces de légumineuses ou non légumineuses (Matuo and Snyder 1972 ; Westerlund et al. 1974 ; Vanetten 1978 ; Šišić et al. 2018a). Certaines accessions de légumineuses peuvent notamment être des hôtes asymptomatiques (Šišić et al. 2018b).

*F. redolens* a été moins fréquemment isolé que *F. oxysporum* et *F. solani* mais la plupart des isolats collectés ont été classés modérément à hautement agressifs. Cet agent pathogène est donc une préoccupation importante pour le pois potager dans le nord de la France, notamment parce qu'il est également pathogène du blé, une céréale fréquemment incluse dans la rotation avec les légumineuses (Taheri et al. 2011).

*Fusarium solani*, *F. oxysporum* et *F. redolens* cohabitent souvent dans les lésions racinaires des pois collectés dans le nord de la France. Une composition et des fréquences d'isolement similaires ont été observées au Royaume-Uni (Clarkson 1978 ; Jenkins 2018). La proximité géographique de ces deux localisations, ainsi que leur climat proche, pourraient expliquer en partie ces similarités. Ces trois agents pathogènes ont également été répertoriés

dans le nord de l'Europe et en Amérique du Nord. Dans ces régions, *F. avenaceum* y est cependant l'espèce la plus fréquemment isolée (Oyarzun & Loon 1989 ; Oyarzun et al. 1993 ; Persson et al. 1997 ; Chittem et al. 2015 ; Gossen et al. 2016 ; Taheri et al. 2017a ; Chatterton et al. 2019). Cette espèce a été isolée avec une fréquence moindre dans nos échantillons, mais plusieurs isolats ont montré une agressivité importante lors des tests *in vitro*. Sa présence dans le nord de la France est à surveiller relativement à son large spectre d'hôtes pouvant mener à un accroissement de l'inoculum difficile à contrôler lors des rotations culturales (Feng et al. 2010 ; Gossen et al. 2016 ; Safarieskandari et al. 2021). Ce sont ces raisons qui auraient abouti à son émergence ces dernières années au Canada (Feng et al. 2010 ; Chittem et al. 2015 ; Zitnick-Anderson et al. 2018 ; Chatterton et al. 2019) et dans le centre et le nord de l'Europe (Persson et al. 1997 ; Bacanovic-Šišić et al. 2018 ; Šišić et al. 2018b) où cette espèce est considérée comme particulièrement préoccupante.

La présence de *Fusarium* pathogènes appartenant aux espèces *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. redolens* et *F. solani*, les plus problématiques pour les cultures de pois, a notamment fait l'objet d'une publication sous forme de « Disease Note » afin de prendre acte de leur implication dans les symptômes de pourritures racinaires du pois dans le bassin de production du nord de la France (Gibert et al. 2021b).

Un autre résultat important de ce travail est la mise en évidence d'un nouvel agent pathogène du pois. Il s'agit de *Clonostachys rhizophaga* qui a été isolé avec une fréquence plus faible que les principaux pathogènes appartenant à trois espèces de *Fusarium*, mais néanmoins non négligeable. Tous les isolats testés (12 isolats) se sont révélés pathogènes et très agressifs sur le pois, à un même niveau que *F. solani* et *F. redolens*. Il s'agit du premier signalement de *C. rhizophaga* en tant qu'agent pathogène responsable de pourritures racinaires du pois. Il a toutefois déjà été signalé dans différents pays comme étant pathogène de différentes espèces de plantes comme le pois chiche (*Cicer arietinum*), la châtaigne d'eau (*Eleocharis dulcis*) et le bambou géant (*Dendrocalamus giganteus*) (Abang et al. 2009; Zizzerini et al. 2010 ; Dugan et al. 2011 ; Yang et al. 2019). La distance génétique entre ces différentes plantes hôtes laisse envisager que ce champignon serait généraliste avec une propension à coloniser de nombreuses espèces végétales, au même titre que *Clonostachys rosea*, une autre espèce très étudiée au sein du genre *Clonostachys*. En effet, *C. rosea* est phylogénétiquement proche de *C. rhizophaga* (Moreira et al., 2016). C'est un champignon endophyte du pois, très



fréquent, capable de coloniser de nombreuses plantes dont les céréales (Xue 2003 ; Chatterton et al. 2008 ; Xue et al. 2009 ; Pan et al. 2013 ; Brown 2016).

Une des caractéristiques communes aux isolats de ces différentes espèces préoccupantes pour la culture du pois dans le nord de la France est la méconnaissance de leur spectre d'hôtes. Les pistes évoquées, établies à partir de critères phylogénétiques ou par des analogies avec des isolats de ces mêmes espèces citées dans la littérature méritent d'être confirmées et complétées. Ces données sont essentielles dans le cadre du contrôle de la maladie par des rotations culturales comme discuté dans les chapitres I et II pour lutter contre *A. euteiches*. Une perspective à mon travail de thèse serait ainsi d'évaluer la gamme d'hôtes des isolats de ces différentes espèces via des tests de pathogénicité sur les différentes espèces végétales, incluant différentes variétés, fréquemment utilisées dans les rotations. Ce travail permettrait de valider ou d'invalidier l'appartenance des isolats de *F. oxysporum* et de *F. solani* à la forme spéciale *pisi*. L'identification de la présence des gènes *SIX* chez les isolats de *F. oxysporum* permettrait également de vérifier leur rôle dans le processus infectieux sur pois ainsi que dans le déterminisme de leur spécialisation pour cet hôte (Jenkins et al. 2021). En particulier, l'identification des espèces non hôtes ou des variétés résistantes aux différents agents pathogènes du complexe parasitaire présents dans le nord de la France permettrait de fournir des informations nécessaires aux producteurs pour gérer la rotation des cultures, afin de limiter l'incrémentation des inocula pathogènes pour *in fine* diminuer le risque pour les cultures. Les données générées viendraient compléter celles déjà disponibles en France concernant la gamme d'hôtes d'*A. euteiches* au sein des légumineuses (Moussart et al. 2013). Les limites d'une telle stratégie résident cependant dans la présence d'hôtes asymptomatiques pour *Fusarium*, comme les paillis et les couverts végétaux, ce qui est difficilement gérable pour le producteur (Šišić et al. 2018b). Par ailleurs, il est difficile de maîtriser le caractère généraliste de certaines espèces comme *F. avenaceum* (Gossen et al. 2016 ; Moparthi et al. 2021). De récents travaux ont toutefois montré qu'il ne cause pas forcément de symptômes chez toutes les céréales ni chez certaines légumineuses comme la lentille verte ou le soja (Safarieskandari et al. 2021). S'il s'avère que ces espèces végétales sont non-hôtes, ou du moins si elles ne permettent pas la multiplication de l'inoculum de *F. avenaceum*, elles pourraient être utilisées dans les rotations. Dans tous les cas, cette stratégie de gestion de l'inoculum par la rotation des cultures va de pair avec le

développement d'outils de prédiction du risque d'expression de la maladie *via* la quantification moléculaire de l'inoculum des différents agents pathogènes du complexe parasitaire.

Au-delà des principaux agents pathogènes du pois révélés dans le chapitre III, plusieurs autres espèces ont pu être isolées des plantes symptomatiques mais avec une faible fréquence. Certaines de ces espèces comme *F. tricinctum* et *F. culmorum*, bien que rarement isolées, sont des champignons connus pour être des agents pathogènes du pois (Persson et al. 1997 ; Taheri et al. 2017a). Leur présence dans les tissus racinaires symptomatiques n'est donc pas surprenante et leur prévalence dans les cultures de pois du nord de la France restera à surveiller. Toutefois, des espèces comme *Adustoporia sinuosa*, *Acremonium sclerotigenum*, *Amyloporia xantha*, *Baltazaria galactina*, *Heterobasidion annosum*, *Mortierella elongata*, *Mucor circinelloides*, *Fusarium poae*, *Peniophora cinerea*, *P. laeta*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Pythium intermedium*, et *Trichoderma velutinum* se sont révélées pathogènes du pois lors des tests *in vitro* alors qu'elles n'avaient jamais été décrites comme telles jusqu'à présent. Leur rôle ne serait ainsi pas neutre dans les plantes infectées mais leur faible fréquence d'isolement suggère qu'il s'agirait d'espèces opportunistes capables de coloniser ponctuellement les lésions causées par les agents principaux du complexe parasitaire du pois. La prévalence et l'abondance réelles de ces champignons et oomycètes rarement isolés pourraient toutefois avoir été sous-estimées en raison de leur faible vitesse de croissance sur milieu de culture généraliste par rapport aux *Fusarium* spp. Cette hypothèse, si elle était vérifiée, pourrait amener à reconsidérer leur rôle réel dans la sévérité des symptômes observés dans les champs de pois. Ces espèces pourraient en effet influencer le pouvoir pathogène des agents principaux par des mécanismes de synergie ou d'antagonisme.

Le biais lié aux méthodes d'isolement sur boîtes de Petri est certainement la cause du faible nombre d'isolats d'oomycètes isolés des symptômes de plantes collectées. *A. euteiches* n'a notamment pas pu être isolé malgré sa présence avérée dans le sol d'une des parcelles échantillonnées en 2018 (Woestyne) (Gibert et al. 2021b). Cet agent parasitaire est connu pour être difficilement isolable directement à partir de pois collectés au champ, ce qui a par exemple amené à négliger sa présence au Canada, jusqu'à ce que l'utilisation de techniques moléculaires comme la PCR ou la qPCR le mette en évidence dans les champs de pois infestés (Chatterton et al. 2019). Dans notre étude, les oomycètes isolés appartenaient tous au genre

*Pythium*, et certains isolats se sont montrés modérément agressifs, ce qui est cohérent avec des études similaires réalisées dans d'autres pays (Kerr 1963 ; Tu 1991 ; Oyarzun et al. 1993 ; Persson et al. 1997). La présence de *Pythium* a toutefois été rapportée comme facteur d'aggravation des symptômes causés par *Fusarium* (Kerr 1963 ; Pieczarka & Abawi 1977).

Enfin, le chapitre III a mis en évidence l'évolution des communautés de champignons et d'oomycètes cultivables associées aux pourritures racinaires du pois au cours d'une saison culturale. Ces communautés diffèrent selon la parcelle dès les stades précoces de développement du pois. Cette différence peut être expliquée par des facteurs tels que la densité et/ou la composition du complexe parasitaire initial, les conditions pédoclimatiques, ainsi que la sélection des communautés microbiennes rhizosphériques du pois, par les exsudats de la graine et des racines de la variété de pois cultivée sur chaque parcelle (Nelson 2018). Ces communautés sont composées en majorité de champignons dont les isolats ont été caractérisés comme non pathogènes à faiblement pathogènes. Cependant, certains des agents pathogènes principaux du complexe parasitaire, notamment les champignons du genre *Fusarium*, ont été isolés dès le stade de post-émergence, ce qui confirme leur capacité à infecter très tôt la graine et les racines de la plantule sous l'effet des exsudats (Short and Lacy 1976 ; Ruan et al. 1995). Les résultats ont également révélé que la proportion d'isolats classés comme non pathogènes à faiblement pathogènes diminue progressivement au cours de la saison culturale en faveur des isolats modérément à fortement pathogènes. De nouvelles espèces du complexe parasitaire, comme *C. rhizophaga*, peuvent notamment coloniser les plantes à un stade plus avancé dans la saison. Le niveau de dissimilarité entre les communautés des parcelles diminue pour converger vers une même composition en espèces similaire dominées par *F. solani*, *F. oxysporum* et *F. redolens*, au stade de la floraison et de la maturation des grains.

Les travaux présentés dans le chapitre III ont démontré que les problèmes de pourritures racinaires du pois en France ne doivent pas être imputés uniquement à *A. euteiches*. Toutes les espèces mises en évidence, notamment *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, *C. rhizophaga* et *F. avenaceum*, sont des espèces avec lesquelles il faudra composer pour mettre en place une approche globale de contrôle de la maladie et encourager la culture des légumineuses. Outre la présence d'espèces dominantes associées à celle d'*A. euteiches*, l'évolution des communautés cultivables de champignons et d'oomycètes

constituant le complexe parasitaire du pois potager doit être considérée au sein du rhizobiome dans sa totalité pour envisager globalement le contrôle de la maladie.

En effet, l'approche pasteurienne utilisée a permis de conclure quant au rôle causal des espèces isolées et d'éclairer celui des communautés dans l'apparition de la maladie. Elle reste cependant limitée par le manque d'exhaustivité des résultats lié à la difficulté de détecter les espèces associées à la maladie mais difficilement cultivables ainsi que celles constituant l'environnement biotique régulant l'activité des agents pathogènes. L'utilisation de techniques moléculaires pour analyser de manière plus exhaustive la diversité des communautés microbiennes apparaît nécessaire pour remédier au biais des méthodes d'isolement sur boîtes de Petri. Un travail d'analyse moléculaire par metabarcoding des échantillons collectés (chapitre IV) a ainsi été engagé. Celui-ci repose sur le séquençage à haut débit de la région ITS. Il cible les communautés de champignons et d'oomycètes présentes dans les ADN extraits des échantillons de sol initial, de sol rhizosphérique, de plantules et plantes symptomatiques et asymptomatiques collectés lors des deux campagnes de 2017 et 2018. Les objectifs de cette analyse comparative de la diversité du rhizobiome étaient de i) déterminer la composition des communautés de champignons et d'oomycètes associées aux pourritures racinaires, ii) caractériser leur évolution au cours de la culture du pois, iii) déterminer les conditions favorables ou défavorables à l'activité infectieuse du complexe parasitaire et iv) identifier d'éventuels taxons candidats en lutte biologique. Ces travaux ont nécessité un investissement important comprenant les extractions d'ADN de nombreux échantillons, la mise au point des conditions de PCR et la production des produits d'amplification destinés au séquençage à haut débit. Malheureusement, des problèmes techniques rencontrés à cette étape par la plateforme prestataire ont retardé l'obtention des résultats et n'ont pas permis de les intégrer dans ce manuscrit. Des adaptations techniques, toujours en cours, sont nécessaires pour réaliser le séquençage et finaliser les analyses.

Nous avons fait le choix d'utiliser une technique de séquençage récente proposée par Pacific Biosciences (PacBio). Cette technique permet le séquençage de longs fragments d'ADN (plusieurs milliers de paires de bases (pb)) et offre donc la possibilité de séquencer la région ITS entière (Tedersoo et al. 2018). Elle permet ainsi d'améliorer considérablement l'identification taxonomique des séquences au niveau de l'espèce, comparativement à des technologies plus éprouvées pour un usage en metabarcoding comme MiSeq ou HiSeq

(Illumina) ou Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) (Nilsson et al. 2019). Ces dernières ne sont en effet pas adaptées au séquençage de fragments de taille supérieure à environ 550 pb en « paired-end » (2 x 300 pb) (Nilsson et al., 2019). Cette contrainte de taille ne permet le plus souvent que de séquencer de façon distincte la région ITS1 ou la région ITS2 pour le metabarcoding des eucaryotes (Siegel-Hertz et al. 2018 ; Nilsson et al. 2019), aboutissant à une identification taxonomique au niveau du genre et non pas de l'espèce. La technologie PacBio bénéficie également d'un taux d'erreur et d'un taux de biais de séquençage inférieurs à d'autres technologies récentes de séquençage « longue lecture » comme MinION de Oxford Nanopore (Loit et al. 2019). Du fait de ces avantages, les études reposant sur le metabarcoding de la région ITS pour l'identification de communautés fongiques se sont multipliées, validant son intérêt pour ce type d'analyse ( Heeger et al. 2018 ; Tedersoo et al. 2018 ; Tedersoo & Anslan 2019). Cette technologie relativement récente reste cependant encore soumise à une optimisation continue (Castano et al. 2020).

Le choix d'une technologie permettant de séquencer la région ITS entière est aussi apparu adapté au regard de la diversité des champignons et oomycètes impliqués dans le complexe parasitaire du pois, celui-ci comprenant plusieurs espèces au sein d'un même genre (*Fusarium* spp., *Pythium* spp.) mais aussi des espèces très éloignées. Ce marqueur peut toutefois s'avérer ne pas être suffisamment polymorphe pour discriminer certaines espèces phylogénétiquement proches (Vu et al. 2019). Pour certains groupes spécifiques, l'utilisation d'autres marqueurs plus discriminants que la région ITS, comme le gène *TEF1* pour le genre *Fusarium* (Cobo-Diaz et al. 2019), ou le gène *COX1* pour les oomycètes (Choi et al. 2015), pourrait être envisagée. Ils ne présentent néanmoins pas le caractère universel de la région ITS pour l'identification des champignons et des oomycètes (Schoch et al. 2012 ; Kõljalg et al. 2013 ; Sapkota & Nicolaisen 2015 ; Riit et al. 2016), pour laquelle des bases de données de séquences assez complètes, telle que UNITE, sont disponibles (Nilsson et al., 2018).

Les approches de metabarcoding ont montré leur intérêt pour l'analyse des communautés de champignons et d'oomycètes associées aux pourritures racinaires du pois (Xu et al. 2012a, 2012b; Taheri et al. 2017 b; Chatterton et al. 2021). Elles ont permis d'obtenir une image de la diversité des taxons associés à la maladie plus exhaustive que les approches basées sur les isolements. Les résultats de notre analyse sont donc attendus afin de pouvoir affiner les conclusions tirées de l'étude pasteurienne concernant les agents associés aux

pourritures racinaires et éventuellement pour mettre en évidence des taxons, ou groupes de taxons, antagonistes des agents pathogènes et offrant des perspectives pour le contrôle biologique de la maladie.

Le biocontrôle de la maladie a fait l'objet du dernier axe de mon travail de thèse. Il a nécessité un investissement important pour sa réalisation bien qu'il n'ait pas abouti à des résultats particulièrement probants. La démarche était basée sur le test de produits de biocontrôle sélectionnés parmi ceux homologués en France ou en cours de développement, ayant des activités de bio-protection des plantes contre des espèces composant le complexe parasitaire du pois mais utilisées dans d'autres pathosystèmes. Trois agents de biocontrôle ont été sélectionnés (*F. oxysporum* Fo47, *C. rosea* ACM941 du produit DONguard® (Adjuvant plus) et l'oomycète *Pythium oligandrum* M1 ATCC38472 du produit Polyversum® (De Sangosse)) pour être testés contre les trois principaux agents du complexe parasitaire des pourritures racinaires du pois potager dans le nord de la France mis en évidence dans les chapitres I et III de ce manuscrit : *A. euteiches*, *F. solani* et *F. oxysporum*. Ces candidats au biocontrôle de la maladie ont été testés i) *in vitro*, en confrontation sur boîtes de Petri afin d'étudier leur aptitude à inhiber le développement des trois agents pathogènes, ii) en serre, pour évaluer leur aptitude à prévenir l'infection du pois par ces trois agents pathogènes, et enfin, iii) avec quatre autres produits sélectionnés, au champ, en microparcelles expérimentales naturellement infestées par *A. euteiches*, afin de tester leur aptitude à contrôler l'infestation des cultures de pois potager.

Aucune de ces trois expérimentations n'a révélé d'effets probants des agents de biocontrôle testés. Des difficultés techniques, concernant notamment la production de l'inoculum des oomycètes, ainsi que des conditions météorologiques exceptionnellement caniculaires de l'été 2019 n'ont pas permis d'obtenir de résultats lors des essais en serre. Concernant l'essai au champ, la pression pathogène de la parcelle d'étude était trop importante pour mettre en évidence un effet des produits de biocontrôle. Ces résultats négatifs révèlent la difficulté de gérer un complexe parasitaire dont la diversité taxonomique importante implique des caractéristiques physiologiques, écologiques et pathogéniques variées qui réduisent le champ des possibles pour contrôler la maladie.

Dans un contexte de grande culture, une solution de biocontrôle pourrait passer par la recherche d'un consortium d'agents de biocontrôle capables de s'adapter à un panel de conditions environnementales (Mazzola & Freilich 2017). L'utilisation de souches endémiques, adaptées aux conditions environnementales locales, permettrait sans doute l'obtention de meilleurs résultats en plein champ. Leur sélection pourrait se faire sur la base de leur compatibilité réciproque, mais également de la complémentarité de leurs exigences écologiques, de façon à ce que l'une ou l'autre au moins des composantes de ce consortium puisse contrôler celles du complexe parasitaire quand elles s'expriment durant la culture du pois en grande culture. Un travail de développement devrait également être effectué sur la méthode d'application dans les sols d'un tel consortium, avant ou au moment du semis de pois, afin d'assurer son établissement et son maintien dans la rhizosphère du pois pendant toute la durée de la culture. Enfin, ce travail de sélection des composantes du consortium doit être envisagé en fonction des contraintes de la réglementation (Alabouvette 2016).

Une seconde approche envisageable, conjugable à la première, est la lutte conservatoire par stimulation de la microflore indigène (Alabouvette & Steinberg 2006 ; Steinberg et al. 2019). Son rôle dans la modulation du développement et/ou de l'expression pathogène du complexe parasitaire pourrait notamment être, tout comme certains paramètres édaphiques, à l'origine de la résistance de certains sols (Oyarzun et al. 1997 ; Persson et al. 1999). Certaines communautés du rhizobiome du pois, pourraient ainsi contrôler l'activité des membres du complexe parasitaire tout en favorisant celle de la microflore symbiotique et la croissance du pois par différents mécanismes. Des analyses comparatives entre les rhizobiomes de plantes saines et de plantes symptomatiques via des outils moléculaires de séquençage à haut débit, comme la métagénomique et la métatranscriptomique permettraient ainsi de caractériser ces groupes fonctionnels (Massart et al. 2015 ; Mazzola & Freilich 2017). Leur stimulation pourrait être envisagée par l'apport de substrats contenant des métabolites qui leur sont accessibles ou qui au contraire sont délétères aux organismes contribuant au développement de la maladie (Alabouvette et al. 2006, 2009 ; Mazzola and Freilich 2017). Ils pourraient également être stimulés ou sélectionnés par la plante par l'intermédiaire de leurs exsudats racinaires (Hartmann et al. 2009) ainsi que par des pratiques culturales adaptées, dont la ou les combinaisons idéales doivent encore être déterminées.

D'une façon générale, c'est bien la combinaison des différentes stratégies de lutte, intégrées dans une approche holistique, qui permettra d'aboutir à un contrôle efficace de la maladie dans un contexte de transition agroécologique. La détermination de variétés de pois potager, et plus largement de légumineuses, durablement résistantes à une ou plusieurs composantes du complexe parasitaire est un aspect central et prometteur du contrôle. A ce titre, les intégrations dans de futurs cultivars commerciaux de QTL contrôlant des résistances partielles à *A. euteiches* ou à *F. solani* f. sp. *pisi*, constitueront des étapes essentielles (Lavaud et al. 2016 ; Desgroux et al. 2018 ; Coyne et al. 2019 ; Williamson-Benavides et al. 2020). Au-delà des variétés de pois résistantes, c'est l'ensemble des espèces à cultiver dans la rotation qui doivent être choisies de façon à limiter l'installation du consortium d'agents pathogènes. Il apparaît ainsi nécessaire d'identifier des espèces et variétés non-hôtes ou capables de stimuler les communautés microbiennes antagonistes du développement ou de l'expression pathogène de l'inoculum de ces agents parasitaires. Cette visée prophylactique doit être favorisée par des pratiques culturales adaptées, comme l'utilisation de couvert végétal, du semis direct ou encore de cultures associées, susceptibles de stimuler les communautés microbiennes fonctionnelles contrôlant l'activité du complexe parasitaire. Mon travail de thèse a permis de fournir des informations sur la composition de ce complexe parasitaire dans le nord de la France, et représente ainsi une première étape indispensable à l'orientation des stratégies de gestion. Cette connaissance est primordiale en sélection variétale, pour permettre l'identification de variétés résistantes, mais aussi pour engager des stratégies de gestion culturales adaptées à l'écologie des microorganismes impliqués. Le développement d'une méthode de prédiction du risque lié à *A. euteiches* pour les cultures s'intègre pleinement dans une approche agroécologique en offrant un outil décisionnel indispensable aux producteurs pour éviter les parcelles infestées et optimiser la gestion des rotations culturales.





# RÉFÉRENCES



## Références

- Abang, M., Kabbabeh, S., Ahmed, S., Murad, S., Chilvers, M., Peever, T., & Schroers, H. (2009). First report of chickpea wilt caused by *Clonostachys rhizophaga* in Syria. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0666A>
- Abbo, E. O., & Irwin, J. A. G. (1990). *Aphanomyces euteiches*, a possible cause of poor lucerne establishment in the Lockyer Valley, *Queensland Australian Journal of Experimental Agriculture*, 30, 361–364. <https://doi.org/10.1071/EA9900361>
- Abdelfattah, A., Malacrino, A., Wisniewski, M., Cacciola, S. O., & Schena, L. (2018). Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. *Biological Control*, 120, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.009>
- Aime, S., Alabouvette, C., Steinberg, C., & Olivain, C. (2013). The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47: a good candidate for priming the defense responses in tomato roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26 (8): 918–926. <https://doi.org/10.1094/mpmi-12-12-0290-r>
- Alabouvette, C. (1999). *Fusarium* wilt suppressive soils: an example of disease-suppressive soils. *Australasian Plant Pathology* 28 (1): 57-64. <https://doi.org/10.1071/ap99008>
- Alabouvette, C., & Steinberg, C. (2006). The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. *Ecological and Societal Approach to Biological Control* (pp. 123-144). Dordrecht: SPRINGER.
- Alabouvette, C., Olivain, C., & Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology* 114 (3): 329–341. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-0233-0>
- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., & Steinberg, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist* 184 (3): 529–544. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03014.x>
- Alabouvette, C. (2016). Où en est le biocontrôle sur le plan réglementaire ? *Phytoma* 699: 8-10.
- Albers, C. N., Jensen, A., Baelum, J., & Jacobsen, C. S. (2013). Inhibition of DNA polymerases used in q-PCR by structurally different soil-derived humic substances. *Geomicrobiology Journal*, 30, 675–681. <https://doi.org/10.1080/01490451.2012.758193>
- Ali, M., Jain, S. K., Mehi lal, M. Z., Kumar, S., & Srivastva, A. S. (2014). Survey, media and management of *Fusarium* wilt of pea. *The Bioscan*, 9(3), 1213–1216.
- Almqvist, C., Persson, L., Olsson, A., Sundstrom, J., & Jonsson, A. (2016). Disease risk assessment of sugar beet root rot using quantitative real-time PCR analysis of *Aphanomyces cochlioides* in naturally infested soil samples. *European Journal of Plant Pathology*, 145, 731–742. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0862-5>
- Amaral-Zettler, L. A., McCliment, E. A., Ducklow, H. W., & Huse, S. M. (2009). A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA Genes. *Plos One*, 4(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006372>
- Anees, M., Edel-Hermann, V., & Steinberg, C. (2010a). Build up of patches caused by *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*. 42, 1661-1672. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.013>
- Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Faloya, V., & Steinberg, C. (2010b). Biotic changes in relation to local decrease in soil conduciveness to disease caused by *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Plant Pathology*, 126, 29-41. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9517-0>
- Araujo, S. S., Beebe, S., Crespi, M., Delbreil, B., Gonzalez, E. M., Gruber, V., Lejeune-Henaut, I., Link, W., Monteros, M. J., Prats, E., Rao, I., Vadez, V., & Vaz Patto, M. C. (2015). Abiotic stress responses in legumes: strategies used to cope with environmental challenges. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1–3), 237–280. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.898450>
- Armstrong, E. L., Pate, J. S., & Tennant, D. (1994). The field pea crop in South Western Australia – Patterns of water use and root growth in genotypes of contrasting morphology and growth habit. *Functional Plant Biology*, 21(4), 517–532. <https://doi.org/10.1071/pp9940517>

## Références

- Arnoldi, A., Zanoni, C., Lammi, C., & Boschin, G. (2015). The role of grain legumes in the prevention of hypercholesterolemia and hypertension. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1–3), 144–168.
- Asiegbu, F. O., Adomas, A., & Stenlid, J. (2005). Conifer root and butt rot caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. S.l. *Molecular Plant Pathology*, 6(4), 395–409. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2005.00295.X>
- Baćanović-Šišić, J., Šišić, A., Schmidt, J. H., & Finckh, M. R. (2018). Identification and characterization of pathogens associated with root rot of winter peas grown under organic management in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 151(3), 745–755. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1409-0>
- Bailey, D. J., & Gilligan, C. A. (1999). Dynamics of primary and secondary infection in take-all epidemics. *Phytopathology*, 89(1), 84–91. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.1.84>
- Bailey, K. L., Gossen, B. D., Lafond, G. P., Watson, P. R., & Derksen, D. A. (2001). Effect of tillage and crop rotation on root and foliar diseases of wheat and pea in Saskatchewan from 1991 to 1998: Univariate and multivariate analyses. *Canadian Journal of Plant Science*, 81(4), 789–803.
- Bainard, L. D., Navarro-Borrell, A., Hamel, C., Braun, K., Hanson, K., & Gan, Y. (2017). Increasing the frequency of pulses in crop rotations reduces soil fungal diversity and increases the proportion of fungal pathotrophs in a semiarid agroecosystem. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 240, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.02.020>
- Bardin, S. D., HungChang, H., 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. <https://doi.org/10.1139/b04-003>
- Barilli, E., Moral, A., Sillero, J. C., & Rubiales, D. (2012). Clarification on rust species potentially infecting pea (*Pisum sativum* L.) crop and host range of *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. *Crop Protection*, 37, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.019>
- Barton, K. (2020). MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.43.17. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>
- Basu, P. K., Crete, R., Donaldson, A. G., Gourley, C. O., Haas, J. H., Harper, F. R., Lawrence, C. H., Seaman, W. L., Toms, H. N. W., Wong, S. I., & Zimmer, R. C. (1973). Prevalence and severity of diseases of processing peas in Canada, 1970-71. *Canadian Plant Disease Survey*, 53(1), 49–57.
- Basu, P. K. (1975). Yield loss conversion factors for common root rot severity of processing peas. *Proceedings of the Canadian Phytopathological Society*, 42, 19–20.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Benhamou, N., Garand, C., & Goulet, A. (2002). Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (8): 4044–4060. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.4044-4060.2002>.
- Benhamou, N., le Floch, G., Vallance, J., Gerbore, J., Grizard, D., & Rey, P. (2012). *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiology-Sgm* 158: 2679–2694. <https://doi.org/10.1099/mic.0.061457-0>.
- Biddle, A. J., Knott, C. M., & Gent, G. P. (1988). *Pea growing handbook*. Peterborough, U.K.: Processors and Growers Research Organisation.
- Bivand, R., S., & Wong, D. W. S. (2018). Comparing implementations of global and local indicators of spatial association TEST, 27(3), 716-748. <https://doi.org/10.1007/s11749-018-0599-x>
- Blume, M. C. & Harman, G. E. (1979). *Thielaviopsis basicola* - Component of the pea root-rot complex in New-York State. *Phytopathology* 69 (8): 785–788. <https://doi.org/10.1094/Phyto-69-785>.
- Bockus, W. W., & Shroyer, J. P. (1998). The impact of reduced tillage on soilborne plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 485–500. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.485>

## Références

- Bodker, L., Leroul, N., & Smedegaard-Petersen, V. (1993). Influence of pea cropping history on disease severity and yield depression. *Plant Disease*, 77, 896–900.
- Bonneau, M., Peyrard, N., Gaba, S., & Sabbadin, R. (2016). Sampling for weed spatial distribution mapping need not be adaptive. *Environmental and Ecological Statistics*, 23(2), 233–255. <https://doi.org/10.1007/s10651-015-0337-4>
- Botero-Ramirez, A., Hwang, S.-F., & Strelkov, S. E. (2021). *Plasmodiophora brassicae* inoculum density and spatial patterns at the field level and relation to soil characteristics. *Pathogens*, 10(5), 499. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050499>
- Botha, W. J., & Coetzer, R. L. J. (1996). Species of *Pythium* associated with root-rot of vegetables in South Africa. *South African Journal of Botany*, 62(4), 196–203.
- Bouchenak, M., & Lamri-Senhadjji, M. (2013). Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: A Review. *Journal of Medicinal Food*, 16(3), 185–198. <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0238>
- Bourgeois, A., Gaba, S., Munier-Jolain, N., Borgy, B., Monestiez, P., & Soubeyrand, S. (2012). Inferring weed spatial distribution from multi-type data. *Ecological Modelling*, 226, 92–98. doi:10.1016/j.ecolmodel.2011.10.010
- Bowers, J. H. & Parke, J. L. (1993). Epidemiology of *Pythium* damping-off & *Aphanomyces* root-rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. *Phytopathology* 83 (12): 1466–1473. <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-1466>.
- Brauna-Morzevska, E., Bankina, B., & Kaneps, J. (2019). *Botrytis* genus fungi as causal agents of legume diseases: A review. In S. Treija & S. Skujeniece (Eds.), *Research for Rural Development 2019, Vol 2* (pp. 63–69). Latvia Univ Life Sciences & Technologies. <https://doi.org/10.22616/rrd.25.2019.050>
- Brown, W. G. (2016). *Clonostachys rosea* inoculated plant materials with fungicides and adjuvants (*World Intellectual Property Organization Patent No. WO2016011057A1*). <https://patents.google.com/patent/WO2016011057A1/en>
- Bywater, J., Hickman, C.J., 1959. A new variety of *Phytophthora erythroseptica*, which causes a soft rot of pea. *Transactions of the British Mycological Society*, 42, 513–524. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(59\)80054-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(59)80054-1)
- Bunyard, B. A., Nicholson, M. S., & Royse, D. J. (1996). Phylogeny of the genus *Agaricus* inferred from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Fungal Genetics and Biology*, 20(4), 243–253. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1996.0039>
- Calles, T., Xipsiti, M., & del Castello, R. (2019). Legacy of the international year of pulses. *Environmental Earth Sciences*, 78(5), 124. <https://doi.org/10.1007/s12665-019-8106-6>
- Campbell, C., & Noe, J. (1985). The spatial-analysis of soilborne pathogens and root diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 23, 129–148.
- Cao, T., Manolii, V. P., Strelkov, S. E., Hwang, S.-F., & Howard, R. J. (2009). Virulence and spread of *Plasmodiophora brassicae* [clubroot] in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 31(3), 321–329. <https://doi.org/10.1080/07060660909507606>
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553–556. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Carlucci, A., Raimondo, M. L., Santos, J., & Phillips, A. J. L. (2012). *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia*, 28, 34–48. <https://doi.org/10.3767/003158512X638251>
- Carter, M. R., & Gregorich, E. G. (Eds.). (2008). Soil sampling and methods of analysis (2nd ed). *Canadian Society of Soil Science ; CRC Press*

## Références

- Castano, C., Berlin, A., Brandstrom Durling, M., Ihrmark, K., Lindahl, B. D., Stenlid, J., Clemmensen, K. E., & Olson, A. (2020). Optimized metabarcoding with Pacific biosciences enables semi-quantitative analysis of fungal communities. *New Phytologist*, 228(3), 1149–1158. <https://doi.org/10.1111/nph.16731>
- Castejon-Munoz, M., & Oyarzun, P. J. (1995). Soil receptivity to *Fusarium solani* f. sp. *pisi* and biological control of root rot of pea. *European Journal of Plant Pathology*, 101(1), 35–49. <https://doi.org/10.1007/BF01876092>
- Castle, S. C., Samac, D. A., Sadowsky, M. J., Rosen, C. J., Gutknecht, J. L. M., & Kinkel, L. L. (2019). Impacts of sampling design on estimates of microbial community diversity and composition in agricultural soils. *Microbial Ecology*, 78(3), 753–763. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01318-6>
- Chakraborty, U., & Chakraborty, B. N. (1989). Interaction of *Rhizobium leguminosarum* and *Fusarium solani* f.sp. *pisi* on pea affecting disease development and phytoalexin production. *Canadian Journal of Botany*, 67(6), 1698–1701.
- Chan, M., & Close, R. (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, 213–217.
- Chang, K. F., Hwang, S. F., Gossen, B. D., Strelkov, S. E., Turnbull, G. D., & Bing, D. J. (2011). Effect of seeding practices, temperature & seed treatments on *Fusarium* seedling blight of narrow-leaved lupin. *Canadian Journal of Plant Science* 91 (5): 859–872. <https://doi.org/10.4141/CJPS2010-039>.
- Chang, K. F., Hwang, S. F., Ahmed, H. U., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., & Strelkov, S. E. (2013). Management strategies to reduce losses caused by fusarium seedling blight of field pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 93(4), 619–625. <https://doi.org/10.4141/cjps2012-293>
- Chang, K. F., Hwang, S. F., Ahmed, H. U., Fu, H., Zhou, Q., Strelkov, S. E., & Turnbull, G. D. (2017). First report of *Phytophthora sansomeana* causing root rot in field pea in Alberta, Canada. *Crop Protection*, 101, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.008>
- Charkowski, A. O. (2016). Opportunistic pathogens of terrestrial plants. In C. J. Hurst (Ed.), *The Rasputin Effect: When Commensals and Symbionts Become Parasitic* (pp. 147–168). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-28170-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28170-4_7)
- Charrad, M., Ghazzali, N., Boiteau, V., & Niknafs, A. (2014). NbClust: An R package for determining the relevant number of clusters in a data set. *Journal of Statistical Software*, 61(1), 1–36. <https://doi.org/10.18637/jss.v061.i06>
- Chatterton, S., Jayaraman, J., & Punja, Z. K. (2008). Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*. *Biological Control*, 46(2), 267–278. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.02.007>
- 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), 288–289. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-14-0905-PDN>
- Chatterton, S., Harding, M. W., Bowness, R., McLaren, D. L., Banniza, S., & Gossen, B. D. (2019). Importance and causal agents of root rot on field pea and lentil on the Canadian prairies, 2014–2017. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 41(1), 98–114. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1547792>
- Chatterton, S., Yang, H. E., Ortega Polo, R., McAllister, T. A., Safarieskandari, S., & Lupwayi, N. (2021). Bacterial and fungal communities, but not physicochemical properties, of soil differ according to root rot status of pea. *Pedobiologia*, 84, 150705. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2020.150705>
- Chatzivassiliou, E. K. (2021). An annotated list of legume-infecting viruses in the light of metagenomics. *Plants-Basel*, 10(7), 1413. <https://doi.org/10.3390/plants10071413>
- Chiles, J.-P., & Delfiner, P. (1999). *Geostatistics : Modeling spatial uncertainty*. Wiley.

## Références

- Chittem, K., Mathew, F. M., Gregoire, M., Lamppa, R. S., Chang, Y. W., Markell, S. G., Bradley, C. A., Barasubiye, T., & Goswami, R. S. (2015). Identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with root rots of field pea in North Dakota. *European Journal of Plant Pathology*, *143*(4), 641–649. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0714-8>
- Choi, Y.-J., Beakes, G., Glockling, S., Kruse, J., Nam, B., Nigrelli, L., Ploch, S., Shin, H.-D., Shivas, R. G., Telle, S., Voglmayr, H., & Thines, M. (2015). Towards a universal barcode of oomycetes—A comparison of the *cox1* and *cox2* loci. *Molecular Ecology Resources*, *15*(6), 1275–1288. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12398>
- Clarkson, J. D. S. (1978). Pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with foot-rots of peas and beans. *Plant Pathology*, *27*(3), 110–117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1978.tb01093.x>
- Cobo-Diaz, J. F., Baroncelli, R., Le Floch, A., & Picot, A. (2019). A novel metabarcoding approach to investigate *Fusarium* species composition in soil and plant samples. *FEMS Microbiology Ecology*, *95*(7), fiz084. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz084>
- Coleman, J. J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology*, *17*(2), 146–158. <https://doi.org/10.1111/mpp.12289>
- Constancias, F., Sebastien T., Saby, N., P. A., Horrigue, W., Villerd, J., Guillemin, J.,P., Biju-Duval, L., Nowak V., Dequiedt, S., Ranjard L., Prevost-Boure N.,(2015). Mapping and determinism of soil microbial community distribution across an agricultural landscape. *Microbiology open* *4*(3), 505-17. <https://doi.org/10.1002/mbo3.255>.
- Cooke, D. E., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., & Brasier, C. M. (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, *30*, 17–32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1202>
- Correll, J. C. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility Tests. *Phytopathology*, *77*(12), 1640. <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-1640>
- Couteaudier, Y. & Alabouvette, C. (1990). Quantitative comparison of *Fusarium oxysporum* competitiveness in relation to carbon utilization. *FEMS Microbiology Letters* *74* (4): 261–267. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04072.x>.
- Coyne, C. J., Porter, L. D., Boutet, G., Ma, Y., McGee, R. J., Lesne, A., Baranger, A., & Pilet-Nayel, M.-L. (2019). Confirmation of *Fusarium* root rot resistance QTL Fsp-Ps 2.1 of pea under controlled conditions. *BMC Plant Biology*, *19*, 98. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1699-9>
- Cressie, N. (1993). Spatial prediction and kriging. In *Statistics for Spatial Data* (pp. 105–209). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119115151.ch3>
- Crosson, P. & Moussart, A. (2011). *Aphanomyces* : un test pour cultiver du pois sans crainte. *Perspectives Agricoles* *378*: 68-71.
- Cunningham, J., & Hagedorn, D. (1962). Penetration and infection of pea roots by zoospores of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, *52*(8), 827–834.
- Daguerre, Y., Edel-Hermann, V., & Steinberg, C. (2017). Fungal genes and metabolites associated with the biocontrol of soil-borne plant pathogenic fungi. In J.-M. Mérillon & K. G. Ramawat (Eds.), *Fungal Metabolites* (pp. 1-72). Switzerland: Springer International Publishing.
- Dahl, W. J., Foster, L. M., & Tyler, R. T. (2012). Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *British Journal of Nutrition*, *108*(Supplement S1), S3–S10. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000852>
- Dandurand, L. M., & Knudsen, G. R. (1993). Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the spermosphere and rhizosphere of pea. *Phytopathology*, *83*(3), 265–270.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, *9*(8), 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>



## Références

- Davet, P., & Rouxel, F. (1997). *Détection et isolement des champignons du sol*. 203 p. Paris: INRA ed. ISBN 2-7380-0731-7
- De Fouquet, C. (2011). From exploratory data analysis to geostatistical estimation: Examples from the analysis of soil pollutants. *European Journal of Soil Science*, 62(3), 454–466. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2011.01374.x>
- Debode, J., Van Poucke, K., Franca, S.C., Maes, M., Höfte, M., & Heungens, K. (2011). Detection of multiple *Verticillium* species in soil using density flotation and real-time polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 95. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0267>
- Delp, B., Stowell, L., & Marois, J. (1986). Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. *Phytopathology*, 76(12), 1299–1305. <https://doi.org/10.1094/Phyto-76-1299>
- Delwiche, P., Grau, C., Holub, E., & Perry, J. (1987). Characterization of *Aphanomyces euteiches* isolates recovered from alfalfa in Wisconsin. *Plant Disease*, 71, 155–161. <https://doi.org/10.1094/PD-71-0155>
- Denis, J. A., Nectoux, J., Lamy, P.-J., Rouillac Le Sciellour, C., Guermouche, H., Alary, A. S., Kosmider, O., Sarafan-Vasseur, N., Jovelet, C., Busser, B., Nizard, P., Taly, V., & Fina, F. (2018). Development of digital PCR molecular tests for clinical practice: principles, practical implementation and recommendations. *Annales de Biologie Clinique (Paris)*, 76, 505–523. <https://doi.org/10.1684/abc.2018.1372>
- Desgroux, A., L'Anthoene, V., Roux-Duparque, M., Riviere, J. P., Aubert, G., Tayeh, N., Moussart, A., Mangin, P., Vetel, P., Piriou, C., McGee, R. J., Coyne, C. J., Burstin, J., Baranger, A., Manzanares-Dauleux, M., Bourion, V., & Pilet-Nayel, M.-L. (2016). Genome-wide association mapping of partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea. *BMC Genomics*, 17, 124. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2429-4>
- Desgroux, A., Baudais, V. N., Aubert, V., Le Roy, G., de Larambergue, H., Miteul, H., Aubert, G. et al. (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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02195>.
- DGAL/SASPP/2021-200 (2021). Liste des produits phytopharmaceutiques de biocontrôle, au titre des articles L.253-5 et L.253-7 du code rural et de la pêche maritime, 15 mars 2021, 13p.
- Didelot, D., & Chaillet, I. (1995). Relevance and interest of root disease prediction tests for pea crop in France. *2nd European Conference on Grain Legumes—Improving Production and Utilisation of Grain Legumes, Copenhagen-Denmark*, 9–13.
- Does, H. C. V. D., Lievens, B., Claes, L., Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. C., & Rep, M. (2008). The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environmental Microbiology*, 10(6), 1475–1485. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01561.x>
- Dugan, F. M., Lupien, S. L., & Chen, W. (2011). *Clonostachys rhizophaga* can delay and reduce emergence of chickpea but does not consistently induce wilt in Washington State. *Phytopathology*, 101(6), S46–S46.
- Dunn, L., Lang, C., Marilleau, N., Terrat, S., Biju-Duval, L., Lelièvre, M., Perrin, S., Chemidlin Prévost-Bouré N. (2021). Soil microbial communities in the face of changing farming practices: a case study in an agricultural landscape in France. *Plos One* 16(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252216>.
- Dyer, P., & Ingram, D. (1990). An improved test for evaluating the pathogenicity of isolates of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* on pea. *Annals of Applied Biology*, 117(2), 469–472. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1990.tb04234.x>
- Edel-Hermann, V., Aime, S., Cordier, C., Olivain, C., Steinberg, C., & Alabouvette, C. (2011). Development of a strain-specific real-time PCR assay for the detection and quantification of the biological control agent

## Références

- Fo47 in root tissues. *FEMS Microbiology Letters*, 322(1), 34-40. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02332.x>
- Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Mounier, A., & Steinberg, C. (2015). *Fusarium* diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach. *Journal of Microbiological Methods*, 111, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.01.026>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Edwards, S. M. (2020). lemon: Freshing up your 'ggplot2' plots. R package version 0.4.5. <https://CRAN.R-project.org/package=lemon>
- El-Mohamedy, R. S. R., & El-Baky, M. M. H. A. (2008). Evaluation of different types of seed treatment on control of root rot disease, improvement growth and yield quality of pea plant in Nobarria Province. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(6), 611–622.
- Etebu, E., & Osborn, A. M. (2010). Molecular quantification of the pea footrot disease pathogen (*Nectria haematococca*) in agricultural soils. *Phytoparasitica*, 38(5), 447–454. <https://doi.org/10.1007/s12600-010-0122-8>
- EU (2009a). Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. <http://eurlex.europa.eu/search.html?qid=1456841738609&text=2009/128&scope=EURLEX&type=quick&lang=en> (accès en septembre 2021).
- EU (2009b). Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. <http://eurlex.europa.eu/search.html?qid=1456841000072&text=1107/2009&scope=EURLEX&type=quick&lang=en> (accès en septembre 2021).
- Fabbri, A. D. T., & Crosby, G. A. (2016). A review of the impact of preparation and cooking on the nutritional quality of vegetables and legumes. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2015.11.001>
- FAOSTAT. (2020). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. (Accès en septembre 2021)
- Feng, N., XiaoYing, Z., LiHua, Y., YuHu, Z., & WeiXing, S. (2009). A method for high-efficiency isolation of *Phytophthora sojae* from heavily infected soybean tissues. *Journal of Northwest A & F University - Natural Science Edition*, 37(5), 139–143.
- Feng, J., Hwang, R., Chang, K. F., Hwang, S. F., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., Conner, R. L., & Turnbull, G. D. (2010). Genetic variation in *Fusarium avenaceum* causing root rot on field pea. *Plant Pathology*, 59(5), 845–852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02313.x>
- Fernandez, M. R., Huber, D., Basnyat, P., & Zentner, R. P. (2008). Impact of agronomic practices on populations of *Fusarium* and other fungi in cereal and noncereal crop residues on the Canadian prairies. *Soil and Tillage Research*, 100(1–2), 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.still.2008.04.008>
- Fondevilla, S., & Rubiales, D. (2012). Powdery mildew control in pea. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(2), 401–409. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0033-1>
- Fouquet, C. (2011). From exploratory data analysis to geostatistical estimation: examples from the analysis of soil pollutants. *European Journal of Soil Science*, 62(3), 454-466. doi:10.1111/j.1365-2389.2011.01374.x
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). An {R} Companion to Applied Regression, Third Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>

## Références

- Foyer, C. H., Lam, H.-M., Nguyen, H. T., Siddique, K. H. M., Varshney, R. K., Colmer, T. D., Cowling, W., Bramley, H., Mori, T. A., Hodgson, J. M., Cooper, J. W., Miller, A. J., Kunert, K., Vorster, J., Cullis, C., Ozga, J. A., Wahlqvist, M. L., Liang, Y., Shou, H., ... Considine, M. J. (2016). Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature Plants*, 2(8), 16112. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2016.112>
- Friberg, H., Edel-Hermann, V., Faivre, C., Gautheron, N., Fayolle, L., Faloya, V., Montfort, F. & Steinberg, C., (2009). Cause and duration of mustard incorporation effects on soil-borne plant pathogenic fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 2075-2084. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.07.017>
- Fuchs, J. G., Thuerig, B., Brandhuber, R., Bruns, C., Finckh, M. R., Fliessbach, A., Mader, P., Schmidt, H., Vogt-Kaute, W., Wilbois, K.-P., & Lucius, T. (2014). Evaluation of the causes of legume yield depression syndrome using an improved diagnostic tool. *Applied Soil Ecology*, 79, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.02.013>
- Gangneux, C., Cannesan, M. A., Bressan, M., Castel, L., Moussart, A., Vicré-Gibouin, M., Driouich, A., Trinsoutrot-Gattin, I., & Laval, K. (2014). A sensitive assay for rapid detection and quantification of *Aphanomyces euteiches* in Soil. *Phytopathology* 104 (10): 1138–1147. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-13-0265-R>.
- Garbeva, P., Veen, J. A., & van Elsas, J. D. (2004). Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 243–270. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- Gastwirth, J. L., Gel, Y. R., Hui W. L., Lyubchich, V., Miao, W., & Noguchi, K. (2020). lawstat: Tools for Biostatistics, Public Policy, and Law. R package version 3.4. <https://CRAN.R-project.org/package=lawstat>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00413.x>
- Gerlach, R., & Nocerino, J. (2003). Guidance for obtaining representative laboratory analytical subsamples from particulate laboratory samples. *US Environmental Protection Agency*.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>
- GEVES (2020). The official catalogue of species and varieties of cultivated ultivated crops in France. <https://www.geves.fr/catalogue-france/>
- Gibert, S., Edel-Hermann, V., Gautheron, E., Gautheron, N., Sol, J. M., Capelle, G., Galland, R., Bardon-Debats, A., Lambert, C., & Steinberg, C. (2021a). First report of *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium redolens* and *Fusarium solani* causing root rot in pea in France. *Plant Disease*. Accepted for publication.
- Gibert, S., Edel-Hermann, V., Moussa Mcolo, R., Gautheron, E., Michel, J., Bernaud, E., Gautheron, N., Sol, J. M., Capelle, G., Galland, R., Bardon-Debats, A., Lambert, C., & Steinberg, C. (2021b). Risk assessment of *Aphanomyces euteiches* root rot disease: Quantification of low inoculum densities in field soils using droplet digital PCR. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02325-5>
- 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* 100 (3): 206–216. <https://doi.org/10.1139/cjss-2019-0133>.
- Gossen, B. D., Hwang, S. F., Conner, R. L. & Chang, K. F. (2011). Managing the *Ascochyta* blight complex on field pea in western Canada. *Insects and Diseases* 4: 135-141.

## Références

- Gossen, B. D., Conner, R. L., Chang, K.-F., Pasche, J. S., McLaren, D. L., Henriquez, M. A., Chatterton, S., & Hwang, S. F. (2016). Identifying and managing root rot of pulses on the Northern Great Plains. *Plant Disease*, 100, 1965–1978. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0184-FE>
- Gossen, B. D., Chatterton, S. G., & McLaren, D. L. (2017). Distribution of root rot on pea and lentil crops on the Canadian prairies, 2016. *Phytopathology*, 107(12), 105.
- Gossen, B. D., Al-Daoud, F., Dumonceaux, T., Dalton, J. A., Peng, G., Pageau, D., & McDonald, M. R. (2019). Comparison of techniques for estimation of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in soil. *Plant Pathology*, 68, 954–961. <https://doi.org/10.1111/ppa.13007>
- Gouy, M., Tannier, E., Comte, N., & Parsons, D. P. (2021). Seaview version 5: A multiplatform software for multiple sequence alignment, molecular phylogenetic analyses, and tree reconciliation. In K. Katoh (Ed.), *Multiple Sequence Alignment: Methods and Protocols* (pp. 241–260). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7_15)
- Grajal-Martin, M., J., et Muehlbauer F., J., (2002). « Genomic location of the Fw gene for resistance to Fusarium wilt race 1 in peas. » *Journal of Heredity* 93, no 4: 291-93. <https://doi.org/10.1093/jhered/93.4.291>.
- Gräler, B., Pebesma E., & Heuvelink, G. (2016). Spatio-temporal interpolation using gstat. *The R Journal* 8(1), 204-218
- Greenhalgh, F. C., Merriman, P. R., & Keane, P. J. (1988). Relative importance of root rots of subterranean clover caused by *Aphanomyces euteiches* and *Phytophthora clandestina*. *Plant Pathology*, 37, 344–350. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1988.tb02084.x>
- Gruijter, J. de, Brus, D. J., Bierkens, M. F. P., & Knotters, M. (2006). Sampling for natural resource monitoring. *Springer Science & Business Media*
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Hall, C., Hillen, C., & Robinson, J. G. (2017). Composition, nutritional value, and health benefits of pulses. *Cereal Chemistry*, 94(1), 11–31. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-03-16-0069-FI>
- Hamid, A., Bhat, N. A., Sofi, T. A., Bhat, K. A., & Asif, M. (2012). Management of root rot of pea (*Pisum sativum* L.) through bioagents. *African Journal of Microbiology Research*, 6(44), 7156–7161.
- Hartmann, A., Schmid, M., Tuinen, D. van, & Berg, G. (2009). Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*, 321(1–2), 235–257. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9814-y>
- Harveson, R. M., Pasche, J. S., Porter, L., Chen, W., & Burrows, M. (Eds.). (2021). *Compendium of Pea Diseases and Pests, Third Edition*. The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890546567>
- Heeger, F., Bourne, E. C., Baschien, C., Yurkov, A., Bunk, B., Spröer, C., Overmann, J., Mazzoni, C. J., & Monaghan, M. T. (2018). Long-read DNA metabarcoding of ribosomal RNA in the analysis of fungi from aquatic environments. *Molecular Ecology Resources*, 18(6), 1500–1514. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12937>
- Herdina, Neate, S., Jabaji, S., & Ophel-Keller, K. (2004). Persistence of DNA of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in soil as measured by a DNA-based assay. *FEMS Microbiology Ecology*, 47, 143–52. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00255-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00255-1)
- Heyman, F., Lindahl, B., Persson, L., Wikstrom, M., & Stenlid, J. (2007). Calcium concentrations of soil affect suppressiveness against *Aphanomyces* root rot of pea. *Soil Biology & Biochemistry*, 39, 2222–2229. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.03.022>
- Heyman, F. (2008). Root rot of pea caused by *Aphanomyces euteiches*: Calcium-dependent soil suppressiveness, molecular detection and population structure [PhD Thesis]. Dept. of Forest Mycology and Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences.

## Références

- Heyman, F., Blair, J. E., Persson, L., & Wikström, M. (2012). Root rot of pea and faba bean in southern Sweden caused by *Phytophthora pisi* sp. nov. *Plant Disease*, 97(4), 461–471. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-12-0823-RE>
- Heyman, F., Blair, J. E., Persson, L., & Wikstrom, M. (2013). Root rot of pea and faba bean in Southern Sweden caused by *Phytophthora pisi* sp. nov. *Plant Disease*, 97(4), 461–471. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-12-0823-RE>
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., ... & Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, 83, 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., et al. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 83:8604–8610.
- Hlavac, M. (2018). stargazer: Well-Formatted Regression and Summary Statistics Tables. R package version 5.2.1. <https://CRAN.R-project.org/package=stargazer>
- Hollaway, G. J., Bretag, T. W., & Price, T. V. (2007). The epidemiology and management of bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *psis*) of field pea (*Pisum sativum*) in Australia: A review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58(11), 1086–1099. <https://doi.org/10.1071/AR06384>
- 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.
- Hossain, S. (2013). Impact of *Brassicaceae* cover crops on pea root rot (*Aphanomyces euteiches*) in subsequent peas. <http://pub.epsilon.slu.se/10857/>
- Hothorn, T., Bretz, F. & Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal. Biometrische Zeitschrift* 50 (3): 346–363. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>.
- Huang, H. C., & Erickson, R. S. (2007). Effect of seed treatment with *Rhizobium leguminosarum* on *Pythium* damping-off, seedling height, root nodulation, root biomass, shoot biomass, and seed yield of pea and lentil. *Journal of Phytopathology*, 155(1), 31–37. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01189.x>
- Huang, L.-F., Song, L.-X., Xia, X.-J., Mao, W.-H., Shi, K., Zhou, Y.-H., & Yu, J.-Q. (2013). Plant-soil feedbacks and soil sickness: From mechanisms to application in agriculture. *Journal of Chemical Ecology*, 39(2), 232–242. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0244-9>
- Husson, F., Josse, J., & Lê, S. (2008). FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, 25. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Hwang, S. F., & Chakravarty, P. (1993). Integrated biological and chemical control of *Rhizoctonia* root rot of field pea by *Gliocladium virens* and a fungicide. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz*, 100(3), 308–316.
- Hwang, S. F., Gossen, B. D., Chang, K. F., Turnbull, G. D. & Howard, R. J. (2001). Effect of seed damage and metalaxyl seed treatment on *Pythium* seedling blight and seed yield of field pea. *Canadian Journal of Plant Science* 81 (3): 509–517.
- Hwang, S. F., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Chang, K. F., Howard, R. J., & Thomas, A. G. (2000). Effect of temperature, seeding date, fungicide seed treatment and inoculation with *Fusarium avenaceum* on seedling survival, root rot severity and yield of lentil. *Canadian Journal of Plant Science*, 80(4), 899–907.
- Hwang, S. F., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Chang, K. F., Howard, R. J., & Thomas, A. G. (2000). Seeding date, temperature, and seed treatment affect *Pythium* seedling blight of field pea. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22(4), 392–399.

## Références

- Hwang, S. F., Gossen, B. D., Conner, R. L., Chang, K. F., Turnbull, G. D., Lopetinsky, K. & Howard, R. J. (2007). Management strategies to reduce losses caused by *Rhizoctonia* seedling blight of field pea. *Canadian Journal of Plant Science* 87 (1): 145–155.
- Infantino, A., Kharrat, M., Riccioni, L., Coyne, C. J., McPhee, K. E., & Grunwald, N. J. (2006). Screening techniques and sources of resistance to root diseases in cool season food legumes. *Euphytica*, 147(1/2), 201–221. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-6963-z>
- Jain, A., Singh, A., Singh, S., & Singh, H. B. (2015a). Biological management of *Sclerotinia sclerotiorum* in pea using plant growth promoting microbial consortium. *Journal of Basic Microbiology*, 55(8), 961–972. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400628>
- Jain, S., Weeden, N. F., Kumar, A., Chittem, K. & McPhee, K. (2015). Functional codominant marker for selecting the Fw gene conferring resistance to *Fusarium* wilt race 1 in pea. *Crop Science* 55 (6): 2639–2646.
- 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 & Biochemistry*, 39, 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.07.001>
- Jenkins, S. (2018). Examining identity, phylogeny and Pathogenicity factors in *Fusarium* species affecting pea [Phd, University of Warwick]. <http://webcat.warwick.ac.uk/record=b3420697~S15>
- Jenkins, S., Taylor, A., Jackson, A. C., Armitage, A. D., Bates, H. J., Mead, A., Harrison, R. J., & Clarkson, J. P. (2021). Identification and expression of secreted in xylem pathogenicity genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 593140. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.593140>
- Jensen, E. S., Carlsson, G., & Hauggaard-Nielsen, H. (2020). Intercropping of grain legumes and cereals improves the use of soil N resources and reduces the requirement for synthetic fertilizer N: A global-scale analysis. *Agronomy for Sustainable Development*, 40(1), 5. <https://doi.org/10.1007/s13593-020-0607-x>
- Jésus Junior, W. C., Paula Júnior, T. J., Lehner, M. S., & Hau, B. (2014). Interactions between foliar diseases: Concepts and epidemiological approaches. *Tropical Plant Pathology*, 39, 1–18. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000100002>
- Jezierny, D., Mosenthin, R., & Bauer, E. (2010). The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 157(3–4), 111–128. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.001>
- Jha, P. K., & Jalali, B. L. (2006). Biocontrol of pea root rot incited by *Fusarium solani* f. sp. *pisii* with rhizosphere mycoflora. *Indian Phytopathology*, 59(1), 41–43.
- Jones, F. R., & Drechsler, C. (1925). Root rot of peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches* (n. sp.). *Journal of Agricultural Research*, 30, 293–325.
- Juang, K. W., Lee, D. Y., & Ellsworth, T. R. (2001). Using rank-order geostatistics for spatial interpolation of highly skewed data in a heavy-metal contaminated site. *Journal of Environmental Quality*, 30(3), 894–903. <https://doi.org/10.2134/jeq2001.303894x>
- Kaiser, W., Okhovat, M., & Mossaheb.gh. (1971). Etiology and control of damping-off and root rot of pea (*Pisum sativum*). *Plant Disease Reporter*, 55(3), 244–248.
- Kapoor, A. S., Paul, Y. S., & Singh, A. (2006). Integrated management of white rot and root rot-wilt disease complex of pea. *Indian Phytopathology*, 59(4), 467–474.
- Karlsson, I., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Durling, M.B., Kolseth, A.K., Steinberg, C., Persson, P., Friberg, H. (2016). Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 491–501. <https://doi.org/10.1128/aem.02748-15>
- Kassambara, A. (2020). *ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots* (0.4.0) [Computer software]. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>

## Références

- Kassambara, A., & Mundt, F. (2020). *factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses* (1.0.7) [Computer software]. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>
- Kassambara, A. (2021). *Rstatix* [R]. <https://github.com/kassambara/rstatix> (Original work published 2018)
- Kassambara, A. (2021). Rstatix: Pipe-Friendly Framework for basic statistical tests. R package version 0.4.0. <https://cran.r-project.org/web/packages/rstatix/index.html>.
- Kerr, A. (1963). The root rot *Fusarium* wilt complex of peas. *Australian Journal of Biological Sciences*, 16(1), 55–69.
- Kerr, A. (1964). The influence of soil moisture on infection of peas by *Pythium ultimum*. *Australian Journal of Biological Sciences*, 17(3), 676–685.
- Kerry, R., Oliver, M. A., & Frogbrook, Z. L. (2010). Sampling in precision agriculture. In M. A. Oliver (Ed.), *Geostatistical Applications for Precision Agriculture* (pp. 35-63). doi 10.1007/978-90-481-9133-8\_2
- Kerry, R., Ortiz, B. V., Ingram, B. R., & Scully, B. T. (2017). A spatio-temporal investigation of risk factors for aflatoxin contamination of corn in southern Georgia, USA using geostatistical methods. *Crop Protection*, 94, 144-158. doi:10.1016/j.cropro.2016.12.005
- Khan J., Khan M., Amin M. 1998. Distribution and integrated management of root rot of pea in Malakand division. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 1(4): 267–270.
- Kibblewhite, M. G., Ritz, K., & Swift, M. J. (2008). Soil health in agricultural systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1492), 685. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2178>
- Kim, W.-G., Hong, S.-K., & Lee, S.-Y. (2006). Occurrence of *Sclerotinia* rot in four leguminous crops caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *The Plant Pathology Journal*, 22(1), 16–20. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2006.22.1.016>
- Kim, T. G., & Knudsen, G. R. (2013). Relationship between the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* and the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f.sp. *pisi*. *Applied Soil Ecology*, 68, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.03.009>
- Kjoller, R., & Rosendahl, S. (1996). The presence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* influences enzymatic activities of the root pathogen *Aphanomyces euteiches* in pea roots. *Mycorrhiza* 6 (6): 487–491.
- Kjoller, R., & Rosendahl, S. (1998). Enzymatic activity of the mycelium compared with oospore development during infection of pea roots by *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, 88, 992–996. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.9.992>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Köljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F. S., Bahram, M., Bates, S. T., Bruns, T. D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T. M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G. W., Hartmann, M., Kirk, P. M., Kohout, P., ... Larsson, K.-H. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 22(21), 5271–5277. <https://doi.org/10.1111/mec.12481>
- Kraft, J., & Roberts, D. (1969). Influence of soil water and temperature on pea root rot complex caused by *Pythium ultimum* and *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Phytopathology*, 59(2), 149-152.
- Kraft, J. M. (1990). Detection of *Aphanomyces euteiches* in Field Soil from Northern Idaho by a Wet-Sieving/Baiting Technique. *Plant Disease*, 74, 716. <https://doi.org/10.1094/PD-74-0716>
- Kraft, J. M., Haware, M. P., Jimenez-Diaz, R. M., Bayaa, B., & Harrabi, M. (1994). Screening techniques and sources of resistance to root rots and wilts in cool season food legumes. *Euphytica*, 73(1/2), 27–39. <https://doi.org/10.1007/BF00027179>

## Références

- Kraft, J. M., & Pflieger, F. L. (2001). *Compendium of pea diseases and pests*. (J. M. Kraft & F. L. Pflieger, Eds.). American Phytopathological Society (APS Press).
- Kumar, D., & Dubey, S. C. (2001). Management of collar rot of pea by the integration of biological and chemical methods. *Indian Phytopathology*, *54*(1), 62–66.
- Kunadiya, M. B., Burgess, T. I., Dunstan, W. A., White, D., & Hardy, G. E. S., (2020). Persistence and degradation of *Phytophthora cinnamomi* DNA and RNA in different soil types. *Environmental DNA*, *3*, 92-104. <https://doi.org/10.1002/edn3.127>
- Labrousse, F. (1933). Notes de pathologie végétale. *Revue de pathologie végétale et d'Entomologie agricole* *19*, 71–84.
- Lamari, L., & Bernier, C. C. (1985). Etiology of seedling blight and root rot of faba bean (*Vicia faba*) in Manitoba. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *7*, 139–145. <https://doi.org/10.1080/07060668509501490>
- Lamichhane, J. R., & Venturi, V. (2015). Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: A growing trend. *Frontiers in Plant Science*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00385>
- Lamichhane, J. R., Durr, C., Schwanck, A. A., Robin, M.-H., Sarthou, J.-P., Cellier, V., Messean, A., & Aubertot, J.-N. (2017). Integrated management of damping-off diseases. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *37*(2), 10. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0417-y>
- Lavaud, C., Lesné, A., Piriou, C., Le Roy, G., Boutet, G., Moussart, A., Poncet, C., Delourme, R., Baranger, 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*, 2273–2288. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2583-0>
- Lavaud, C., Baviere, M., Le Roy, G., Herve, 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*, 166. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0822-4>
- Le Floch, G., Benhamou, N., Mamaca, E., Salerno, M.-I., Tirilly, Y., & Rey, P. (2005). Characterisation of the early events in atypical tomato root colonisation by a biocontrol agent, *Pythium oligandrum*. *Plant Physiology and Biochemistry* *43* (1): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.10.005>.
- Le Floch, G., Tambong, J., Vallance, J., Tirilly, Y., Lévesque, A. & Rey, P. (2007). Rhizosphere persistence of three *Pythium oligandrum* strains in tomato soilless culture assessed by DNA microarray and real-time PCR. *FEMS Microbiology Ecology* *61* (2): 317–326. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00348.x>.
- Le May, C., Potage, G., Andrivon, D., Tivoli, B., & Outreman, Y. (2009). Plant disease complex: antagonism and synergism between pathogens of the Ascochyta blight complex on pea. *Journal of Phytopathology*, *157*, 715–721. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01546.x>
- Le May, C., Onfroy, C., Moussart, A., Andrivon, D., Baranger, A., Pilet-Nayel, M. L., & Vandemark, G. (2018). Genetic structure of *Aphanomyces euteiches* populations sampled from United States and France pea nurseries. *European Journal of Plant Pathology*, *150*(2), 275–286. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1274-x>
- Levenfors, J. (2003). Soil-borne pathogens in intensive legume cropping—*Aphanomyces* spp. and root rots. In *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae—Agraria* (p. 54 pp. + papers I-IV). Sveriges Lantbruksuniversitet (Swedish University of Agricultural Sciences).
- Lewis, G. P., Schrire, B., Mackinder, B., & Lock, M. (2005). *Legumes of the World* (Vol. 577). Royal Botanic Gardens, Kew Richmond, UK. <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/1774352>
- Li, F., Chen, L., Redmile-Gordon, M., Zhang, J., Zhang, C., Ning, Q., & Li, W. (2018). *Mortierella elongata*'s roles in organic agriculture and crop growth promotion in a mineral soil. *Land Degradation & Development*, *29*(6), 1642–1651. <https://doi.org/10.1002/ldr.2965>



## Références

- Li, J., Guo, C., Jian, S., Deng, Q., Yu, C.-L., Dzantor, K. E., & Hui, D. (2018). Nitrogen fertilization elevated spatial heterogeneity of soil microbial biomass carbon and nitrogen in switchgrass and gamagrass croplands. *Scientific Reports*, *8*(1), 1734. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18486-5>
- Li, J. (2019). Sampling soils in a heterogeneous research plot. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, *143*, e58519. <https://doi.org/10.3791/58519>
- Lievens, B., & Thomma B., P., H., J. (2007). Quantification in multiplex format as a challenging goal for plant pathogen molecular diagnostic assays. *Pest Technology* *1*, no 1: 17-26.
- Lin, Y. S., Sun, W., & Wong, P. H. (1984). *Fusarium* root rot and wilt of garden peas in Taiwan. *Journal of Agricultural Research of China*, *33*(4), 395–405.
- Lin, Y. S., Gung, Y. H., Huang, J. H. (2002). Control of Pythium root rot of vegetable pea seedlings in soilless cultural system. *Acta Horticulturae*, 221-29. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.578.27>
- Lin, Y.H., Shen, S.M., Wen, C.J., Lin, Y.J., Chang, T. De, Chu, S.C. (2021). Molecular detection assays for rapid field-detection of rice sheath blight. *Frontiers in Plant Sciences* *11*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552916>
- Liu, J., Li, C., Muhae-Ud-Din, G., Liu, T., Chen, W., Zhang, J., & Gao, L. (2020). Development of the Droplet Digital PCR to detect the teliospores of *Tilletia controversa* Kuhn in the soil with greatly enhanced sensitivity. *Frontiers Microbiology*, *11*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00004>
- Loit, K., Adamson, K., Bahram, M., Puusepp, R., Anslan, S., Kiiker, R., Drenkhan, R., & Tedersoo, L. (2019). Relative performance of MinION (Oxford Nanopore Technologies) versus Sequel (Pacific Biosciences) third-generation sequencing instruments in identification of agricultural and forest fungal pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(21), e01368-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01368-19>
- Madic, J., Zocevic, A., Senlis, V., Fradet, E., Andre, B., Muller, S., Dangla, R., & Droniou, M. E. (2016). Three-color crystal digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification*, *10*, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.10.002>
- Madic, J., Jovelet, C., Lopez, J., André, B., Fatien, J., Miran, I., Honoré, A., Lezquita, L., Besse, B., Lacroix, L., & Droniou, M. (2018). EGFR C797S, EGFR T790M and EGFR sensitizing mutations in non-small cell lung cancer revealed by six-color crystal digital PCR. *Oncotarget*, *9*(100), 37393–37406. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26446>
- Magrini, M.-B., Anton, M., Cholez, C., Corre-Hellou, G., Duc, G., Jeuffroy, M.-H., Meynard, J.-M., Pelzer, E., Voisin, A.-S., & Walrand, S. (2016). Why are grain-legumes rarely present in cropping systems despite their environmental and nutritional benefits? Analyzing lock-in in the French agrifood system. *Ecological Economics*, *126*, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2016.03.024>
- Maldonado-Gonzalez, M. M., Martinez-Diz, M. D., Andres-Sodupe, M., Bujanda, R., Diaz-Losada, E., & Gramaje, D. (2020). Quantification of *Cadophora luteo-olivacea* from grapevine nursery stock and vineyard soil using droplet digital PCR. *Plant Disease*, *104*, 2269–2274. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-2035-RE>
- Malvick, D., Percich, J., Pflieger, F., Givens, J., & Williams, J. (1994). Evaluation of methods for estimating inoculum potential of *Aphanomyces-Euteiches* in soil. *Plant Disease*, *78*, 361–365. <https://doi.org/10.1094/PD-78-0361>
- Mandeel, Q. A. (2006). Influence of plant root exudates, germ tube orientation and passive conidia transport on biological control of *Fusarium* wilt by strains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Mycopathologia* *161* (3), 173–182. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0211-2>
- Manning, M., & Menzies, S. (1980). Root-rot of peas in New-Zealand caused by *Aphanomyces-euteiches*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, *23*(2), 263–265.

## Références

- Massart, S., Perazzolli, M., Höfte, M., Pertot, I., & Jijakli, M. H. (2015). Impact of the omic technologies for understanding the modes of action of biological control agents against plant pathogens. *BioControl*, *60*(6), 725–746. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9686-z>
- Masson-Boivin, C., & Sachs, J. L. (2018). Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—The roots of a success story. *Current Opinion in Plant Biology*, *44*, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.001>
- Matheron, G. (1965). Les variables régionalisées et leur estimation une application de la théorie des fonctions aléatoires aux sciences de la nature. Masson
- Matheson, C. D., Gurney, C., Esau, N., & Lehto, R. (2010). Assessing PCR inhibition from humic substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, *3*, 38–45. <https://doi.org/10.2174/1874940201003010046>
- Mathew, F. M., Lamppa, R. S., Chittam, K., Chang, Y. W., Botschner, M., Kinzer, K., Goswami, R. S., & Markell, S. G. (2012). Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* Isolates affecting *Pisum sativum* in North Dakota. *Plant Disease*, *96*(5), 666–672. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-11-0087>
- Matuo, T., & Snyder, W. (1972). Host virulence and *Hypomyces* stage of *Fusarium solani* f sp *pisi*. *Phytopathology*, *62*(7), 731–735. <https://doi.org/10.1094/Phyto-62-731>
- Matuo, T., & Snyder, W. (1973). Use of morphology and mating populations in identification of *Formae speciales* in *Fusarium solani*. *Phytopathology*, *63*(5), 562–565. <https://doi.org/10.1094/Phyto-63-562>
- Mayo-Prieto, S., Marra, R., Vinale, F., Rodriguez-Gonzalez, A., Woo, S. L., Lorito, M., Gutierrez, S., & Casquero, P. A. (2019). Effect of *Trichoderma velutinum* and *Rhizoctonia solani* on the metabolome of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(3), 549. <https://doi.org/10.3390/ijms20030549>
- Mazzola, M., & Freilich, S. (2017). Prospects for biological soilborne disease control: application of indigenous versus synthetic microbiomes. *Phytopathology*, *107*(3), 256–263. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-16-0330-RVW>
- McKinnon Edwards, S. (2020). lemon: Freshing Up your 'ggplot2' Plots. R package version 0.4.5. <https://CRAN.R-project.org/package=lemon>
- McPhee, K. E., Inglis, D. A., Gundersen, B. & Coyne, C. J. (2012). Mapping QTL for *Fusarium* wilt race 2 partial resistance in pea (*Pisum sativum*). *Plant Breeding* *131* (2): 300–306. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01938.x>.
- Melzer, M. S., Yu, H., Labun, T., Dickson, A., & Boland, G. J. (2016). Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. from field crops in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *38*(3), 367–374. <https://doi.org/10.1080/07060661.2016.1199596>
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H. M., Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* *332* (6033): 1097–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1203980>
- Merzoug, A., Belabid, L., Youcef-Benkada, M., Benfreha, F., & Bayaa, B. (2014). Pea *Fusarium* wilt races in western Algeria. *Plant Protection Science*, *50*(2), 70–77.
- Metzger, R., Belbahri, L., Calmin, G., Badin, N., & Lefort, F. (2007). First report of *Pythium intermedium* causing root rot on *Rosa canina* rootstock in France. *Plant Disease*, *91*(8), 1055–1055. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-8-1055B>
- Mihail, J., & Alcorn, S. (1987). *Macrophomina phaseolina*—Spatial patterns in a cultivated soil and sampling strategies. *Phytopathology*, *77*(8), 1126–1131. <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-1126>
- Minasny, B., & McBratney, Alex. B. (2005). The Matérn function as a general model for soil variograms. *Geoderma*, *128*(3), 192–207. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.04.003>
- Moparthi, S., Burrows, M., Mgbechi-Ezeri, J. & Agindotan, B. (2021). *Fusarium* spp. associated with root rot of pulse crops and their cross-pathogenicity to cereal crops in Montana. *Plant Disease* *105* (3): 548–557. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-20-0800-RE>.

## Références

- Moreira, G. M., Abreu, L. M., Carvalho, V. G., Schroers, H.-J., & Pfenning, L. H. (2016). Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. *Mycological Progress*, 15(10), 1031–1039. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1224-6>
- 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(3), 321–333. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9297-y>
- Moussart, A., Wicker, E., Delliou, B. le, Abelard, J. M., Esnault, R., Lemarchand, E., Rouault, F., Guennou, F. le, Pilet-Nayel, M. L., Baranger, A., Rouxel, F., & Tivoli, B. (2009). Spatial distribution of *Aphanomyces euteiches* inoculum in a naturally infested pea field. *European Journal of Plant Pathology*, 123(2), 153–158. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9350-x>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02679.x>.
- 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. <https://doi.org/10.1094/PD-74-0651>
- Nayyar, A., Hamel, C., Lafond, G., Gossen, B. D., Hanson, K., & Germida, J. (2009). Soil microbial quality associated with yield reduction in continuous-pea. *Applied Soil Ecology*, 43(1), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.06.008>
- Negi, Y. K., Garg, S. K., & Kumar, J. (2008). Plant growth promoting and biocontrol activities of cold-tolerant *Pseudomonas fluorescens* isolates against root rot in pea. *Indian Phytopathology* 61 (4): 461–470.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press.
- Nelson, E. B. (2018). The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil*, 422(1–2), 7–34. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3289-7>
- Nemecek, T., von Richthofen, J.-S., Dubois, G., Casta, P., Charles, R., & Pahl, H. (2008). Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *European Journal of Agronomy*, 28(3), 380–393.
- Nilsson, R. H., Taylor, A. F. S., Adams, R. I., Baschien, C., Bengtsson-Palme, J., Cangren, P., Coleine, C., Daniel, H.-M., Glassman, S. I., Hirooka, Y., Irinyi, L., Iršénaitė, R., Martin-Sanchez, P. M., Meyer, W., Oh, S.-Y., Sampaio, J. P., Seifert, K. A., Sklenář, F., Stubbe, D., ... Abarenkov, K. (2018). Taxonomic annotation of public fungal ITS sequences from the built environment – a report from an April 10–11, 2017 workshop (Aberdeen, UK). *MycKeys*, 28, 65–82. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.28.20887>
- Nilsson, R. H., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P., & Tedersoo, L. (2019). Mycobiome diversity: High-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 95–109. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>
- O'Donnell, K., & Gray, L. E. (1995). Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(5), 709–716. <https://doi.org/10.1094/mpmi-8-0709>
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2044–2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
- O'Donnell, K. (2000). Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca* *Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 92(5), 919–938. <https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061237>
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Aberra, D., Kistler, H. C., Aoki, T., Orwig, N., Kimura, M., Bjørnstad, S., & Klemsdal, S. S. (2008). Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen

## Références

- within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 45(11), 1514–1522. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.09.002>
- O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A., Riley, R., Zitomer, N. C., Colyer, P., Waalwijk, C., Lee, T. van der, Moretti, A., Kang, S., Kim, H.-S., Geiser, D. M., Juba, J. H., Baayen, R. P., Cromey, M. G., Bithell, S., ... Sarver, B. A. J. (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 46(12), 936–948. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.08.006>
- O'Donnell, K., Ward, T., J., Robert, V., A., R., G., Crous, P., W., Geiser, D., M., and Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43(5), 583-95. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>.
- Oja, J., Kohout, P., Tedersoo, L., Kull, T., & Kõljalg, U. (2015). Temporal patterns of orchid mycorrhizal fungi in meadows and forests as revealed by 454 pyrosequencing. *New Phytologist* 205(4), 1608-18. <https://doi.org/10.1111/nph.13223>.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., & Wagner, H. (2020). *vegan: Community Ecology Package* (2.5-7) [Computer software]. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Okubara, P. A., Harrison, L. A., Gatch, E. W., Vandemark, G., Schroeder, K. L., & du Toit, L. J. (2013). Development and evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. *Plant Disease*, 97(7), 927–937. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0317-RE>
- Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., L'Haridon, F. & Alabouvette, C. (2006). Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2): 1523–1531. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1523-1531.2006>.
- Oliver, M. A., & Webster, R. (2014). A tutorial guide to geostatistics: Computing and modelling variograms and kriging. *CATENA*, 113, 56–69. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2013.09.006>
- Ophel-Keller, K., McKay, A., Hartley, D., Herdina, & Curran, J. (2008). Development of a routine DNA-based testing service for soilborne diseases in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 37(3), 243–253. <https://doi.org/10.1071/AP08029>
- Oyarzun, P., & Loon, J. van. (1989). *Aphanomyces euteiches* as a component of the complex of foot and root pathogens of peas in Dutch soils. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95(5), 259–264. <https://doi.org/10.1007/BF01977730>
- Oyarzun, P. (1993). Bioassay to assess root-rot in pea and effect of root-rot on yield. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99(2), 61–75. <https://doi.org/10.1007/BF01998474>
- Oyarzun, P., Gerlagh, M., & Hoogland, A. E. (1993a). Pathogenic fungi involved in root rot of peas in the Netherlands and their physiological specialization. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99(1), 23–33. <https://doi.org/10.1007/BF01974782>
- Oyarzun, P., Gerlagh, M., & Hoogland, A. E. (1993b). 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. <https://doi.org/10.1007/BF01974783>
- Oyarzun, P. J., Postma, J., Luttikholt, A. J. G., & Hoogland, A. E. (1994). Biological control of foot and root rot in pea caused by *Fusarium solani* with nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates. *Canadian Journal of Botany* 72 (6): 843–852.
- Oyarzun, P. J., Dijst, G., Zoon, F. C., & Maas, P. W. T. (1997). Comparison of soil receptivity to *Thielaviopsis basicola*, *Aphanomyces euteiches*, and *Fusarium solani* f. sp. *pisi* causing root rot in pea. *Phytopathology*, 87(5), 534–541. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.5.534>

## Références

- Oyarzun, P. J., Gerlagh, M., & Zadoks, J. C. (1998). Factors associated with soil receptivity to some fungal root rot pathogens of peas. *Applied Soil Ecology*, 10(1/2), 151–169. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(98\)00042-0](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(98)00042-0)
- Palma-Guerrero, J., Chancellor, T., Spong, J., Canning, G., Hammond, J., McMillan, E. V., & Hammond-Kosack, E. K. (2021). Take-all disease: new insights into an important wheat root pathogen. *Trends in Plant Science* 26 (8): 836-848. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.02.009>
- Pan, F., Xue, A. G., McLaughlin, N. B., Li, S., Xu, Y., Zhao, D., & Qu, H. (2013). Colonization of *Clonostachys rosea* on soybean root grown in media inoculated with *Fusarium graminearum*. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 63(6), 564–569. <https://doi.org/10.1080/09064710.2013.816768>
- Pandey, A. K., Gopinath, K. A., Chattacharya, P., Hooda, K. S., Sushil, S. N., Kundu, S., Selvakumar, G., & Gupta, H. S. (2006). Effect of source and rate of organic manures on yield attributes, pod yield and economics of organic garden pea (*Pisum sativum* subsp. Hortense) in North West Himalaya. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 76(4), 230–234.
- Papavizas, G. C., & Ayers, W. A. (1974). *Aphanomyces* species and their root diseases in pea and sugarbeet: a review. Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Report N°:1485.
- Parke, J. L. (1991). Efficacy of *Pseudomonas cepacia* AMMD and *Pseudomonas fluorescens* PRA25 in biocontrol of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of pea. *Bulletin SROP* 14 (8): 30–33.
- Parker, M., Melzer, M., Boland, G. & Broders, K. (2013). Diversity of *Rhizoctonia solani* associated with canola, wheat, and pea in Alberta, Manitoba, and Saskatchewan. *Phytopathology* 103 (6): 111–111.
- Paul, B. (2002). *Pythium terrestris*, a new species isolated from France, its ITS region, taxonomy and its comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters*, 212(2), 255–260. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00756-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00756-5)
- Paulo, J., Ribeiro, J. R., Diggle, P. J., Schlather, M., Bivand, R., & Ripley, B. (2020). geoR: Analysis of geostatistical data. R package version 1.8-1. <https://CRAN.R-project.org/package=geoR>
- Pebesma, E. J. (2004). Multivariable geostatistics in S: the gstat package. *Computers and Geosciences*, 30: 683–691
- Pebesma, E. J. (2018). Simple features for R: Standardized support for spatial vector data. *The R Journal* 10 (1), 439-446, <https://doi.org/10.32614/RJ-2018-009>
- Penton, C. R., Gupta, V. S. R., Yu, J. L., & Tiedje, J. M. (2016). Size matters: assessing optimum soil sample size for fungal and bacterial community structure analyses using high throughput sequencing of rRNA gene amplicons. *Frontiers in Microbiology*, 7, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00824>
- Peoples, M. B., Brockwell, J., Herridge, D. F., Rochester, I. J., Alves, B. J. R., Urquiaga, S., Boddey, R. M., Dakora, F. D., Bhattarai, S., Maskey, S. L., Sampet, C., Rerkasem, B., Khan, D. F., Hauggaard-Nielsen, H., & Jensen, E. S. (2009). The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*, 48(1–3), 1–17. <https://doi.org/10.1007/BF03179980>
- Persson, L., Bodker, L., & Larsson-Wikstrom, M. (1997). Prevalence and pathogenicity of foot and root rot pathogens of pea in southern Scandinavia. *Plant Disease* 81 (2): 171–174. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.171>
- Persson, L. (1998). Soil suppressiveness to *Aphanomyces* root rot of pea. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae - Agraria*, 131, 35 pp.
- Persson, L., Larsson-Wikstrom, M., & Gerhardson, B. (1999). Assessment of soil suppressiveness to *Aphanomyces* root rot of pea. *Plant Disease* 83 (12): 1108-1112. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.12.1108>
- Persson, L., & Olsson, S. (2000). Abiotic characteristics of soils suppressive to *Aphanomyces* root rot. *Soil Biology & Biochemistry*, 32(8/9), 1141–1150. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00030-4)

## Références

- Peters, R. D., & Grau, C. R. (2002). Inoculation with non-pathogenic *Fusarium solani* increases severity of pea root rot caused by *Aphanomyces euteiches*. *Plant Disease*, 86(4), 411–414. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.4.411>
- Petersen, L., Minkinen, P., & Esbensen, K. H. 2005. Representative sampling for reliable data analysis: theory of sampling. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 77 (1), 261–277. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.09.013>.
- Pfender, W. F., Rouse, D. I., Hagedorn, D. J. (1981). A “most probable number” method for estimating inoculum density of *Aphanomyces euteiches* in naturally infested soil. *Phytopathology*, 71, 1169–1172. <https://doi.org/10.1094/Phyto-71-1169>
- Pfender, W., & Hagedorn, D. (1982). *Aphanomyces-Euteiches* f sp *phaseoli*, a causal agent of bean root and hypocotyl rot. *Phytopathology*, 72, 306–310. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-306>.
- Pieczarka, D. J., & Abawi, G. S. (1977). Synergistic interaction between *Phythium ultimum* and *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* and antagonistic interaction between *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* on snap beans. *Proceedings of the American Phytopathological Society*.
- Pieczarka, D. J., & Abawi, G. S. (1978). Influence of soil water potential and temperature on severity of *Pythium* root rot of snap beans. *Phytopathology*, 68(5), 766–772.
- Pieta, D. & Pastucha, A. (2008). Antagonistic bacteria and their post-culture liquids in the protection of pea (*Pisum sativum* L.) from diseases. *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus* 7 (4): 31–42.
- Pietramellara, G., Ascher-Jenull, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G., & Nannipieri, P. (2008). Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45, 219–235. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>
- Plassart, P., Terrat, S., Thomson, B., Griffiths, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., Regnier, T., Nowak, V., Bailey, M., Lemanceau, P., Bispo, A., Chabbi, A., Maron, P.-A., Mougél, C., & Ranjard, L. (2012). Evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community structure. *PLOS ONE*, 7(9), e44279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044279>
- Pollard, A.T., Okubara, P.A. (2019). Real-time PCR quantification of *Fusarium avenaceum* in soil and seeds. *Journal of Microbiological Methods*. 157, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.12.009>
- Poole, G. J., Harries, M., Hüberli, D., Miyani, S., MacLeod, W. J., Lawes, R., & McKay, A. (2015). Predicting cereal root disease in Western Australia using soil DNA and environmental parameters. *Phytopathology*, 105(8), 1069–1079. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-14-0203-R>
- Porter, L. D., Kraft, J. M. & Grunwald, N. J. (2014). Release of pea germplasm with *Fusarium* resistance combined with desirable yield and anti-lodging traits. *Journal of Plant Registrations* 8 (2): 191–194. <https://doi.org/10.3198/jpr2013.07.0041crg>.
- Pulakkatu-Thodi, I., Reisig, D. D., Greene, J. K., Reay-Jones, F. P. F., & Toews, M. D. (2014). Within-field spatial distribution of stink bug (Hemiptera: Pentatomidae)-Induced boll injury in commercial cotton fields of the Southeastern United States. *Environmental Entomology*, 43(3), 744–752. <https://doi.org/10.1603/EN13332>
- Quillévéré, A., Le Roy, G., Moussart, A., Pilet-Nayel, M.-L., & Le May, C. (2016). *Genetic and phenotypic diversity of pea isolates of Aphanomyces euteiches in France*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28355.40487>
- Quillévéré-Hamard, A., Le Roy, G., Moussart, A., Baranger, A., Andrivon, D., Pilet-Nayel, M.-L., & Le May, C. (2018). Genetic and pathogenicity diversity of *Aphanomyces euteiches* populations from pea-growing regions in France. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1673. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01673>
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Alabouvette, C., Steinberg, C., & Moënne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 321: 341–361. doi:10.1007/s11104-008-9568-6

## Références

- Racki, N., Dreo, T., Gutierrez-Aguirre, I., Blejec, A., & Ravnkar, M. (2014). Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods*, *10*, 42. <https://doi.org/10.1186/s13007-014-0042-6>
- Ratnadass, A., Fernandes, P., Avelino, J., & Habib, R. (2012). Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *32*(1), 273–303. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0022-4>
- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, *97*(1), 84–98. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832842>
- Reiling, T., King, T., & Fields, R. (1960). Soil indexing for pea root rot and the effect of root rot on yield. *Phytopathology*, *50*, 287–290.
- Reyes, A. A. (1980). Pea root rot development and associated pathogens in Ontario fields. *Plant Disease*, *64*(4), 392–393.
- Ria, R., Khan, A., Khan W. J., Jabeen Z., Yasmin H., Naz R., Nosheen A. & Hassan M. N. (2021). Vegetable associated *Bacillus* spp. Suppress the pea (*Pisum sativum* L.) root rot caused by *Fusarium solani*. *Biological Control* 158 (July): 104610. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104610>.
- Riaz, R., Khan, A., Khan, W. J., Jabeen, Z., Yasmin, H., Naz, R., Nosheen, A., & Hassan, M. N. (2021). Vegetable associated *Bacillus* spp. suppress the pea (*Pisum sativum* L.) root rot caused by *Fusarium solani*. *Biological Control*, *158*, 104610. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104610>
- Riit, T., Tedersoo, L., Drenkhan, R., Runno-Paurson, E., Kokko, H., & Anslan, S. (2016). Oomycete-specific ITS primers for identification and metabarcoding. *Mycokeys*, *14*, 17–30. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.14.9244>
- Riit, T., Tedersoo, L., Drenkhan, R., Runno-Paurson, E., Kokko, H., & Anslan, S. (2018). Corrigendum for: “Oomycete-specific ITS primers for identification and metabarcoding” published in MycoKeys, doi: 10.3897/mycokeys.14.9244. *Mycokeys*, *41*, 119-120.
- Ristaino, J. B., & Gumpertz, M. L. (2000). New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology*, *38*, 541-+. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.541>
- Roberts, E. A., Sheley, R. L., & Lawrence, R. L. (2004). Using sampling and inverse distance weighted modeling for mapping invasive plants. *Western North American Naturalist*, *64*(3), 312-323.
- Robideau, G. P., De Cock, , A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., Désaulniers, N., Eggertson, Q. A., et al. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, *11*, 1002–1011. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- Rocha, L. O., Laurence, M. H., Ludowici, V. A., Puno, V. I., Lim, C. C., Tesoriero, L. A., Summerell, B. A., & Liew, E. C. Y. (2016). Putative effector genes detected in *Fusarium oxysporum* from natural ecosystems of Australia. *Plant Pathology*, *65*(6), 914–929. <https://doi.org/10.1111/ppa.12472>
- Rosendahl, S. (1985). Interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. *Phytopathologische Zeitschrift* *114* (1): 31–40.
- Ruan, Y. J., Kotraiah, V., & Straney, D. C. (1995). Flavonoids stimulate spore germination in *Fusarium solani* pathogenic on legumes in a manner sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *8*(6), 929–938. <https://doi.org/10.1094/MPMI-8-0929>
- Rubiales, D., Fondevilla, S., Chen, W., Gentzbittel, L., Higgins, T. J. V., Castillejo, M. A., Singh, K. B., & Rispaill, N. (2015). Achievements and challenges in legume breeding for pest and disease resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *34*(1–3), 195–236. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.898445>

## Références

- Safarieskandari, S. (2019). *Towards development of a disease risk model for pea root rot disease. Education and research archive*. PhD thesis, University of Alberta. <https://doi.org/10.7939/r3-yzfv-6k82>
- Safarieskandari, S., Chatterton, S. and Hall L. M. (2021). Pathogenicity and host range of *Fusarium* species associated with pea root rot in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 43 (1): 162–171. <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1730442>.
- Sagar, V., & Sugha, S. K. (1997). Role of individual and combined inocula on the development of pea root rot. *Indian Phytopathology*, 50(4), 499–503.
- Sang, H., Chang, H.-X., & Chilvers, M. (2019). A *Sclerotinia sclerotiorum* transcription factor involved in sclerotial development and virulence on pea. *Msphere*, 4(1), e00615-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00615-18>
- Sapkota, R., & Nicolaisen, M. (2015). An improved high throughput sequencing method for studying oomycete communities. *Journal of Microbiological Methods*, 110, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.01.013>
- Saremi, H., Okhovvat, S. M., & Ashrafi, S. J. (2011). *Fusarium* diseases as the main soil borne fungal pathogen on plants and their control management with soil solarization in Iran. *African Journal of Biotechnology*, 10(80), 18391–18398. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2935>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00784.x>
- Schmitthenner, A. F., & Hilty, J. W. (1962). Method for studying postemergence seedling root rot. In *Phytopathology* (Vol. 52). Amer phytopathological soc 3340 pilot knob road, St paul, MN 55121.
- Schneider, K. A. & Kelly, J. D. (2000). A Greenhouse screening protocol for fusarium root rot in bean. *HortScience* 35 (6): 1095–1098.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schren, A.L. (1960). Germination of oospores of *Aphanomyces euteiches* embedded in plant debris. *Phytopathology*, 50, 274–277.
- 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 & pharmaceutical bulletin*, 16, 698–701.
- Sharma, P. (2011). Alarming occurrence of Fusarium wilt disease in pea (*Pisum sativum* L.) cultivations of Jabalpur district in Central India revealed by an array of pathogenicity tests. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2(6), 981-94. <https://doi.org/10.5251/abjna.2011.2.6.981.994>.
- Sherpa, S. R., Wolfe, D. W., & van Es, H. M. (2016). Sampling and data analysis optimization for estimating soil organic carbon stocks in agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, 80(5), 1377-1392. doi:10.2136/sssaj2016.04.0113
- Sherwood, R. T., & Hagedorn, D. J. (1958). Determining common root rot potential of pea fields. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300443087>
- Short, G., & Lacy, M. (1976). Carbohydrate exudation from pea seeds—Effect of cultivar, seed age, seed color, and temperature. *Phytopathology*, 66(2), 182–187. <https://doi.org/10.1094/Phyto-66-182>



## Références

- Siegel-Hertz, K., Edel-Hermann, V., Chapelle, E., Terrat, S., Raaijmakers, J. M. & Steinberg, C. (2018). Comparative microbiome analysis of a *Fusarium* wilt suppressive soil and a *Fusarium* wilt conducive soil from the Chateaufort region. *Frontiers in Microbiology* 9: 16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00568>
- Silva, P. P. da, Freitas, R. A. de, & Nascimento, W. M. (2013). Pea seed treatment for *Rhizoctonia solani* control. *Journal of Seed Science*, 35(1), 17–20. <https://doi.org/10.1590/S2317-15372013000100002>
- Šišić, A., Baćanović-Šišić, J., Al-Hatmi, A. M. S., Karlovsky, P., Ahmed, S. A., Maier, W., de Hoog, G. S., & Finckh, M. R. (2018a). The 'forma specialis' issue in *Fusarium*: A case study in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Scientific Reports*, 8, 1252. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19779-z>
- Šišić, A., Baćanović-Šišić, J., Karlovsky, P., Wittwer, R., Walder, F., Campiglia, E., Radicetti, E., Friberg, H., Baresel, J. P., & Finckh, M. R. (2018b). Roots of symptom-free leguminous cover crop and living mulch species harbor diverse *Fusarium* communities that show highly variable aggressiveness on pea (*Pisum sativum*). *Plos One*, 13(2), e0191969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191969>
- Sisic, A., Bacanovic-Sisic, J., Schmidt, H. & Finckh, M. R. (2018). First report of *Didymella lethalis* associated with roots of pea, subterranean clover, and winter vetch in Germany, Switzerland, and Italy. *Plant Disease* 102 (12): 2642–2643. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0837-PDN>.
- Šišić, A., Baćanović-Šišić, J., Schmidt, H., & Finckh, M. R. (2020). Root pathogens occurring on pea (*Pisum sativum*) and faba bean (*Vicia faba*) in Germany. In M. Brka, E. Omanović-Miklićanin, L. Karić, V. Falan, & A. Toroman (Eds.), *30th Scientific-Experts Conference of Agriculture and Food Industry* (pp. 69–75). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-40049-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-40049-1_8)
- Skovgaard, K., Bodker, L., & Rosendahl, S. (2002). Population structure and pathogenicity of members of the *Fusarium oxysporum* complex isolated from soil and root necrosis of pea (*Pisum sativum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 42(3), 367–374. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00337-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00337-9)
- Slezacek, 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.
- 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. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.3.288>
- Smýkal, P., Kenicer, G., Flavell, A. J., Corander, J., Kosterin, O., Redden, R. J., Ford, R., Coyne, C. J., Maxted, N., Ambrose, M. J., & Ellis, N. T. H. (2011). Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*, 9(1), 4–18. <https://doi.org/10.1017/S147926211000033X>
- Smýkal, P., Aubert, G., Burstin, J., Coyne, C., Ellis, N., Flavell, A., Ford, R., Hýbl, M., Macas, J., Neumann, P., McPhee, K., Redden, Curator, A. G. G., Robert, Rubiales, D., Weller, J., & Warkentin, T. (2015a). Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era. <https://doi.org/10.3390/agro2020074>
- Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., Berger, J., Greene, S. L., Nelson, M. N., Besharat, N., & others. (2015b). Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1–3), 43–104.
- Smýkal, P., Hradilova, I., Trneny, O., Brus, J., Rathore, A., Bariotakis, M., Das, R. R., Bhattacharyya, D., Richards, C., Coyne, C. J., & Pirtintos, S. (2018). Genomic diversity and macroecology of the crop wild relatives of domesticated pea (vol 7, 17384, 2017). *Scientific Reports*, 8, 13115. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30987-5>
- Somerville, G. J., Sonderskov, M., Mathiassen, S. K., & Metcalfe, H. (2020). Spatial modelling of within-field weed populations; a review. *Agronomy-Basel*, 10(7), 18. <https://doi.org/10.3390/agronomy10071044>
- Soylu, S., & Dervis, S. (2011). Determination of prevalence and incidence of fungal disease agents of pea (*Pisum sativum* L.) plants growing in Amik plain of Turkey. *Research on Crops*, 12(2), 588–592.

## Références

- 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, UNSP 2. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>
- Stanghellini, M., White, J., Tomlinson, J., & Clay, C. (1988). Root-rot of hydroponically grown cucumbers caused by zoospore-producing isolates of *Pythium intermedium*. *Plant Disease*, 72(4), 358–359. <https://doi.org/10.1094/PD-72-0358>
- Stegmark, R. (1994). Downy mildew on peas (*Peronospora viciae* f. sp. *pisi*). *Agronomie*, 14(10), 641–647. <https://doi.org/10.1051/agro:19941001>
- Steinberg, C., Edel-Hermann, V., Janvier, C., Friberg, H., & Alabouvette, C. (2007). Interest of cultural practices to manage soilborne diseases. *Bulletin OILB/SROP*, 30(6(2)), 337–342.
- Steinberg, C., Edel-Hermann, V., Alabouvette, C. & Lemanceau, P. (2019). Soil suppressiveness to plant diseases. In J. D. van Elsas, J. T. Trevors, A. S. Rosaldo, & P. Nannipieri (Eds.), *Modern Soil Microbiology - Third Edition* (third Edition ed., pp. 345-361). New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Stenglein, S. (2009). *Fusarium poae*: A pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology*, 91, 25–36. <https://doi.org/10.4454/jpp.v91i1.621>
- Sundheim L (1972) Physiological specialization in *Aphanomyces euteiches*. *Physiological Plant Pathology* 2, 301-306. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(72\)90013-6](https://doi.org/10.1016/0048-4059(72)90013-6)
- Taheri, A. E., Chatterton, S., Foroud, N. A., Gossen, B. D., & McLaren, D. L. (2017a). Identification and community dynamics of fungi associated with root, crown, and foot rot of field pea in western Canada. *European Journal of Plant Pathology* 147 (3): 489–500. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1017-4>
- Taheri, A. E., Chatterton, S., Gossen, B. D., & McLaren, D. L. (2017b). Metagenomic analysis of oomycete communities from the rhizosphere of field pea on the Canadian prairies. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(9), 758–768. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0099>
- Taheri, A. E., Hamel, C., Gan, Y., & Vujanovic, V. (2011). First report of *Fusarium redolens* from Saskatchewan and its comparative pathogenicity. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33(4), 559–564. <https://doi.org/10.1080/07060661.2011.620631>
- Takenaka, S., Sekiguchi H., Nakaho K., Tojo M., Masunaka, A., & Takahashi H. (2008). Colonization of *Pythium oligandrum* in the tomato rhizosphere for biological control of bacterial wilt disease analyzed by Real-Time PCR and confocal laser-scanning microscopy. *Phytopathology* 98 (2): 187–195. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-2-0187>.
- Tedersoo, L., & Anslan, S. (2019). Towards PacBio-based pan-eukaryote metabarcoding using full-length ITS sequences. *Environmental Microbiology Reports*, 11(5), 659–668. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12776>
- Tedersoo, L., Drenkhan, R., Anslan, S., Morales-Rodriguez, C., & Cleary, M. (2019). High-throughput identification and diagnostics of pathogens and pests: overview and practical recommendations. *Molecular Ecology Resources*, 19(1), 47–76. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12959>
- Tedersoo, L., & Lindahl, B. (2016). Fungal identification biases in microbiome projects. *Environmental Microbiology Reports*, 8(5), 774–779. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12438>
- Tedersoo, L., Tooming-Klunderud, A., & Anslan, S. (2018). PacBio metabarcoding of fungi and other eukaryotes: Errors, biases and perspectives. *New Phytologist*, 217(3), 1370–1385. <https://doi.org/10.1111/nph.14776>
- Terres Inovia (2021). <https://www.terresinovia.fr/pois-printemps> (Accès en septembre 2021).
- Terres Univia (2021). <https://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees/pois> (Accès en septembre 2021).

## Références

- Thomashow, L. S. & Weller, D. M. (1990). Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. *Plant and Soil* 129 (1): 93-99. <https://doi.org/10.1007/bf00011695>
- Thygesen, K., Larsen, J., & Bodker, 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 (4): 411–419. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000021070.61574.8b>
- Tivoli, B., & Banniza, S. (2007). Comparison of the epidemiology of ascochyta blights on grain legumes. *European Journal of Plant Pathology*, 119(1), 59–76. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9117-9>
- Tofte, J. E. (1990). Reaction of red clover (*Trifolium pratense* L.) and diploid alfalfa (*Medicago sativa* L. and *Medicago falcata* L.) to *Aphanomyces euteiches* Drechs. and selection for and inheritance of resistance in red clover. University of Wisconsin - Madison.
- Tsvetkova, N. A., & Guseva, T. A. (1980). The effect of *Aphanomyces euteiches* Drechs. pathogen of root rot of pea, and Tachigaren on the chemical composition of pea plants. *Byulleten' Vsesoyuznogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Rastenii* 45–49.
- Tu, J. C. (1987). Integrated control of the pea root rot disease complex in Ontario. *Plant Disease*, 71(1), 9–13. <https://doi.org/10.1094/PD-71-0009>
- Tu, J. C. (1991). Etiology, biology and control of a soilborne root rot complex of green peas. *Plant Protection Bulletin (Taipei)* 33 (1): 17–35.
- Tu, J. C. (1994). Effects of soil compaction, temperature, and moisture on the development of the *Fusarium* root rot complex of pea in southwestern Ontario. *Phytoprotection*, 75(3), 125–131.
- UNILET (2021). *Culture par culture > Pois*. <http://www.unilet.fr/cultures/pois/pois.php> (Accès en septembre 2021).
- Vandemark, G. J., Kraft, J. M., Larsen, R. C., Gritsenko, M. A., & Boge, W. L. (2000). A PCR-based assay by sequence-characterized DNA markers for the identification and detection of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, 90(10), 1137–1144. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.10.1137>
- Vandemark, G. J., Barker, B. M., & Gritsenko, M. A. (2002). Quantifying *Aphanomyces euteiches* in alfalfa with a fluorescent polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 92(3), 265–272. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.3.265>
- Vandemark, G. J., & Porter, L. D. (2010). First Report of Lentil Root Rot Caused by *Aphanomyces euteiches* in Idaho. *Plant Disease*, 94, 480–480. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-4-0480B>
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4238–4246. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>
- Vanetten, H. (1978). Identification of additional habitats of *Nectria haematococca* mating population .6. *Phytopathology*, 68(11), 1552–1556. <https://doi.org/10.1094/Phyto-68-1552>
- Voisin, A.-S., Guéguen, J. J., Huyghe, C. C., Jeuffroy, M.-H. M.-H., Magrini, M.-B., Meynard, J. M. J. M., Mougé, C., Pellerin, S. S., & Pelzer, E. E. (2013). Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, décembre(Online), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0189-y>
- Voisin, A.-S., Salon, C., Munier-Jolain, N. G., & Ney, B. (2002). Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil*, 242(2), 251–262. <https://doi.org/10.1023/A:1016214223900>
- Vu, D., Groenewald, M., de Vries, M., Gehrmann, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J. Z., Cardinali, G., Houbaken, J., Boekhout, T., Crous, P. W., Robert, V., & Verkley, G. J. M. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology*, 92, 135–154. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>

## Références

- Wadoux, A., Marchant, B. P., and Lark, R. M. (2019). Efficient sampling for geostatistical surveys. *European Journal of Soil Science*, 70(5), 975-989. doi:10.1111/ejss.12797
- 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): 401–7.
- Wallenhammar, A.-C. (1996). Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. *Plant Pathology*, 45(4), 710–719. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-173.x>
- Wallenhammar, A.-C., Almquist, C., Söderström, M., & Jonsson, A. (2012). In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR. *Plant Pathology*, 61(1), 16–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02477.x>
- Wallenhammar, A. C., Gunnarson A., Hansson, F. & Jonsson A. (2016). Quantification of *Plasmodiophora Brassicae* using a DNA-based soil test facilitates sustainable oilseed rape production. *Plants* 5,(2), 21. <https://doi.org/10.3390/plants5020021>.
- Wang, H., Hwang, S. F., Chang, K. F., Turnbull, G. D. & Howard, R. J. (2003). Suppression of important pea diseases by bacterial antagonists. *BioControl* 48 (4): 447–60. <https://doi.org/10.1023/A:1024794809751>.
- Wang, Y., Zhang, W., Wang, Ying, & Zheng, X. (2006). Rapid and sensitive detection of *Phytophthora sojae* in soil and infected soybeans by species-specific polymerase chain reaction assays. *Phytopathology*, 96, 1315–1321. <https://doi.org/10.1094/PHTO-96-1315>
- Waymouth, V., Miller, R. E., Ede, F., Bissett, A., & Aponte, C. (2020). Variation in soil microbial communities: elucidating relationships with vegetation and soil properties, and testing sampling effectiveness. *Plant Ecology*, 221(9), 837-851. <https://doi.org/10.1007/s11258-020-01029-w>
- Wen, R., Lee, J., Chu, M., Tonu, N., Dumonceaux, T., Gossen, B. D., Yu, F., & Peng, G. (2020). Quantification of *Plasmodiophora brassicae* Resting spores in soils using droplet digital PCR (ddPCR). *Plant Disease*, 104, 1188–1194. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0584-RE>
- Westerlund, F. V., Campbell, R. N., & Kimble, K. A. (1974). Fungal root rots and wilt of chickpea in California. *Phytopathology*, 64(4), 432–436.
- White, T. J, Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J., (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press, San Diego. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wicker, E., & Rouxel, F. (2001). Specific behaviour of French *Aphanomyces euteiches* Drechs. populations for virulence and aggressiveness on pea, related to isolates from Europe, America and New Zealand. *European Journal of Plant Pathology*, 107(9), 919–929. <https://doi.org/10.1023/A:1013171217610>
- Wicker, E., Hulle, M., & Rouxel, F. (2001). Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology* 50 (4): 433–442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00590.x>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (2nd ed.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Wickham, H. & Bryan, J. (2019). readxl: Read Excel Files. R package version 1.3.1. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L. D., François, R., Grolemund, G., et al. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wilke, C., O., (2020). cowplot: Streamlined plot theme and plot annotations for 'ggplot2'. R package version 1.1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=cowplot>

## Références

- Wille, L., Messmer, M. M., Studer, B., & Hohmann, P. (2019). Insights to plant-microbe interactions provide opportunities to improve resistance breeding against root diseases in grain legumes. *Plant Cell and Environment*, 42(1), 20–40. <https://doi.org/10.1111/pce.13214>
- Williamson-Benavides, B. A., Sharpe, R. M., Nelson, G., Bodah, E. T., Porter, L. D. & Dhingra A. (2020). Identification of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (Fsp) responsive genes in *Pisum sativum*. *Frontiers in Genetics* 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00950>
- Willoquet, L., Jumel, S., & Lemarchand, E. (2007). Spatio-temporal development of pea root rot disease through secondary infections during a crop cycle. *Journal of Phytopathology*, 155(10), 623–632. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01289.x>
- Willsey, T., Thomas, J., & Chatterton, S. (2017). Intra-host interactions of the pea root rot pathogens *Aphanomyces euteiches* and *Fusarium* spp. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 39(1), 111–111.
- Willsey, T. L., Chatterton, S., Heynen, M., & Erickson, A. (2018). Detection of interactions between the pea root rot pathogens *Aphanomyces euteiches* and *Fusarium* spp. using a multiplex qPCR assay. *Plant Pathology*, 67(9), 1912–1923. <https://doi.org/10.1111/ppa.12895>
- Willsey, T., Chatterton, S., & Carcamo, H. (2019). Interactions between the root rot pathogen *Fusarium avenaceum* and the pea leaf weevil (*Sitona lineatus*) in field pea. *Crop Protection*, 116, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.08.027>
- Wood, S. A., Pochon, X., Laroche, O., von Ammon, U., Adamson, J., & Zaiko, A. (2019). A comparison of droplet digital polymerase chain reaction (PCR), quantitative PCR and metabarcoding for species-specific detection in environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 19, 1407–1419. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13055>
- Worku, Y., & Gerhardson, B. (1996). Suppressiveness to clubroot, pea root rot and *Fusarium* wilt in Swedish soils. *Journal of Phytopathology*, 144(3), 143–146. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1996.tb01504.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.07.006>
- Xi, K., Stephens, J. H. G., & Hwang, S. F. (1995). Dynamics of pea seed infection by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani*: Effects of inoculum density and temperature on seed rot and pre-emergence damping-off. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 17(1), 19–24.
- Xiang, N., Duan C. X., Xiao Y. N., Wang X. M., et Zhu Z. D. (2012). Identification of the pathogen causing *Fusarium* root rot of pea and diversity of pathogenicity genes. *Scientia Agricultura Sinica* 45, no 14: 2838-47. (en chinois).
- Xu, L., Ravnskov, S., Larsen, J., & Nicolaisen, M. (2012a). Linking fungal communities in roots, rhizosphere, and soil to the health status of *Pisum sativum*. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(3), 736–745. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01445.x>
- Xu, L., Ravnskov, S., Larsen, J., Nilsson, R. H., & Nicolaisen, M. (2012b). Soil fungal community structure along a soil health gradient in pea fields examined using deep amplicon sequencing. *Soil Biology & Biochemistry*, 46, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.11.010>
- Xue, A. G. (2003a). Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology* 93 (3): 329–335. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.3.329>
- Xue, A. G. (2003b). Efficacy of *Clonostachys rosea* strain ACM941 and fungicide seed treatments for controlling the root rot complex of field pea. *Canadian Journal of Plant Science* 83 (3): 519–524.
- Xue, A. G., Voldeng, H. D., Savard, M. E., Fedak, G., Tian, X., & Hsiang, T. (2009). Biological control of *Fusarium* head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Canadian Journal of Plant Pathology- Revue Canadienne De Phytopathologie*, 31(2), 169–179.

## Références

- Yang, X., Zhang, A.-F., Gu, C.-Y., Zang, H.-Y., & Chen, Y. (2019). First report of *Clonostachys rhizophaga* as a pathogen of water chestnut (*Eleocharis dulcis*) in Anhui Province of China. *Plant Disease*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201900198709>
- Yokosawa, R., Kuninaga, S., & Teranaka, M. (1974). *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 40(5), 454–457. (en japonais).
- Yokosawa, R., Kuninaga, S., and Teranaka, M. (1974). Note on pea root rot fungus, *Aphanomyces euteiches* Drechs. in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 40, 454–457 (in Japanese). <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.40.454>
- Yu, L., Nicolaisen, M., Larsen, J., & Ravnskov, S. (2013). Organic fertilization alters the community composition of root-associated fungi in *Pisum sativum*. *Soil Biology & Biochemistry*, 58, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.004>
- Zander, P., Amjath-Babu, T. S., Preissel, S., Reckling, M., Bues, A., Schläfke, N., Kuhlman, T., Bachinger, J., Uthes, S., Stoddard, F., Murphy-Bokern, D., & Watson, C. (2016). Grain legume decline and potential recovery in European agriculture: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 36(2), 26. <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0365-y>
- Zazzerini, A., Quaglia, M., & Marani, O. (2010). First report of *Clonostachys rhizophaga* as a pathogen of *Dendrocalamus giganteus* in Mozambique. *Plant Disease - PLANT DIS*, 94, 372–372. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0372C>
- Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D. A., Nalim, F. A., Summerbell, R. C., Padhye, A. A., & Geiser, D. M. (2006). Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 2186–2190. <https://doi.org/10.1128/JCM.00120-06>
- Zitnick-Anderson, K. K., Pasche, J. S., Gargouri-Jbir, T., & Kalil, A. (2020b). First report of *Aphanomyces euteiches* causing *Aphanomyces* root rot on lentil in North Dakota. *Plant Disease*, 104(6), 1876–1877. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2422-PDN>
- Zitnick-Anderson, K., & Pasche, J. S. (2016). First report of *Aphanomyces* root rot caused by *Aphanomyces euteiches* on field pea in North Dakota. *Plant Disease*, 100(2), 522–523. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0649-PDN>
- Zitnick-Anderson, K., Simons, K., & Pasche, J. S. (2018). Detection and qPCR quantification of seven *Fusarium* species associated with the root rot complex in field pea. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(2), 261–271. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1429494>
- Zitnick-Anderson, K., del Rio Mendoza, L. E., Forster, S., & Pasche, J. S. (2020). Associations among the communities of soil-borne pathogens, soil edaphic properties and disease incidence in the field pea root rot complex. *Plant and Soil*, 457, 339–354. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04745-4>
- Zohary, D. (1999). Monophyletic vs. polyphyletic origin of the crops on which agriculture was founded in the Near East. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46(2), 133–142.



# ANNEXES





## **Annexe 1 : Etude Bibliographique**

---



**ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**  
**LES POURRITURES RACINAIRES DU POIS**  
**ET AUTRES LEGUMINEUSES**

**Simon GIBERT**

Document édité en avril 2016

Rédigé sous la direction scientifique de Christian Steinberg, DR, INRA de Dijon



## Table des matières

I.	INTRODUCTION .....	1
I.1.	CONTEXTE ET ENJEUX DE L'ETUDE.....	1
I.1.1.	La culture des légumineuses et du pois potager .....	1
I.1.2.	La problématique des nécroses racinaires du pois. ....	3
I.2.	OBJECTIFS DE LA SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
II.	METHODOLOGIE DE RECHERCHE DOCUMENTAIRE .....	5
II.1.	SOURCES DE DOCUMENTATION ET BASES DE DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES .....	5
II.2.	ELABORATION DES REQUETES .....	6
II.3.	LOGICIEL DE GESTION DE DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES .....	9
III.	RESULTATS.....	10
III.1.	ETUDE BIBLIOMETRIQUE .....	10
III.2.	BIOLOGIE DES PATHOGENES ASSOCIES AUX POURRITURES RACINAIRES DU POIS.....	15
III.2.1.	Les Oomycètes impliqués dans les pourritures racinaires du pois. ....	15
III.2.1.1.	<i>Aphanomyces euteiches</i> .....	17
III.2.1.1.1.	Phylogénie et répartition.....	17
III.2.1.1.2.	Cycle de vie Ecologie.....	17
III.2.1.1.3.	Symptômes .....	19
III.2.1.1.4.	Pathogénie et virulence.....	19
III.2.1.2.	<i>Pythium</i> spp. ....	20
III.2.1.2.1.	Phylogénie et répartition.....	20
III.2.1.2.2.	Ecologie et cycle de vie.....	21
III.2.1.2.3.	Symptômes .....	22
III.2.1.2.4.	Identification des <i>Pythium</i> .....	22
III.2.1.2.5.	Les différentes espèces répertoriées sur les pourritures racinaires du pois	22
III.2.1.3.	<i>Phytophthora pisi</i> .....	23
III.2.1.3.1.	Phylogénie et répartition.....	23
III.2.1.3.2.	Incidence et symptômes causés .....	23
III.2.1.3.3.	Ecologie de <i>Phytophthora pisi</i> .....	24
III.2.2.	Les <i>Fusarium</i> .....	24
III.2.2.1.	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>lisi</i> .....	24
III.2.2.1.1.	Répartition et diversité de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>lisi</i> .....	24
III.2.2.1.2.	Ecologie et symptômes.....	24
III.2.2.1.3.	Facteurs de pathogénicité .....	25

III.2.2.2.	<i>Fusarium oxysporum</i> .....	26
III.2.2.2.1.	Répartition et diversité de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> .....	26
III.2.2.2.2.	Ecologie de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> .....	27
III.2.2.2.3.	Symptômes causés par <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> .....	27
III.2.2.2.4.	Pathogénie de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> .....	27
III.2.2.3.	Les autres <i>Fusarium</i> .....	28
III.2.3.	<i>Rhizoctonia solani</i> .....	28
III.2.3.1.1.	Répartition et diversité.....	28
III.2.3.2.	Ecologie et symptômes.....	29
III.2.4.	<i>Thielaviopsis basicola</i> .....	29
III.2.4.1.	Répartition et diversité.....	29
III.2.4.2.	Ecologie et symptômes.....	31
III.2.5.	<i>Phoma medicaginis</i> var. <i>pinodella</i> ( <i>Ascochyta pinodella</i> ) et <i>Mycosphaerella pinodes</i> 31	
III.2.6.	Les pathogènes occasionnels .....	31
III.3.	LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX INFLUENCANT L'EMERGENCE DES POURRITURES RACINAIRES DU POIS .....	33
III.3.1.	Les facteurs climatiques .....	33
III.3.1.1.	Température et humidité .....	33
III.3.1.2.	La date des semis.....	34
III.3.2.	La santé des sols .....	35
III.3.2.1.	La réceptivité des sols.....	35
III.3.2.1.1.	Concepts et définitions.....	35
III.3.2.1.2.	Réceptivité des sols aux agents des pourritures racinaires du pois .....	36
III.3.2.2.	Composantes abiotiques : structure et composition des sols.....	37
III.3.2.3.	Composante biotique des sols, abondance et diversité des populations microbiennes.....	39
III.4.	LES STRATEGIES DE CONTROLE.....	42
III.4.1.	Les sources de résistances variétales .....	42
III.4.1.1.	Résistance à <i>Aphanomyces euteiches</i> .....	42
III.4.1.3.	Résistances à <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>pisi</i> .....	43
III.4.1.4.	Résistance à <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> .....	43
III.4.1.5.	Résistance à d'autres pathogènes du complexe parasitaire .....	44
III.4.2.	La lutte chimique .....	44
III.4.3.	Les pratiques culturales.....	45

III.4.3.1.	Travail du sol, la compaction et le labour.....	45
III.4.3.2.	Les amendements organiques :.....	46
III.4.3.3.	La biofumigation.....	48
III.4.3.5.	La rotation des cultures.....	50
III.4.4.	Le biocontrôle.....	53
III.4.4.1.	Définition.....	53
III.4.4.2.	Les agents de lutte utilisés dans le cas des pourritures racinaires du pois.....	54
III.4.4.2.1.	Les agents de biocontrôle fongiques.....	54
III.4.4.2.1.1.	Les champignons mycorhiziens.....	54
III.4.4.2.1.2.	<i>Trichoderma</i> spp. ....	55
III.4.4.2.1.3.	<i>Fusarium oxysporum</i> non pathogènes.....	55
III.4.4.2.1.4.	<i>Chlonostachys rosea</i> .....	56
III.4.4.2.1.5.	<i>Gliocladium</i> spp. ....	56
III.4.4.2.1.6.	Autres agents de biocontrôle fongiques. ....	56
III.4.4.2.2.	Les agents de biocontrôle bactériens.....	57
III.4.4.2.2.1.	Les bactéries <i>Rhizobia</i> .....	57
III.4.4.2.2.2.	<i>Bacillus</i> spp. et <i>Pseudomonas</i> spp.....	57
III.4.4.2.3.	Stratégies d'optimisation du contrôle biologique.....	59
IV.	CONCLUSION.....	60

## Listes des figures

<b>Figure 1</b> : Principales étapes du cycle de la culture du pois protéagineux .....	2
<b>Figure 2</b> : Nombre de références communes ou spécifiques aux bases CAB et WOS. ....	6
<b>Figure 3</b> : Nombre de publications en fonction de l'origine des auteurs au sein du corpus « pois »... 10	10
<b>Figure 4</b> : Nombre de publications en fonction de l'origine des auteurs au sein du corpus « légumineuse ».....	10
<b>Figure 5</b> : Evolution chronologique du nombre de publications de 1973 à 2015, corpus « légumineuses » .....	11
<b>Figure 6</b> : Evolution chronologique du nombre de publications de 1973 à 2015. ....	11
<b>Figure 7</b> : Nombre de références obtenues lors de la recherche des noms de chaque pathogène impliqué dans le complexe des pourritures racinaires du pois au sein des corpus « pois » « pois-symptômes », « légumineuses » et « légumineuses-symptômes » dans la base CAB .....	12
<b>Figure 8</b> : Nombre de références contenant des termes associés à des données épidémiologiques, au sein du corpus légumineuses.....	13
<b>Figure 9</b> : Nombre de références contenant des termes associés au climat, au sein du corpus légumineuses.....	13
<b>Figure 11</b> : Nombre de références contenant des termes associés au sol, au sein du corpus légumineuses.....	13
<b>Figure 10</b> : Nombre de références contenant des termes associés aux pratiques culturales, au sein du corpus légumineuses .....	13
<b>Figure 12</b> : Nombre de références contenant des termes associés au biocontrôle, au sein du corpus légumineuses.....	14
<b>Figure 13</b> : Arbre phylogénique illustrant les relations entre oomycètes.....	16
<b>Figure 14</b> : Cycle de vie d' <i>Aphanomyces euteiches</i> .....	17
<b>Figure 15</b> : Caractéristiques pathogéniques de quatre pathotypes d' <i>A. euteiches</i> . ....	19
<b>Figure 16</b> : Cycle de vie de <i>Pythium</i> ssp. ....	21
<b>Figure 17</b> : Relation entre Disease Index des pourritures racinaires et densité apparente de sol .....	38
<b>Figure 18</b> : Comparaison de la diversité fongique dans le sol, la rhizosphère et les racines d'un champs sain et d'un champs atteint de pourritures racinaires. ....	39
<b>Figure 19</b> : Variations de plusieurs paramètres influençant le niveau d'inoculum de <i>P. ultimum</i> à différentes concentrations en composte .....	47
<b>Figure 20</b> : Effet du système de culture sur les rendements de matière sèche du pois, à différents stade de développement du pois .....	51
<b>Figure 21</b> : Relation entre la baisse de rendement observée entre une culture de pois continue et une rotation pois blé en fonction du nombre d'années de culture .....	51
<b>Figure 22</b> : Effet de la rotation des cultures sur les communautés microbiennes du sol, comparativement à une culture de pois continue. ....	52



## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Comparaison des résultats entre CAB Abstracts et Web Of Sciences. ....	5
<b>Tableau II</b> : Requêtes initiales nécessaires à l'interrogation des bases de données CAB et WOS .....	7
<b>Tableau III</b> : Corpus de travail .....	7
<b>Tableau IV</b> : Requêtes relatives au sol, à ses composantes biotiques et abiotiques .....	7
<b>Tableau V</b> : Requêtes relatives aux facteurs climatiques. ....	8
<b>Tableau VI</b> : Requêtes relatives aux pratiques culturelles.....	8
<b>Tableau VII</b> : Requête relative au biocontrôle. ....	8
<b>Tableau VIII</b> : Requêtes relatives aux données épidémiologiques. ....	8

## I. INTRODUCTION

### I.1. CONTEXTE ET ENJEUX DE L'ETUDE

#### I.1.1. La culture des légumineuses et du pois potager

La famille des *Fabaceae*, anciennement nommée *Leguminosae*, est traditionnellement divisée en trois sous familles, les *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Faboideae* (*Papilionoideae*) qui regroupent plus de 20 000 espèces réparties en plus de 800 genres (Lewis et al., 2005). Elle représente la troisième famille la plus vaste chez les plantes à fleurs et la grande diversité d'espèces qu'elle englobe sont retrouvées dans la plupart des environnements terrestres. Elles sont caractérisées par un fruit distinct, appelé légume, qui a donné son nom originel à la famille (Smýkal et al., 2015). Elles possèdent la particularité de s'associer en symbiose avec des bactéries, les *Rhizobia*, capables de fixer l'azote atmosphérique et de le restituer à la plante sous forme d'azote ammoniacal qu'elle peut assimiler. Les *Fabaceae* jouent ainsi un rôle important dans le cycle de l'azote et dans les écosystèmes naturels.

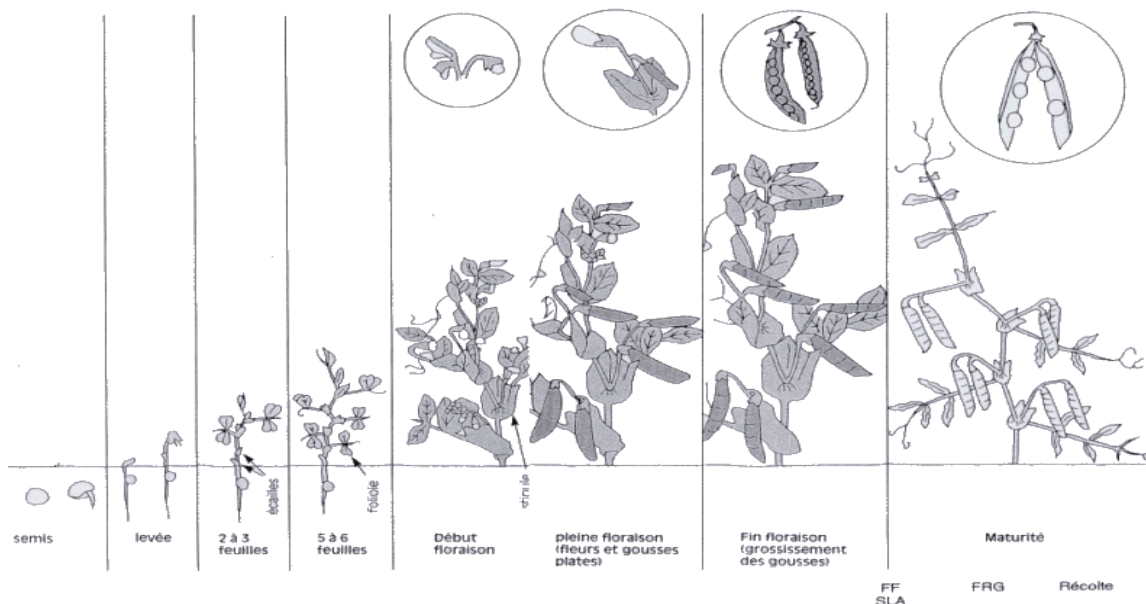
Les premières légumineuses ont été domestiquées en parallèle des céréales, dans le Croissant Fertile, il y a près de 10 000 ans. Il s'agissait d'espèces de la sous-famille des *Faboideae* comme le pois (*Pisum sativum* L.), la fève (*Vicia faba*), le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), la lentille (*Lens culinaris*), ou le pois chiche (*Cicer arietinum*) qui constituaient alors une composante alimentaire importante de ces civilisations (Smýkal et al., 2014, 2015). Aujourd'hui, dans un contexte de développement durable, les légumineuses sont très appréciées pour leur qualités nutritives, notamment leur richesse en protéines, ainsi que pour leur capacité à fixer l'azote atmosphérique via la symbiose avec les *Rhizobia* (Peoples et al., 2009; Nemecek et al., 2008). Elles sont désormais la deuxième plus importante famille de plantes cultivées après les graminées (*Poaceae*). Elles représentent près de 27% de la production agricole mondiale et fournissent 33% des protéines alimentaires consommées par les humains (Smýkal et al., 2015).

Après la domestication du pois il y a près de 10000 ans, sa culture s'est rapidement étendue en Asie du Sud Est, dans le bassin méditerranéen et en Europe (Zohary, 1999). On retrouve aujourd'hui de nombreuses variétés cultivées de pois fourrager et de pois potager. Plus de 120 variétés de pois potager sont ainsi utilisées pour alimenter en grains de calibres et de couleurs spécifiques les usines de transformation (UNILET, 2016). Comme la plupart des légumineuses cultivées, les graines de pois sont une importante source de protéines et offrent un profil nutritionnel varié dont les qualités nutritives pour l'alimentation humaine sont reconnues (Fabbri & Crosby, 2015). On y retrouve de l'amidon (de 18.6 à 54.1%), des protéines (de 15.8 à 32.1%), des fibres (5.9–12.7%), du sucrose (1.3–2.1%), de l'huile (0.6–5.5%) mais aussi des minéraux, des vitamines et des micronutriments comme les polyphénols, les saponines, les  $\alpha$ -galactosides ou l'acide phytique dont les effets bénéfiques sur la santé ont été rapportés (Pratap & Kumar, 2011 ; Dahl et al., 2012; Arnoldi et al., 2015). Les qualités nutritionnelles du pois potager et les avantages de sa culture liés à sa capacité à fixer l'azote atmosphérique représentent deux avantages à sa production et à sa consommation. Le pois est principalement cultivé dans les régions tempérées du monde avec des sols fertiles et bien drainés. En

2013, la production mondiale de pois potager atteignait ainsi près de 17,43 Mt (FAOSTAT, 2016). La Chine (10,61 Mt) et l'Inde (4,00 Mt) où il représente une source importante de protéines pour la consommation humaine en sont les deux principaux producteurs mondiaux. Les Etats-Unis et la France avec des productions de pois potager respectives de 0,32 Mt et de 0,23 Mt en 2013 se situent à la troisième et à la quatrième place.

Le système racinaire de *Pisum sativum* L. est composé d'une racine principale appelée racine « pivot » sur laquelle vont se développer des racines latérales primaires, secondaire et parfois tertiaires. C'est au niveau des racines latérales que vont se développer les nodosités permettant les interactions symbiotiques entre la plante et les bactéries fixatrices d'azote. Les parties aériennes de la plante sont composées d'une tige constituée d'un empilement de phytomères (Munier-Jolain et al., 2005). Un phytomère est composé d'un entre-nœud, d'une feuille et d'un méristème axillaire. Chez le pois, la feuille a une organisation complexe (Munier-Jolain et al., 2005). Les variétés dites « feuillues » sont composées d'une paire de stipules, d'une à trois paires de folioles et de vrilles. Chez les variétés dites « afile », les folioles sont remplacées par des vrilles supplémentaires. Le méristème axillaire situé à l'aisselle de la stipule donne naissance aux ramifications qui présentent la même organisation que la tige principale. Lorsque la plante a atteint un certain nombre d'étages foliaires (variables selon la variété), les nœuds deviennent reproducteurs et donnent naissance à des fleurs. La gousse contenant les graines se forme après autofécondation de ces fleurs.

La croissance du pois peut être découpée en plusieurs étapes (Figure 3) (Boyeldieu, 1991): (1) La levée, correspondant au stade où la deuxième écaïlle (deux premières feuilles de la base de la tige) est visible, (2) le stade 2-3 feuilles, correspondant au nombre de feuilles sur la tige la plus développée, (3) le stade 6 feuilles, (4) le début de la floraison suivie de la pleine floraison correspondant à la sortie et l'ouverture des fleurs (5) la fin de la floraison, durant laquelle les gousses vont grossir et (6) la maturité, étape durant laquelle les graines vont cesser d'accumuler les réserves.



**Figure 1** : Principales étapes du cycle de la culture du pois protéagineux (Boyeldieu, 1991)

La culture du pois potager s'étend sur un cycle qui dure de 75 à 115 jours, suivant la précocité de la variété et les conditions culturales (UNILET, 2016). La levée a une durée qui peut varier de 10 jours à 1 mois suivant les conditions de semis. La croissance végétative, entre la levée et la floraison, s'étend de 35 à 50 jours, et la phase de développement du fruit, ou de remplissage des gousses et des grains, s'étale sur 25 à 45 jours

### **1.1.2. La problématique des nécroses racinaires du pois.**

Cette culture est sujette à de nombreuses maladies d'origines microbiennes intervenant à différentes étapes de son cycle de développement et affectant différents organes.

Certaines pathologies se développent sur les parties aériennes des plants de pois et peuvent causer des pertes de rendements importantes. Elles peuvent être d'origine fongique, comme l'ascochytose (*Ascochyta pinodes*, *Ascochyta pisi*), la pourriture grise (*Botrytis cinerea*) ou le mildiou (*Peronospora pisi*), bactériennes, comme la graisse du pois (*Pseudomonas syringae* pv. *psis*) ou encore d'origines virales, comme les jaunisses (*Pea Leafroll Virus* (PeLRV) ; *Beet Western Yellow Virus* (BWYV)) ou les mosaïques du pois (*Pea Common Mosaic Virus* (PCMV) ; *Pea Enation Mosaic Virus* (PEMV)).

Deux grands types de pathologies d'origines microbiennes interviennent au niveau du système racinaire. La fonte des semis, qui se traduit par la disparition des plantules de la levée au stade deux à trois nœuds et les nécroses racinaires, qui affectent le pois à des stades plus avancés de son développement. Ces pathologies se caractérisent par la multiplicité des microorganismes pathogènes ou associés pouvant être impliqués d'une manière directe ou indirecte dans la pathogenèse et retrouvés au niveau des parties infectées de la plante hôte. Ils sont communément regroupés au sein d'un même consortium de microorganismes appelé « complexe parasitaire du pois ». On répertorie ainsi dans la littérature scientifique plus d'une vingtaine d'espèces de microorganismes répartis en 11 genres pouvant être impliqués dans les pourritures racinaires du pois potager. Des agents phytopathogènes d'origine tellurique comme les oomycètes du genre *Pythium* (*Pythium ultimum* ; *Pythium aphanidermatum* ; *Pythium irregulare*), *Phytophthora* (*Phytophthora pisi*) et *Aphanomyces* (*Aphanomyces euteiches*), ou les champignons des espèces *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola*, *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, *Mycosphaerella pinodes* et du genre *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*; *Fusarium solani* f. sp. *psis*; *Fusarium avenaceum*; *Fusarium culmorum*; *Fusarium redolens*) sont ainsi fréquemment cités comme les principaux agents de cette pathologie du pois dans les différentes études d'ordre épidémiologique effectuées. D'autres champignons comme *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum* ou encore *Cylindrocarpon* spp. sont retrouvés plus sporadiquement dans les tissus infectés (Oyarzun et al., 1993a; Persson, et al., 1997) et leur impact réel sur l'incidence de la maladie reste à clarifier. La plupart de ces microorganismes peuvent être retrouvés dans la rhizosphère de la plante hôte et peuvent être isolés seul ou simultanément d'un même tissu infecté.

On distingue cependant plusieurs regroupements ou descriptions différentes suivant les auteurs et le contexte rencontré. On restreint souvent le complexe parasitaire aux pathogènes responsables des nécroses racinaires de fin de cycle de développement du pois (causées par *P. medicaginis*, *F. solani*, *F. oxysporum* et *T. basicola*). Cependant, plusieurs espèces impliquées dans la fonte des semis (causé principalement par *Pythium* spp., *R. solani*, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*), dans les pourritures racinaires du stade précoce de développement (*A. euteiches*) ou encore dans les

flétrissements (*F. oxysporum* et *S. sclerotiorum*) sont également responsables de pourritures racinaires et sont associées au complexe par de nombreux auteurs (Madoui, 2009; Persson et al., 1997 ; Oyarzun et al., 1993a ; Soylu & Dervis, 2011). La diversité des pathogènes impliqués dans les nécroses racinaires aboutit à des symptômes assez variés suivant leurs biologies et leurs virulences respectives, la sensibilité du cultivar, et le stade de développement de la plante au moment de l'infection.

Un des problèmes majeurs pour la maîtrise de la maladie est lié à l'enrichissement de l'inoculum pathogène du champ à chaque culture de pois ou de légumineuses sensibles. Afin d'éviter des pertes économiques liées à la baisse des rendements causées par la maladie, estimée à 25-30% rien que pour *A. euteiches* aux Etats-Unis, les exploitants doivent ainsi procéder à des rotations des cultures d'une durée suffisante pour que la baisse de l'inoculum pathogène atteigne un potentiel infectieux acceptable. Cependant, la persistance des propagules de certains de ces agents pathogènes dans l'environnement pouvant atteindre plus de 10 ans, il est nécessaire d'effectuer des rotations longues qui peuvent causer des problèmes pour la gestion des surfaces agricoles et notamment leur extension. La sélection variétale ne permet pas à ce jour de proposer de génotypes résistants au complexe parasitaire dont la composition semble variable sans que son déterminisme ni celui de son fonctionnement ne soient connus. Le développement de nouvelles stratégies de contrôle de la maladie permettant d'une part de faciliter le travail des sélectionneurs, d'autre part de contrôler le ou les complexes parasitaires par des méthodes appropriées aux systèmes de culture associés à un environnement pédoclimatique donné, passe par l'inventaire et la synthèse des connaissances nombreuses mais fragmentaires et dispersées, qui traitent chacune de l'une ou l'autre des composantes biotiques ou abiotiques des maladies du pois potager mais pas de l'ensemble de la problématique.

## **I.2. OBJECTIFS DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

Cette synthèse bibliographique vise à faire l'état des connaissances disponibles dans la littérature scientifique et dans la littérature grise sur les nécroses racinaires du pois potager. Elle a plusieurs objectifs :

- Répertorier les résultats de la recherche documentaire effectuée sur la maladie sous la forme d'une étude bibliométrique afin de quantifier la documentation disponible et orienter la synthèse bibliographique.
- Répertorier les agents pathogènes responsables des pourritures racinaires du pois potager et rassembler les connaissances disponibles sur leur biologie et leur écologie.
- Répertorier les facteurs environnementaux biotiques et abiotiques influençant le développement de la maladie.
- Faire l'état des connaissances disponibles sur les différentes méthodes de contrôle de la maladie existantes (Résistances variétales, lutte chimique, pratiques culturales et biocontrôle).

Ce document servira de base de travail afin de faire émerger des questionnements pour l'élaboration d'un projet scientifique visant à comprendre le fonctionnement du complexe parasitaire dans différentes conditions environnementales afin de proposer des solutions pour le contrôle de la maladie.

## II. MÉTHODOLOGIE DE RECHERCHE DOCUMENTAIRE

La méthodologie de recherche bibliographique a été effectuée afin de répondre à un questionnement scientifique. Elle a nécessité une définition du sujet et une clarification des besoins en matière de recherches documentaires.

L'objectif de cette étude est de faire un état des lieux sur les connaissances disponibles sur la maladie du pied noir du pois potager, ses causes, les facteurs influençant son émergence et les stratégies de contrôle expérimentées ou utilisées. Il s'agit donc de répertorier le plus grand nombre de références scientifiques possibles abordant cette thématique afin d'effectuer une analyse bibliométrique de la documentation disponible et d'élaborer un corpus de documents permettant *in fine* l'analyse et la synthèse d'une partie pertinente de la documentation obtenue.

### II.1. SOURCES DE DOCUMENTATION ET BASES DE DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

Pour réaliser cette étude et afin de répertorier les références scientifiques et les documents de la littérature grise, différents outils de recherches ont été utilisés, tels que des dictionnaires, encyclopédies, des livres ou périodiques de bibliographie scientifique et les moteurs de recherches, comme Science Direct ou Google Scholar.

La majeure partie des références scientifiques ont notamment été obtenues à partir de bases de données scientifiques accessibles sur internet comme Web of Science (WOS) et CAB Abstract (CAB).

Après une étude comparative des résultats obtenus à partir de ces deux bases de données, la base CAB Abstract a été choisie pour réaliser le corpus de références utilisé lors de l'analyse bibliométrique. Cette base plus spécialisée en Agronomie contient beaucoup plus de références abordant la thématique de cette étude que la base WOS (Figure 1 ; Tableau 1), et recouvre environ 60% des références disponibles dans la base WOS. Environ 9% du total des références obtenues à partir des deux bases est spécifique à WOS et n'a pas été pris en compte dans l'analyse bibliométrique (Figure 1).

Nom de la requête	Requête	Nombre de références obtenues:		Nombre de références avec un DOI:		Comparaison par Titre* Nombre de références prise en compte:	
légumineuses*symptômes*pathogènes	(Requête légumineuses) AND (Requête symptômes) AND (Requête pathogènes)	CAB Abstracts	<a href="#">4 391</a>	915	21%	4 349	99%
		Web Of Science	<a href="#">1 193</a>	736	62%	1 193	100%

**Tableau I :** Comparaison des résultats obtenus à partir des bases CAB et WOS. \* Les signes de ponctuations ont été supprimés des titres des références et les mots concaténés. Les codes obtenus à partir des références WOS ont été recherchés parmi ceux obtenus à partir des références CAB.

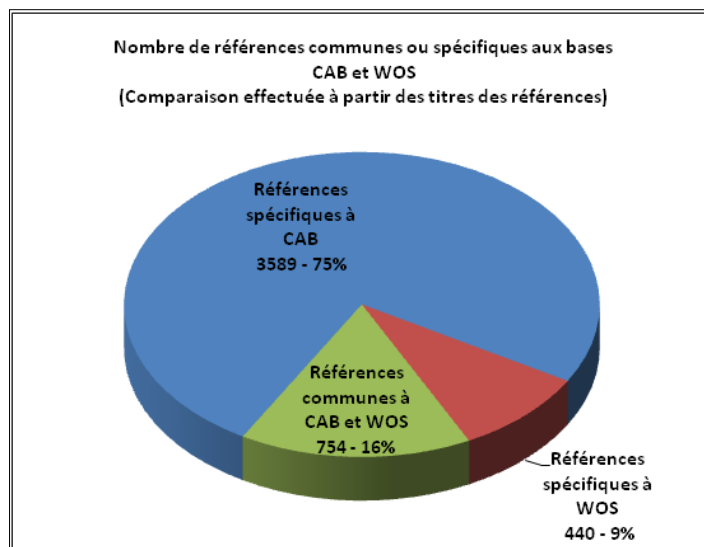


Figure 2 : Nombre de références communes ou spécifiques aux bases CAB et WOS.

## II.2. ÉLABORATION DES REQUETES

Pour effectuer la recherche bibliographique, il a été nécessaire de créer une liste de mots-clés définis en anglais, en français et en latin (pour les noms de genres et d'espèces). Ils ont été déterminés afin d'être le moins générique possible pour cibler au mieux les documents pertinents.

Ils ont été définis à partir de thématiques précises en lien avec le sujet, et regroupés sous la forme de requêtes pour interroger les bases de données bibliographiques à l'aide des opérateurs booléens « OR » et « AND ».

Les recherches effectuées dans la base CAB ont été réalisées dans le champ « TS ». Ce champ contient les mots du titre, les mots des abstracts et les mots clés des articles. Les recherches ont été effectuées :

- Sans restriction de langage. Les documents contenant des mots clés français ou en anglais dans le champ TS mais dont le corps est rédigé dans une autre langue ont été ainsi également pris en compte.
- Sans limites géographiques.
- Sur la période comprise entre 1973 et 2014 (Totalité de la base CAB).

Les résultats ont été obtenus le 14 décembre 2015.

Trois thématiques ont été choisies pour définir des requêtes initiales (Tableau II) :

- La liste des microorganismes pathogènes ou associées aux pourritures racinaires du pois, qui a été réalisée lors d'une analyse bibliographique préalable.
- La liste des noms ou adjectifs décrivant la maladie ou des symptômes liés aux pourritures racinaires du pois.
- Le pois (pour cibler la recherche) et une liste de huit autres légumineuses proches (pour élargir la recherche).

**Tableau 2** : Requêtes initiales nécessaires à l'interrogation des bases de données CAB et WOS.

Nom de la requête	Requête	Nombre de références obtenues:
		CAB Abstracts
Requête pois	ts=((pea OR peas) OR (Pisum) OR (pois))	<a href="#">71504</a>
Requête légumineuses	TS=( "pisum sativum" OR "cicer arietinum" OR "lens culinaris" OR lupinus OR "medicago sativa" OR "phaseolus vulgaris" OR trifolium OR "vicia faba" OR "vicia sativa" OR pois OR lentille* OR lupin* OR luzerne* OR haricot* OR trèfle* OR fève* OR vesce* OR pea OR peas OR chickpea* OR lentil* OR Lens OR lupine* OR alfalfa* OR bean* OR clover* OR faba* OR vetch*)	<a href="#">483960</a>
Requête symptômes	TS=( "pied* noir*" OR "pourriture* noir*" OR "pourriture* racinaire*" OR "nécrose* racinaire*" OR "fonte* d* semis" OR "pourriture* d* collet*" OR "nécrose* d* collet*" OR Jaunissement OR flétrissement OR blackleg* OR "black* rot*" OR "root* rot*" OR "root* decay" OR "root* necrosis" OR "damping off" OR "black* crown*" OR "crown* necrosis" OR "crown* decay*" OR "crown* rot*" OR "black* collar*" OR "collar* necrosis" OR "collar* decay" OR "collar* rot*" OR "neck rot*" OR Yellowish OR Wilting )	<a href="#">54428</a>
Requête pathogènes	TS=( "aphanomyces euteiches" OR "fusarium solani" OR "nectria hoematococca" OR "fusarium oxysporum" OR "fusarium avenaceum" OR "fusarium roseum" OR "gibberella avenacea" OR "fusarium culmorum" OR "fusarium redolens" OR "fusarium equiseti" OR "macrophomina phaseolina" OR "rhizoctonia solani" OR "thielaviopsis basicola" OR "chalara elegans" OR "trichocladium basicola" OR "phoma medicaginis" OR "phoma pinodella" OR "ascochyta pinodella" OR "ascochyta pinodes" OR "mycosphaerella pinodes" OR "dydimella pinodes" OR "phytophthora pisi" OR "phytophthora medicaginis" OR "nectria radicola" OR cylindrocarpon OR "sclerotium rolfsii" OR "sclerotinia sclerotiorum" OR "sclerotinia minor" OR "alternaria alternata" OR pythium)	<a href="#">58093</a>

Le croisement de ces requêtes initiales à l'aide de l'opérateur booléen « AND » a permis d'élaborer deux corpus de travail. Un corpus « pois-symptômes-pathogènes » et un corpus « légumineuses-symptômes-pathogènes » (Tableau 3).

**Tableau 3** : Corpus de travail.

Nom de la requête	Requête	Nombre de références obtenues:
		CAB Abstracts
Corpus "pois-symptômes-pathogènes"	(Requête pois) AND (Requête symptômes) AND (Requête pathogènes)	<a href="#">999</a>
Corpus "légumineuses-symptômes-pathogènes"	(Requête légumineuses) AND (Requête symptômes) AND (Requête pathogènes)	<a href="#">4 375</a>

Le croisement de ce corpus de travail avec des requêtes complémentaires définies à partir de thématiques en liens avec :

- Le sol, ses composantes biotiques et abiotiques :

**Tableau IV** : Requêtes relatives au sol, à ses composantes biotiques et abiotiques.

Nom de la requête	Requête	Nombre de références obtenues:
	Corpus "Pathogènes-légumineuses-symptômes" ( <a href="#">4375</a> ) <b>AND</b>	CAB Abstracts
Sol	ts=(sol* OR terre* OR "profil* d* sol*" OR horizon* OR "matière* organique*" OR humus OR humique* OR "profondeur d* sol*" OR "texture* du sol" OR limon* OR argile* OR sable* OR "structur* du sol" OR "pédique* OR agrégat* OR "structure* particulaire*" OR "structur* massive*" OR "structur* continu*" OR "sol* duré*" OR grume* OR granule* OR "structur* fragmentaire*" OR pedolog* OR "sol* OR ground* OR "sol* profil*" OR "organic* matter*" OR humus OR humic* OR "sol* depth" OR colloid* OR "sol* texture*" OR silt* OR clay* OR sand* OR "sol* structur*" OR "pedic* OR aggregate* OR "particulate* structure*" OR "massiv* structur*" OR "continuous structur*" OR "indurate* OR lump* OR granular* OR "fragmentar* structur*")	<a href="#">2900</a>
	ts=( "acidification* d* sol*" OR "ph d* sol*" OR "particul* mineral*" OR decarbonatation* OR lessivage* OR biodisponibilité* OR "pouvoir* tampon* d* sol*" OR "sol* acidification" OR "sol* ph" OR "mineral* particul*" OR leaching OR bioavailabilit* OR "sol* buffering capacit*")	<a href="#">46</a>
	ts=( "sol* filtrant" OR "sol* battant" OR battance* OR "sol* mouillé*" OR "sol* humide*" OR "capacité* au champ" OR "sol* saturé*" OR "sol* compacte*" OR "sol* asphyxiant" OR "tassement* d* sol*" OR "sol* settlement" OR "porosité* d* sol*" OR "perméabilité* d* sol*" OR "sol* ressuyé*" OR "réserve* util*" OR "filtering soil*" OR "soil* crusting" OR "soil* capping" OR "soil* water content" OR "soil* moisture content" OR "field* capacit*" OR "saturated* soil*" OR "compact* soil*" OR "asphyxiating soil*" OR "soil* compaction*" OR "soil* porosité*" OR "soil* permeabilit*" OR "dried soil*" OR "water holding capacity" OR "water* availability")	<a href="#">52</a>
	ts=( "activit* biologique* d* sol*" OR "faune* d* sol*" OR "pédofaune*" OR "flore* d* sol*" OR bioturbation* OR mycorrhizal* OR "fertilit* d* sol*" OR "soil* biological* activit*" OR "soil* fauna*" OR "soil* flora*" OR rhizosphere* OR microbiom* OR microbio* OR "mycorrhizal fungi" OR "soil* fertilit*")	<a href="#">344</a>
	ts=( "potentiel* infectieux d* sol*" OR "infectivité d* sol*" OR "sol* sensible*" OR "sol* résistant*" OR "réceptivité d* sol*" OR "soil* infectivity" OR "soil* inoculum potential" OR "conductive* soil*" OR "soil* suppressiveness" OR "soil* receptivit*")	<a href="#">28</a>
	"Fatigue du sol"	ts=( "fatigue* d* sol*" OR "soil* exhaustion*" OR "soil* sickness*" OR "soil weakness*")



- Les facteurs climatiques :

Tableau V : Requêtes relatives aux facteurs climatiques.

Nom de la requête		Requête	Nombre de références obtenues:
		Corpus "Pathogènes-légumineuses-symptômes" (4375) <b>AND</b>	CAB Abstracts
Aspect climatique	Termes généraux sur le climat	ts=(facteur* climatique** OR climat* OR "climat* factor** OR atmospher*)	<a href="#">90</a>
	Température	ts=(temperature* OR cold* OR heat* OR hot*)	<a href="#">294</a>
	Humidité	ts=(pluie* OR drought* OR hygrometr* OR humidit* OR rain* OR pluviometr*)	<a href="#">192</a>
	Impactes des saisons	ts=(saison* OR "variation* saisonnière** OR season* OR "seasonal* variation**)	<a href="#">327</a>
	Aspects climatiques (Requête générale)	ts=(facteur* climatique** OR pluie* OR saison* OR "variation* saisonnière** OR climat* OR "climat* factor** OR atmospher* OR temperature* OR cold* OR heat* OR hot* OR temperature* OR drought* OR hygrometr* OR humidit* OR rain* OR pluviometr* OR season* OR "seasonal* variation**)	<a href="#">711</a>

- Les pratiques culturales :

Tableau VI : Requêtes relatives aux pratiques culturales.

Nom de la requête		Requête	Nombre de références obtenues:
		Corpus "Pathogènes-légumineuses-symptômes" (4375) <b>AND</b>	CAB Abstracts
Pratiques culturales	Gestion des cultures/ des plantes/ des variétés	ts=(rotation* d* culture* OR "précédent cultura** OR jachère* OR "densité* d* semis" OR "profondeur d* semis" OR "écartement entre les rangs" OR "période* de semis" OR "date* de semis" OR "période de récolte** OR "date de récolte** OR assolement* OR "crop* rotation** OR "preceding crop** OR "previous crop** OR fallow* OR "seeding rate** OR "seeding depth" OR "row* spacing" OR "planting season** OR "sowing date** OR "harvest* time** OR "harvest* period** OR "harvest* season** OR "cropping plan**)	<a href="#">238</a>
	Apport d'eau	ts=(irrigue* OR arrosage* OR drainage* OR irrigat* OR watering)	<a href="#">373</a>
	Travail du sol	ts=(labour* OR roulage* OR déchaumage* OR sarcl* OR ameublissement OR plowing* OR tillage* OR digging OR ploughing OR rolling* OR "stubble* ploughed" OR "soil* tilth**)	<a href="#">68</a>
	Ajouts d'intrants	ts=(fertilis* OR amende* OR intrant* OR engrais* OR fertiliz* OR "soil* amendment** OR "farm* input**)	<a href="#">219</a>
	Lutte/ traitements	ts=(desherb* OR "traitement* d* culture** OR "traitement d* semence** OR "pesticid* OR insecticid* OR fšngicid* OR herbicid* OR "to weed** OR weeding OR "crop* treatment** OR "seed* treatment**)	<a href="#">1419</a>
	Listes pratiques culturales (Requête générale)	ts=(rotation* d* culture** OR "précédent cultura** OR jachère* OR "densité* d* semis" OR "profondeur d* semis" OR "écartement entre les rangs" OR "période* de semis" OR "date* de semis" OR "période de récolte** OR "date de récolte** OR assolement* OR irrigue* OR arrosage* OR labour* OR roulage* OR déchaumage* OR sarcl* OR ameublissement OR fertilis* OR amende* OR intrant* OR engrais* OR desherb* OR "traitement* d* culture** OR "traitement d* semence** OR "crop* rotation** OR "preceding crop** OR "previous crop** OR fallow* OR "seeding rate** OR "seeding depth" OR "row* spacing" OR "planting season** OR "sowing date** OR "harvest* time** OR "harvest* period** OR "harvest* season** OR "cropping plan** OR drainage* OR irrigat* OR watering OR plowing* OR tillage* OR digging OR ploughing OR rolling* OR "stubble* ploughed" OR "soil* tilth** OR fertiliz* OR "soil* amendment** OR "farm* input** OR "pesticid* OR insecticid* OR fšngicid* OR herbicid* OR "to weed** OR weeding OR "crop* treatment** OR "seed* treatment**)	<a href="#">1883</a>

- Le biocontrôle :

-

Tableau VII : Requête relative au biocontrôle.

Nom de la requête		Requête	Nombre de références obtenues:
		Corpus "Pathogènes-légumineuses-symptômes" (4375) <b>AND</b>	CAB Abstracts
Biocontrôle	Termes généraux sur le biocontrôle des épiphytose et des maladies épidémiologiques :	ts=(biocontrol* OR "contrôl* *biologique** OR "lutte* *biologique** OR "antagonist** OR "organism** OR "auxiliair* OR "stimulateur* d* croissance* d* plant** OR "stimulateur* d* croissance* d* racine** OR "biological* control** OR "auxiliar* OR "plant* growth*stimulant* OR "biostimulant* OR "root* growth*stimulant**)	<a href="#">970</a>

Tableau VIII : Requêtes relatives aux données épidémiologiques.

Nom de la requête		Requête	Nombre de références obtenues:
		Corpus "Pathogènes-légumineuses-symptômes" ( <a href="#">4375</a> ) <b>AND</b>	CAB Abstracts
Etiologie /données épidémiologiques	Termes généraux relatif à l'épidémiologie	ts=(épidémio* OR "fréquence* d* apparition** OR "fréquence* d* isolement** OR incidence* OR occurrence* OR prevalence* OR infectivit* OR "infection rate** OR etiolog* OR "disease* severit** OR (frequency NEAR/3 occurrence) OR (isolation NEAR/4 frequenc*))	<a href="#">1151</a>
	Données d'échantillonnages	ts=(échantillonnage* OR "site* d* échantillonnage** OR "date* d* échantillonnage** OR isolat* OR sampling* OR "sampling* site** OR "sampling* date**")	<a href="#">1332</a>
	Données sur la diffusion de la maladie	ts=(propagation OR "vecteur* de propagation" OR transmission* OR spread* OR "spreading vector** OR "propagation vector**")	<a href="#">174</a>
	Etiologie/Données épidémiologiques (Requête générale)	ts=(incidence* OR "fréquence* d* apparition** OR "fréquence* d* isolement** OR échantillonnage* OR "site* d* échantillonnage** OR "date* d* échantillonnage** OR propagation OR "vecteur* de propagation" OR occurrence* OR prevalence* OR infectivit* OR "infection rate** OR etiolog* OR "disease* severit** OR (frequency NEAR/3 occurrence) OR (isolation NEAR/4 frequenc*) OR isolat* OR sampling* OR "sampling* site** OR "sampling* date** OR transmission* OR spread* OR "spreading vector** OR "propagation vector**")	<a href="#">2205</a>

### II.3. LOGICIEL DE GESTION DE DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

Le logiciel Zotero a été choisi pour la gestion des corpus de références bibliographiques. Zotero est un logiciel de gestion gratuit. Il permet d'organiser et de trier les références bibliographiques issues des bases de données et de la « littérature grise » et de leur attacher des fichiers (pdf, image, documents...) ou des liens internet. Ce logiciel permet, grâce à un navigateur web, de synchroniser des données depuis plusieurs ordinateurs et d'avoir accès à la base à n'importe quel moment. Ce partage n'est pas limité en nombre de collaborateurs, cependant le volume de stockage ne peut pas excéder 300 MB.

La collection de références a été triée par catégories à l'aide de la fonction « Bibliothèque » de Zotero. Seuls les articles et documents d'intérêts disponibles et écrits en anglais et en français ont été utilisés pour effectuer la synthèse bibliographique.

### III. RÉSULTATS

#### III.1. ETUDE BIBLIOMÉTRIQUE

Les résultats de l'étude bibliométrique ont été obtenus à partir de la base CAB. Seule l'origine des auteurs, présentée à titre informatif, est issue des références récoltées dans la base WOS.

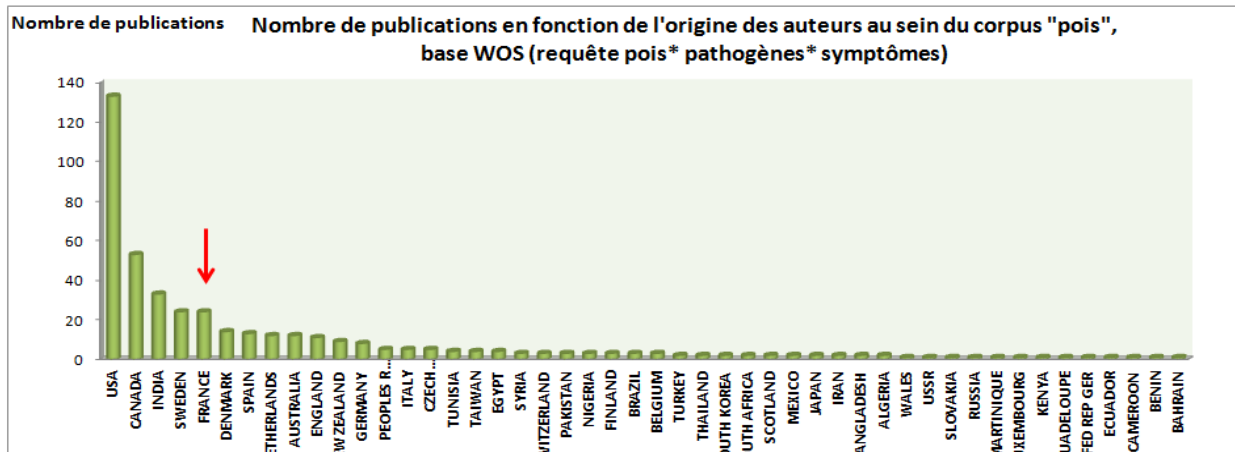


Figure 3 : Nombre de publications en fonction de l'origine des auteurs au sein du corpus « pois », base WOS.

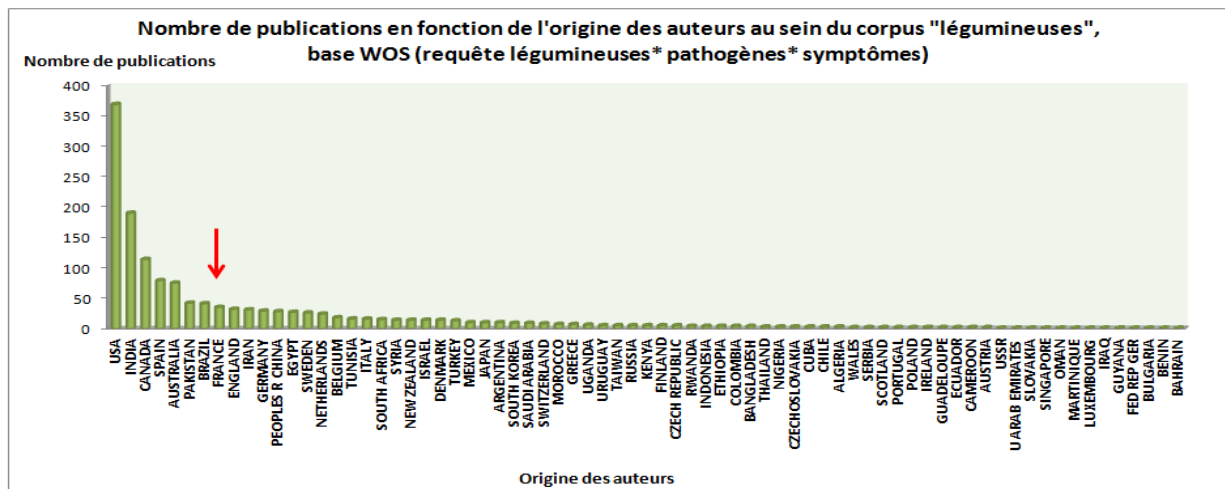
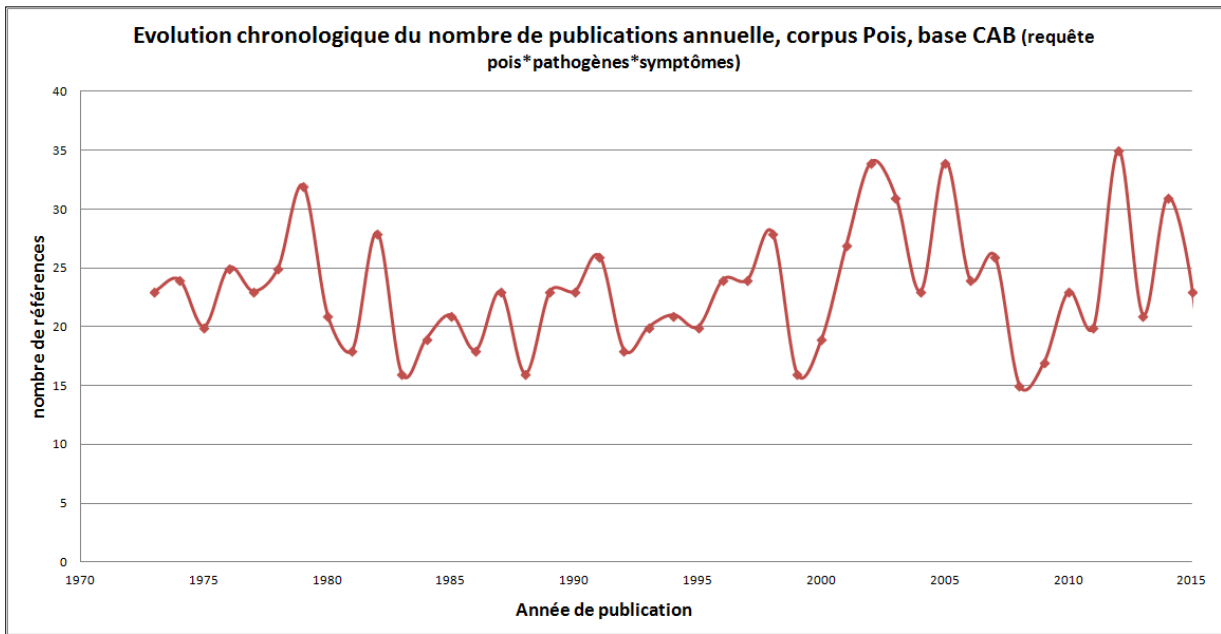


Figure 4 : Nombre de publications en fonction de l'origine des auteurs au sein du corpus « légumineuse », base WOS.

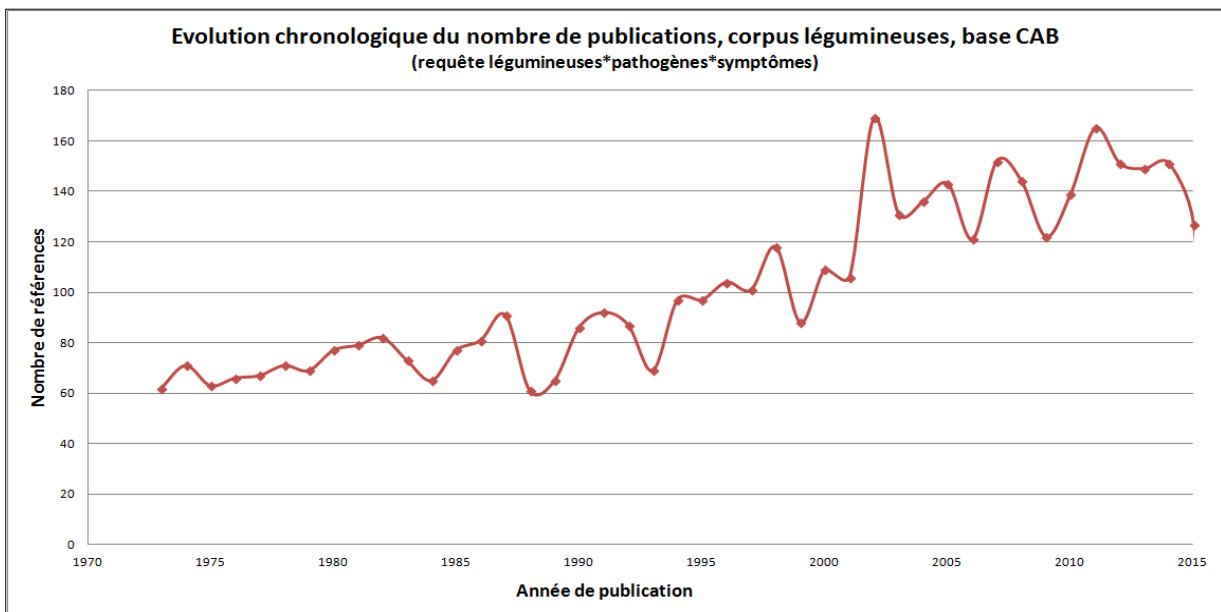
Ces données sont à prendre avec précautions. La présence de nombreuses publications dont les auteurs sont originaires d'un même pays ne signifie pas forcément que la culture intensive du pois ou d'autres légumineuses s'y pratique ou que la maladie y est présente. L'étude peut être menée dans un pays étranger à l'origine des auteurs, notamment dans le cas de collaborations internationales et le nombre de publications est peut être affecté par de nombreux facteurs tels que la taille du pays, son économie et son nombre de chercheurs. Il est cependant possible d'en dégager quelques tendances et surtout de connaître les localités où des personnes se sont intéressées aux problématiques de pourritures racinaires du pois et des légumineuses.

On constate ainsi que les auteurs sont issus de tous les continents, ce qui peut être une résultante de l'aspect mondial de la maladie. Un intérêt marqué pour cette maladie est notamment rencontré dans des zones de cultures du pois comme l'Amérique du nord (Etats-Unis ; Canada), l'Europe (France, Suède, Pays bas, Danemark), l'Inde et l'Océanie (Australie, Nouvelle-Zélande).

Si l'on s'intéresse à l'évolution chronologique du nombre de références publiées chaque année présentes dans les deux corpus issus de la base CAB, on constate une évolution constante dans le cas des légumineuses, d'une soixantaine d'articles par an dans les années 1970 à plus de 140 à partir des années 2000. Cet intérêt croissant n'existe pas dans le cas du pois, pour lequel le nombre de publications, variant entre 15 et 35, a été assez stable sur la période 1973-2015.



**Figure 5 :** Evolution chronologique du nombre de publications de 1973 à 2015, corpus « légumineuses », base CAB.

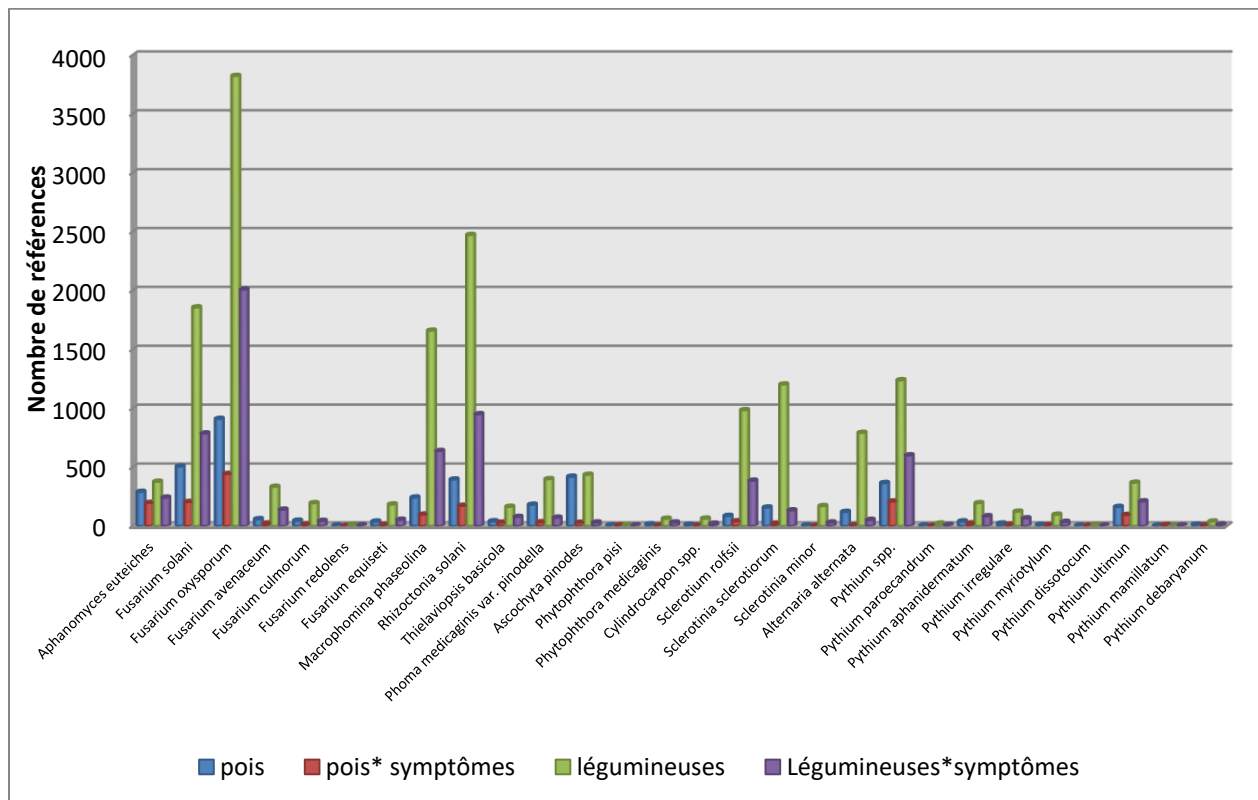


**Figure 6 :** Evolution chronologique du nombre de publications de 1973 à 2015, corpus « pois », base CAB.

La recherche des noms des microorganismes impliqués dans les pourritures racinaires du pois au sein des corpus obtenus avec les requêtes initiales « pois », « légumineuses » et croisées « pois-symptômes », « légumineuses-symptômes », permet de constater une très grande disparité dans la documentation disponible pour chacun d'entre eux. Les noms de microorganismes comme *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*, *M. phaseolina* ou encore *Pythium* spp. sont très fréquemment associés, dans les titres, les abstracts et les mots clefs des références, aux noms de légumineuses et aux mots correspondants aux symptômes de pourritures racinaires. La documentation disponible sur d'autres espèces comme *Phytophthora medicaginis* et *P. pisi* est très faible.

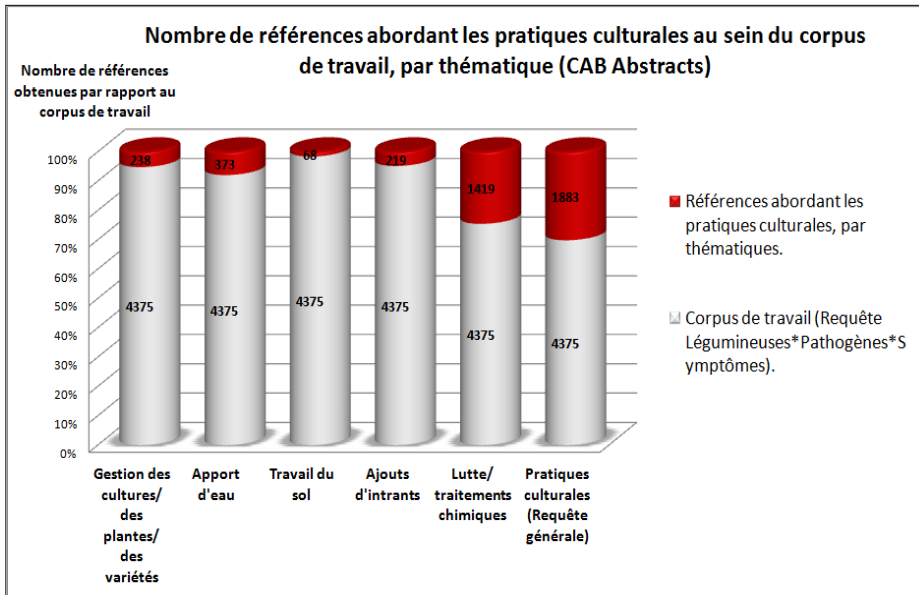
Il est remarquable que certains champignons pathogènes soient plus fréquemment cités avec des noms d'autres légumineuses que le pois. Cet effet pourrait être dû aux spectres d'hôtes étendu de ces agents pathogènes qui ont été étudiés sur d'autres pathosystèmes que le pois.

Enfin il n'est pas surprenant que la documentation disponible sur *A. euteiches* dans les corpus de références, aux alentours de 400 articles, soit principalement centrée sur le pois, l'hôte chez qui il cause le plus de dégât.

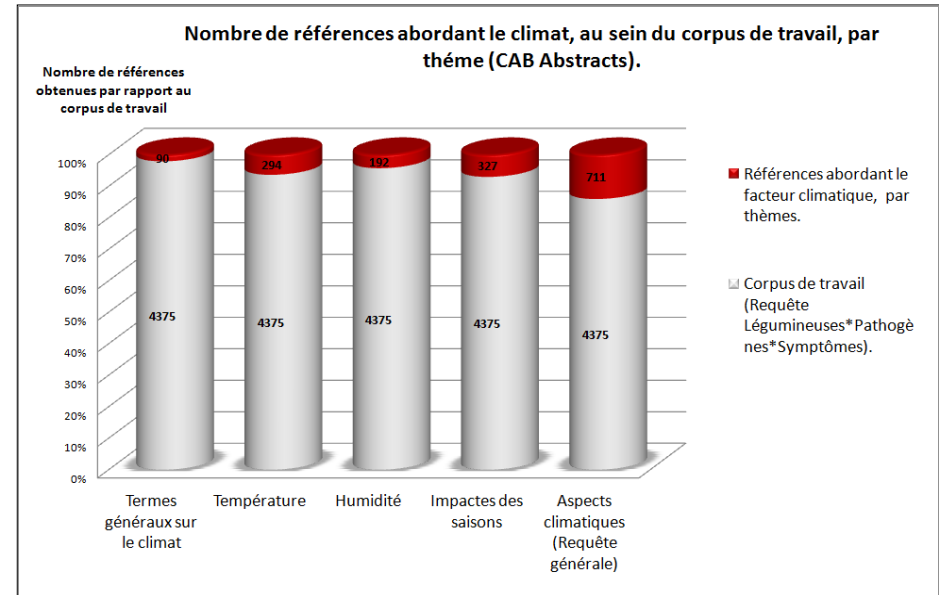


**Figure 7 :** Nombre de références obtenues lors de la recherche des noms de chaque pathogène impliqué dans le complexe des pourritures racinaires du pois au sein des corpus « pois » « pois-symptômes », « légumineuses » et « légumineuses-symptômes » dans la base CAB

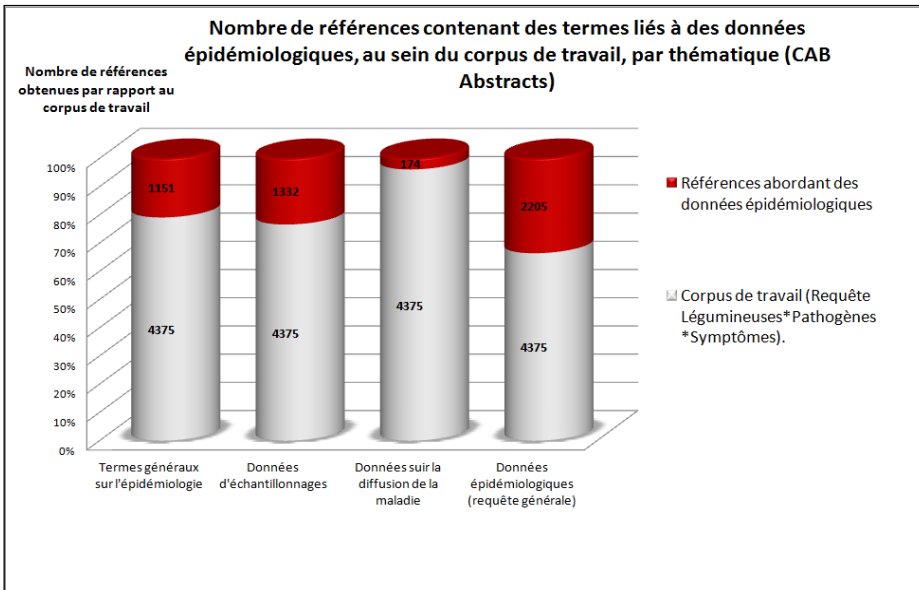
D'autres requêtes relatives à des données épidémiologiques, aux facteurs climatiques, au sol, aux pratiques culturales et au biocontrôle ont été utilisées pour interroger le corpus de travail « légumineuse » obtenu à partir de la base CAB. Il est ainsi possible de déterminer le nombre de références dans ce corpus qui concernent les différentes rubriques abordées au cours de cette synthèse bibliographique.



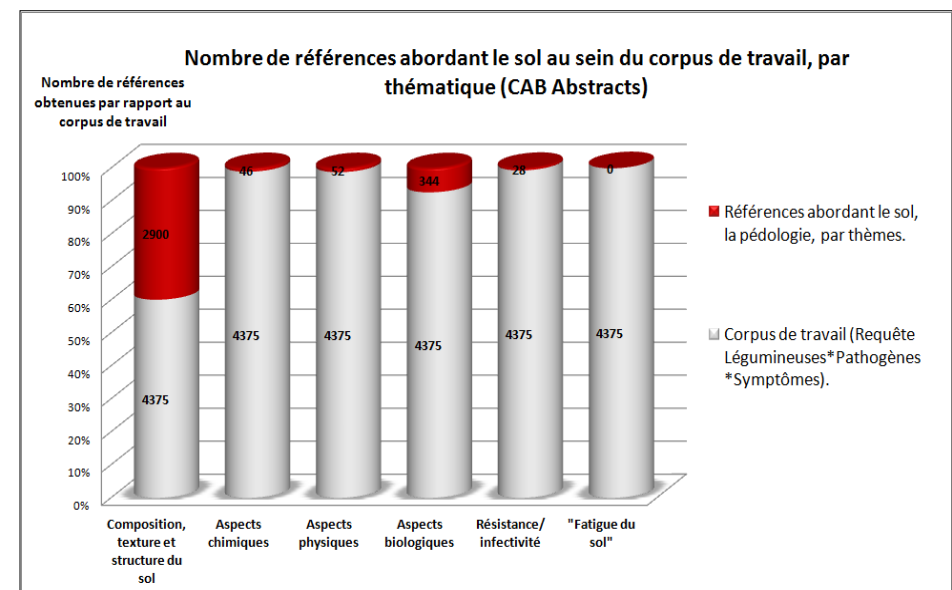
**Figure 8 :** Nombre de références contenant des termes associés à des données épidémiologiques, au sein du corpus légumineuses (CAB Abstracts).



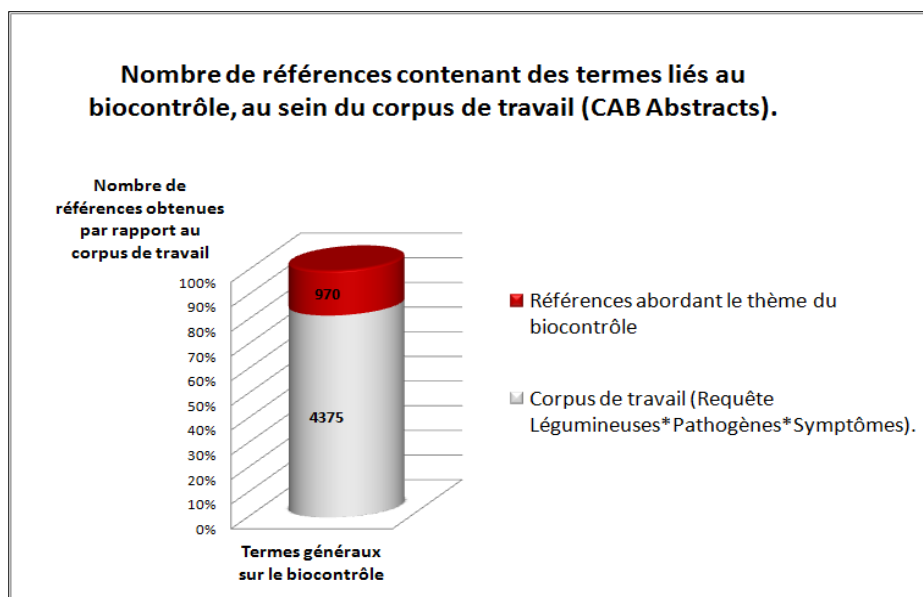
**Figure 9 :** Nombre de références contenant des termes associés au climat, au sein du corpus légumineuses (CAB Abstracts).



**Figure 11 :** Nombre de références contenant des termes associés aux pratiques culturales, au sein du corpus légumineuses (CAB Abstracts).



**Figure 10 :** Nombre de références contenant des termes associés au sol, au sein du corpus légumineuses (CAB Abstracts).



**Figure 12 :** Nombre de références contenant des termes associés au biocontrôle, au sein du corpus légumineuses (CAB Abstracts).

Les termes assez génériques relatifs aux données épidémiologiques sont fréquemment employés dans les références ce qui fournit des résultats élevés mais pas forcément pertinents. Les aspects climatiques et les pratiques culturelles sont moyennement documentés (de 5% à 10% articles) hormis le travail du sol (peu documenté) et la lutte chimique (très documenté). Il est constatable qu'il existe peu de littérature abordant à la fois les pourritures racinaires des légumineuses et les aspects physiques, chimiques et la résistance du sol. Enfin de nombreuses études semblent aborder le thème de biocontrôle qui paraît assez documenté et représente près de 20% des articles.

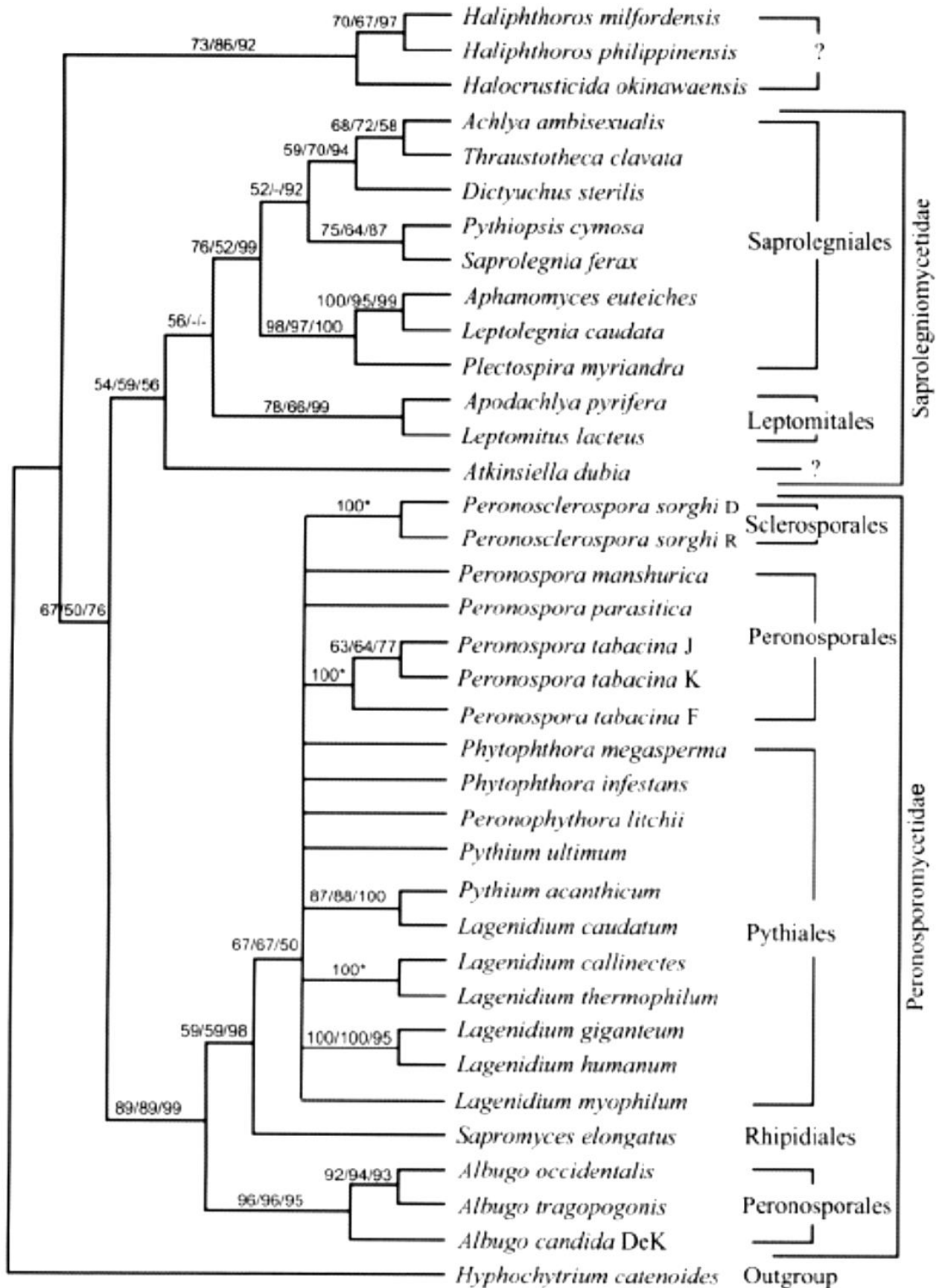
## III.2. BIOLOGIE DES PATHOGENES ASSOCIES AUX POURRITURES RACINAIRES DU POIS

De nombreuses études font état de la diversité des microorganismes impliqués dans les pourritures racinaires noires du pois. La plupart d'entre eux sont des pathogènes d'origines telluriques avec de larges spectres d'hôtes connus pour être à l'origine de pathologies racinaires et des parties supérieures chez une grande variété de plantes et pour causer des dégâts importants au sein de cultures diverses. A l'échelle planétaire, on répertorie ainsi dans la littérature scientifique plus d'une vingtaine d'espèces fongiques ou oomycètes liées aux nécroses racinaires. Différents par leur biologie et leur écologie, ils sont retrouvés dans des proportions très variables et leur rôle et leur importance dans l'émergence de la maladie reste à clarifier. Il paraît ainsi important, sur la base des études épidémiologiques, étiologiques et biologiques effectuées, de présenter leur écologie, leur rôle, et les différentes interactions qu'ils entretiennent dans la rhizosphère du pois et au cours du processus infectieux.

### III.2.1. Les oomycètes impliqués dans les pourritures racinaires du pois.

Les Oomycètes (syn. Peronosporomycètes) regroupent entre 600 et 1500 espèces de microorganismes filamenteux. Ils sont principalement retrouvés dans des habitats aquatiques, en milieu marin ou terrestre (Dick et al. 1999) et peuvent être saprophytes ou parasites d'algues, d'animaux ou de plantes. S'ils ont été longtemps reliés à partir de critères écologiques et morphologiques au règne des *Fungi*, on les distingue aujourd'hui des différents groupes de champignons par l'existence de zoospores biflagellées, la présence de cellules diploïdes au cours de l'essentiel de leur cycle de développement et par la présence de cellulose et l'absence de chitine dans leur paroi cellulaire. Les analyses phylogénétiques moléculaires ont confirmé cette distinction et ont montré une plus proche parenté avec les diatomées (*Bacillariophyceae*) et les algues chromophytes (Algues dorées (*Pelagophyceae*) et algues brunes (*Pheophyceae*)). Différentes études phylogénétiques ont été menées sur les relations existantes au sein des oomycètes (Figure 12). Les données suggèrent que la capacité à infecter les plantes a évolué au moins deux fois au sein de cette classe. Une première fois dans une ancienne lignée qui a divergé entre les Pythiales et les Peronosporales, cette dernière incluant les genres *Pythium* et *Phytophthora*. La seconde fois au sein de l'ordre des Saprolegniales qui inclut le genre *Aphanomyces* (E. Gaulin et al., 2007 cite Kamoun et al., 2001). *Aphanomyces* spp. est subdivisé en trois sous-genres (*Axyromyces*, *Aspiromyces* et *Aphanomyces*) construits à partir de caractéristiques morphologiques déterminées à partir de l'ornementation des parois de l'oogone (Scott 1961). Le sous genre *Aphanomyces* comprend 10 espèces phytopathogènes sur 32 espèces (E. Gaulin et al., 2007).





**Figure 13** : Arbre phylogénique illustrant les relations entre oomycètes, construit à partir de trois arbres phylogéniques : maximum de vraisemblance (ML), maximum de parsimonie (MP), et distance (NJ) de la protéine mitochondriales COX2. Les valeurs de bootstrapp supérieures à 50% sont figurés en dessus de chaque nœud dans l'ordre suivant ML (500), MP (1000), NJ (1000). L'arbre est enraciné sur l'espèce *Hypochytrium catenoides* (Madoui, 2009).

### III.2.1.1. *Aphanomyces euteiches*

#### III.2.1.1.1. Phylogénie et répartition

*Aphanomyces euteiches* Drechs est un agent pathogène majeur des pourritures racinaires des légumineuses et est connu pour causer des dégâts importants parmi les cultures de pois (*Pisum sativum*), de luzernes (*Lens culinaris*) (Malvick et al., 2009), de haricots (*Phaseolus vulgaris*) (Watson et al., 2013) ou encore de trèfles (Greenhalgh et al., 1988), de lentilles (Vandemark & Porter, 2011) et de fèves (*Vicia faba*) (Leur et al., 2003).

Les pourritures racinaires du pois dues à *A. euteiches* ont été décrites pour la première fois par Jones & Drechsler à l'occasion d'une étude conduite en 1924 dans le Wisconsin afin de déterminer l'importance de différentes maladies affectant cette légumineuse. Cet oomycète a été depuis répertorié dans la plupart des zones de cultures du pois au niveau mondial : En Amérique du Nord (Blume & Harman, 1979; Tu, 1991), en Europe (Wicker et al., 2001; Oyarzun & Loon, 1989; Persson et al., 1997) en Nouvelle-Zélande (Manning & Menzies, 1980), au Japon (Kraft & Pflieger, 2001 ; Papavizas & Ayers, 1974). Il est reconnu comme le plus dévastateur sur ce type de culture. Il est difficile d'estimer les pertes de rendements qu'il cause étant donné le nombre important de facteurs mis en jeu et leurs variations suivant le contexte cultural. Aux Etats-Unis, elles ont cependant été estimées de 25-30% dans les champs infestés par *A. euteiches* (Papavizas & Ayers, 1974).

#### III.2.1.1.2. Cycle de vie Ecologie

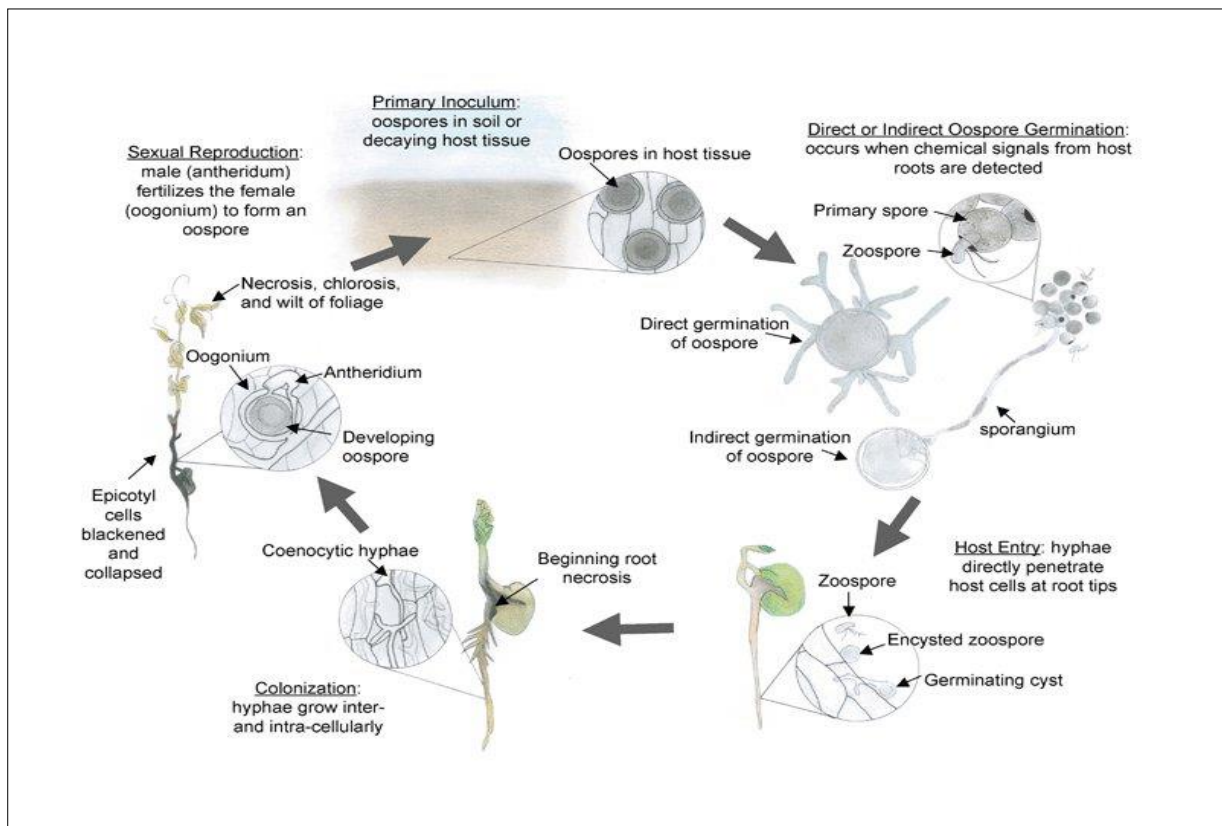


Figure 14: Cycle de vie d'*Aphanomyces euteiches* (Source: <http://www.apsnet.org>).

Le cycle de vie d'*A. euteiches* se déroule dans le sol et *in planta* (Figure 13) (Scott, 1961 ; Papavizas & Ayers, 1974 ; Kraft & Pflieger, 2001 ; Gaulin et al., 2007). Des oospores (12-25  $\mu\text{m}$  de diamètre) sont produites lors d'une étape sexuée et des zoospores (8-12  $\mu\text{m}$  de diamètre) lors d'une étape asexuée (Kraft & Pflieger, 2001). Les oospores, à paroi épaisse, sont formées au niveau des tissus corticaux des racines infectées après la fusion des noyaux d'une oogone et d'une anthéridie. L'oospore, présente dans les tissus en décomposition ou libérée dans le sol, va germer sous l'influence de composés d'origine racinaire lorsqu'elle se retrouve dans l'environnement proche de la plante hôte. Elle va alors former de nouveaux hyphes ou un tube germinatif et un zoosporange, en fonction des conditions nutritives du sol. Le zoosporange peut alors produire plus de 300 zoospores primaires pyriformes regroupées en grappes à l'apex du sporange. Des zoospores peuvent également être produites à partir de sporanges se développant directement à partir du mycélium. De nouvelles zoospores secondaires réniformes biflagellées et mobiles (7 à 8  $\mu\text{m}$  de diamètre et 13  $\mu\text{m}$  de long (Madoui, 2009) émergent un peu plus tard à partir des zoospores primaires enkystées.

Les zoospores sont chimiotactiquement attirées par des composés issus d'exsudats racinaires, notamment certaines isoflavones (Sekizaki et al., 1993), et représentent ainsi le vecteur infectieux de la maladie (Malvick & Percich, 1998). Elles peuvent se déplacer vers leur hôte à l'aide de leurs deux flagelles. Une fois la plante atteinte, il semble que les zoospores s'enkystent préférentiellement au niveau de la zone d'élongation de la racine, par libération et absorption cyclique d'ions calciums (Deacon & Saxena, 1998). Des hyphes se développent à partir des zoospores enkystées et pénètrent dans la racine. La zoospore peut également s'enkyster lorsqu'elle ne trouve pas de site d'infection ou lorsqu'elle subit un choc mécanique. Cependant, elle peut, une fois enkystée, régénérer une nouvelle spore flagellée. Ce phénomène peut se répéter jusqu'à 3 reprises jusqu'à l'établissement de l'infection (Cerenius & Soderhall, 1985; Deacon & Saxena, 1998).

La nécessité d'un appressorium spécialisé pour la pénétration n'est pas établie. Une fois à l'intérieur des tissus racinaires, des hyphes coenocytiques se déploient principalement de manière extracellulaire et colonisent les tissus de l'hôte. Après plusieurs heures, la croissance du mycélium devient inter et intracellulaire et environ 60 heures après le début de l'infection, l'ensemble du cortex racinaire est infecté. Des anthéridies et des oogones haploïdes se forment au bout de quelques jours avec un rapport de 5 anthéridies pour 1 oogone. L'oogone, de forme sphérique et de diamètre entre 25 et 35  $\mu\text{m}$  est fécondée par une anthéridie, les deux noyaux fusionnent et une oospore diploïde est alors formée.

Grâce à leur paroi épaisse et résistante, les oospores peuvent survivre dans l'environnement sans plante hôte entre 10 et 20 ans et peuvent résister à des températures de  $-20^{\circ}\text{C}$  (Pfender, 1983). Ces oogones contiennent des réserves énergétiques sous la forme de vacuoles d'huile et sont très résistantes au froid, à la décongélation et à la sécheresse (Madoui, 2009; Sherwood & Hagedorn, 1962).

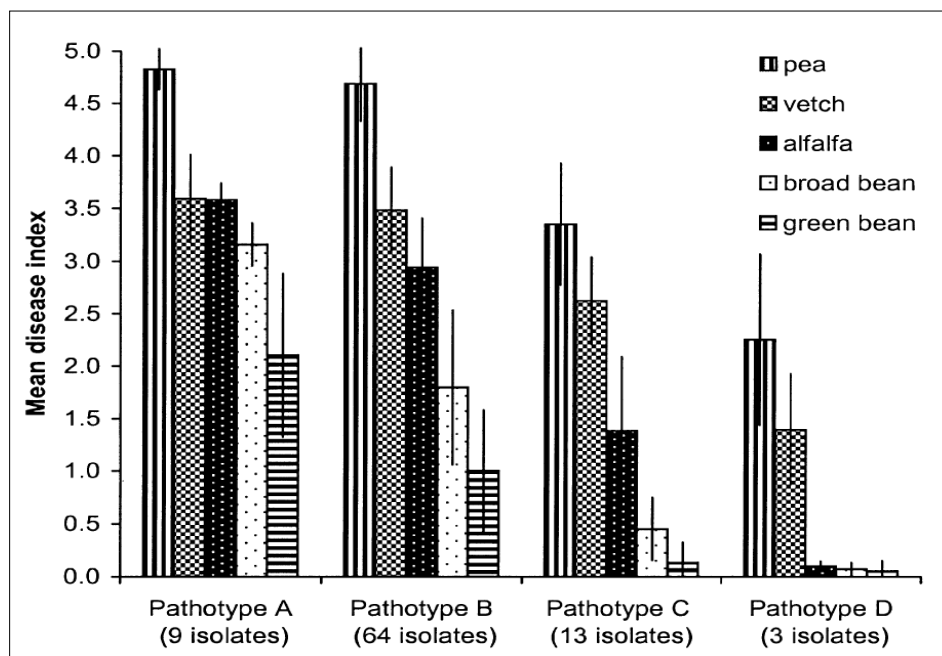
*Aphanomyces euteiches* est connu pour se propager rapidement quand le taux d'humidité du sol est élevé et que la température se situe entre  $22^{\circ}\text{C}$  et  $28^{\circ}\text{C}$  (Papavizas & Ayers, 1974). L'étape de l'infection est très hautement tributaire de l'hygrométrie et ne peut avoir lieu que dans un sol saturé en eau, même ponctuellement. Des précipitations abondantes favorisent ainsi sa propagation.

### III.2.1.1.3. Symptômes

Les premiers symptômes causés par *A. euteiches* apparaissent une à deux semaines après l'infection (Kraft & Pflieger, 2001; Madoui, 2009). L'infection débute par le cortex des racines latérales et primaires. Les racines infectées commencent par jaunir, prennent une couleur brune à noire en se nécrosant et finissent par se dessécher. Le nombre de nodules rhizobiens est fortement diminué. Le pathogène remonte au niveau de l'épicotyle qui prend alors une couleur brune, se nécrose et noircit au fur et à mesure que d'autres microorganismes du complexe parasitaire envahissent les tissus. L'eau et les nutriments ne peuvent plus alimenter le reste de la plante qui est victime de nanisme, de chlorose et flétrissure. La production de cosses et le nombre de graines qu'elles contiennent sont fortement diminués. Il arrive que la plante meurt avant même la production des gousses. La sévérité des symptômes dépend largement d'autres facteurs environnementaux.

### III.2.1.1.4. Pathogénie et virulence

Les caractéristiques pathogéniques d'*A. euteiches* varient suivant la souche étudiée. Si la plupart des isolats caractérisés à travers le monde possèdent un spectre d'hôtes assez large au sein des légumineuses, on peut les regrouper entre différents pathotypes avec une virulence voire une gamme d'hôtes spécifiques (Holub et al., 1991). Une étude a été conduite pour déterminer la spécificité d'hôtes de plus de 91 souches isolées de pois originaires des différentes régions françaises et de 13 autres isolats issus de différents hôtes et de différents pays. La virulence des isolats a été testée sur le pois, la vesce, la luzerne, la fève et le haricot vert. Seulement 10% des isolats étaient agressifs sur les 5 hôtes testés et 4 pathotypes différents ont pu être identifiés (Figure 14) (Didelot & Chaillet, 1995; Wicker et al. 2001).



**Figure 15 :** Caractéristiques pathogéniques de quatre pathotypes d'*A. euteiches*, définis selon une méthode de classification à partir de 89 isolats provenant de pois. Les isolats avec une valeur de « Mean disease Index » inférieur à 1.0 sont considérés comme non pathogène sur le pois, la vesce, la luzerne, la fève et inférieur à 2.0 comme non pathogène sur le haricot vert (Source : Wicker et al., 2001).

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires infectieux des oomycètes, des génomes de plusieurs espèces de *Phytophthora*, et plus récemment de l'espèce *A. euteiches* ont été séquencés et des banques d'ADNc ont été construites (Gaulin et al., 2008).

Différentes familles de protéines potentiellement impliquées dans la pathogénie ont ainsi été mises en évidence. On retrouve des protéines avec des séquences communes aux protéines CBEL impliquées dans l'adhésion aux surfaces chez le genre *Phytophthora*. D'autres gènes codant pour des protéases et des inhibiteurs de protéases sont fortement exprimés, ce qui suggère que les protéases jouent un rôle majeur dans le processus infectieux d'*A. euteiches*. Des protéines de type ABC transporteur, qui jouent un rôle important dans la résistance aux toxines sécrétées par les plantes, sont également exprimées en abondance. Cependant, des effecteurs cytoplasmiques à domaine RxLR-dEER présents chez d'autres oomycètes, pouvant être transloqués dans le cytoplasme de l'hôte et interagir avec une cible s'y trouvant, ne semblent pas présenter de gènes homologues chez *A. euteiches*. Par contre, des gènes montrant une similarité de séquences avec ceux de la famille d'effecteurs CRNs (CRinkling and Necrosis family) ont été mis en évidence. Si la fonction exacte de cette famille n'est pas bien connue, sa conservation au sein de nombreuses classes d'oomycètes pathogènes suggère qu'elle joue un rôle spécifique dans la pathogénie.

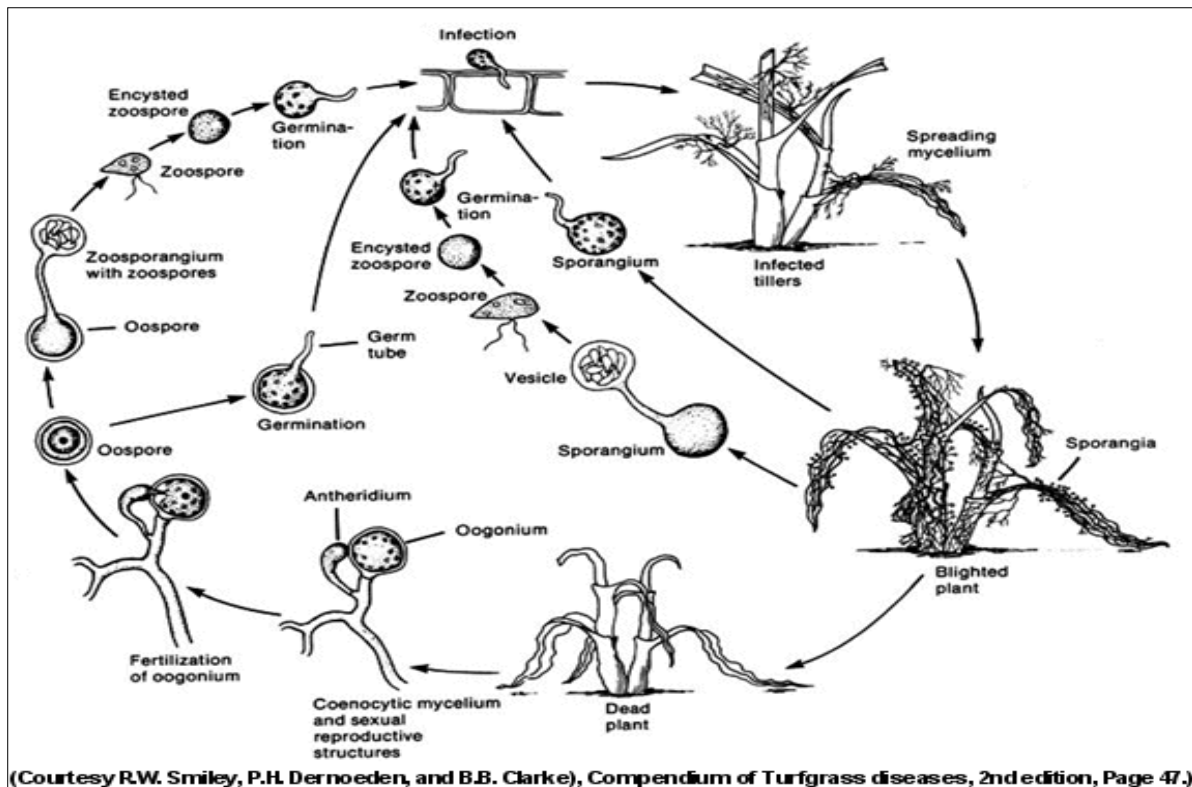
### III.2.1.2. *Pythium spp.*

#### III.2.1.2.1. Phylogénie et répartition

Le genre *Pythium* regroupe 150 espèces décrites à ce jour. Il appartient à la famille des Pythiaceae, à l'ordre des Pythiales et à la classe des Oomycètes. (Kirk et al., 2008; Uzuhashi et al., 2010). Les *Pythium* sont retrouvés dans de nombreuses niches écologiques différentes comme les terres arables, les pâturages, les forêts ou les eaux (Plaats-Niterink, 1981).

De nombreuses espèces du genre *Pythium* font partie du complexe parasitaire du pois et sont la cause de fonte des semis, de pourritures des semences et de pourritures racinaires. On les retrouve dans la plupart des zones de production de pois à travers le monde, en Amérique du Nord (Reyes, 1980; Tu, 1987), en Europe (Persson et al., 1997; Soylu & Dervis, 2011; Oyarzun, et al., 1993), en Australie (Kerr, 1963), ou encore en Afrique du Sud (Botha & Coetzer, 1996). Les *Pythium* sont reconnus pour faire partie des pathogènes du complexe parasitaire du pois les plus fréquents et peuvent causer des dégâts très importants aux cultures, cependant leur contribution relativement aux autres agents du de ce consortium est difficile à estimer.

### III.2.1.2.2. Ecologie et cycle de vie



**Figure 16:** Cycle de vie de *Pythium* ssp. sur le gazon (Source: <http://www.apsnet.org>; Compendium of Turfgrass diseases, 2<sup>nd</sup> edition, page 47).

Les *Pythium* ont un cycle de reproduction sexuée et un cycle de reproduction asexuée (Baudoin et al., 2013). Le cycle sexué est basé sur la fécondation d'une oogone par une anthéridie. L'oogone, de forme plus ou moins sphérique, peut être intercalaire ou terminale. Sa paroi peut être lisse ou ornementée. L'anthéridie peut être sessile sur un hyphe, intercalaire ou se former à l'extrémité terminale. Après la fécondation et la fusion des noyaux, un zygote se forme et évolue en oospore. Chez la plupart des espèces, la paroi de l'oospore est lisse. Les ions Ca, Mg, K, Zn, Mn ont des effets stimulants sur la croissance et la reproduction sexuée (Hsu et al., 1972). Les stérols (cholestérol et  $\beta$ -sitostérol...) stimulent la croissance et la reproduction via les oospores et permettent leur survie à des températures importantes. Une période de maturation et une phase de dormance sont nécessaires avant que la germination ne commence. A ce stade, la paroi de l'oospore se rétrécit et un tube germinatif est produit (Lumsden et al., 1987).

Le cycle asexué est basé sur la production de zoospores à partir d'une vésicule à l'extérieur des zoosporanges. Le sporange est séparé du reste du mycélium par une paroi transversale (Stanghellini & Hancock, 1971). Un tube peut se développer à partir du sporange et une vésicule se forme à son extrémité à partir d'un contenu encore indifférencié. Si l'environnement est suffisamment humide, la paroi de la vésicule disparaît 10 à 20 minutes plus tard et libère les zoospores formées dans le milieu. La production de sporanges est stimulée par les ions Mg, K et Ca. Les exsudats racinaires et les semences qui germent ont un effet stimulant sur la germination du sporange et la croissance hyphale (Stanghellini & Hancock, 1971).

Les oospores et les sporanges à paroi épaisse sont considérés comme les formes persistantes des *Pythium* dans les sols et sur les débris racinaires (Kraft & Pflieger, 2001). Tous les *Pythium* impliqués dans les maladies du pois ont un spectre d'hôte très large et peuvent coloniser d'autres légumes et mauvaises herbes qui servent de réservoirs.

### III.2.1.2.3. Symptômes

La plupart du temps, les *Pythium* peuvent coloniser racicule et cotylédons dès la germination de la graine. Après émergence, quand les racines principales et les cellules de la tige développent une paroi plus épaisse, l'infection se concentre sur les tissus juvéniles au niveau de la pointe des racines qui adoptent une couleur marron claire. Le développement et la longueur des racines latérales peuvent ainsi être fortement affectés et la plante, avec un système racinaire restreint, va être victime de chlorose et rabougrir (Kraft & Pflieger, 2001).

### III.2.1.2.4. Identification des *Pythium*

Dans le passé, plusieurs caractéristiques morphologiques étaient utilisées afin d'identifier le genre *Pythium* (Baudoin et al., 2013):

- La présence des structures sexuelles (homothalles et hétérothalles).
- La morphologie des sporanges (sphériques, filamenteux ou lobulés).
- La paroi de l'oogone (lisse ou ornementée).
- Les caractéristiques de l'oospore (plérotique ou aplérotique).
- Les caractéristiques des anthéridies.

Cependant, ces caractéristiques varient suivant les conditions de culture et les isolats testés (Dick, 2001). Les techniques moléculaires de caractérisation comme l'analyse des ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADNr représentent désormais une approche beaucoup plus pertinente pour l'identification des différentes espèces de *Pythium*. La région des ITS (ITS1 et ITS2) utilisée pour identifier et classer les *Pythium* possède une longueur très variable et englobe le gène 5,8S ((Kageyama et al., 2005 ; Lévesque & de Cock, 2004). Elle est souvent utilisée en combinaison avec le gène codant pour la  $\beta$ -tubuline ou encore le gène *coxII* (codant pour la cytochrome oxydase-2 mitochondriale) (Belbahri et al., 2008; Robideau et al., 2011).

### III.2.1.2.5. Les différentes espèces répertoriées sur les pourritures racinaires du pois

Plusieurs espèces de *Pythium* sont fréquemment associées aux pourritures racinaires du pois. On compte notamment *Pythium ultimum* Trow, qui a été répertorié avec une forte prévalence au Canada (Tu, 1991; Reyes, 1980) et en Australie (Kerr, 1963). *Pythium irregulare* Buisman qui a été retrouvée sur des nécroses racinaires du pois au Etats-Unis (Reyes, 1980), en Scandinavie (Persson et al., 1997) et en Afrique du sud (Botha & Coetzer, 1996) et *P. dissotocum* Dreschsler, qui a été mise en évidence sur le pois au Etats-Unis (Dreschsler, 1940) et en Afrique du Sud (Botha & Coetzer, 1996).

D'autres espèces ont une occurrence beaucoup plus faible et leur importance dans la pathologie est questionnable. On répertorie ainsi *P. aphanidermatum* Fitzp. (Kraft & Pflieger, 2001), *P. mamillatum* Meurs (Afrique du Sud (Botha & Coetzer, 1996)), *P. hypogynum* Middleton (Canada

(Reyes, 1980)), *P. paroecandrum* (Defago et al., 1975); *P. vexans* de Bary ((Kraft & Pflieger, 2001); Canada (Reyes, 1980), *P. splendens* H. Braun (Kraft & Pflieger, 2001), *P. oligandrum* Drechs. (Canada (Reyes, 1980), *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix (Canada (Reyes, 1980)), *P. splendens* H. Braun (Kraft & Pflieger, 2001) ou encore *P. debaryanum* Auct (Kraft & Pflieger, 2001).

### III.2.1.3. *Phytophthora pisi*

#### III.2.1.3.1. Phylogénie et répartition

Dans le sud de la Suède, une nouvelle espèce du genre *Phytophthora*, *P. pisi*, vient d'être décrite pour son implication dans les pourritures racinaires du pois et de la fève (Heyman et al. 2013). Jusque là, si d'autres espèces de *Phytophthora* ont été décrites pour causer des nécroses racinaires sur certaines *Fabaceae* (*P. medicaginis* sur luzerne (Haan et al., 1996) ; *P. clandestina* sur le trèfle souterrain (*Trifolium subterraneum* L.) en Australie (Greenhalgh & Taylor, 1985) ; ou encore *P. sojae* sur le soja (Feng et al., 2009)), aucune n'avait encore été inventoriée pour causer des pourritures racinaires au pois potager. Les analyses phylogénétiques basées sur les séquences de la région des ITS (ITS1-5.8S-ITS2) et du gène de la cytochrome oxydase 2 (*cox2*) classent *P. pisi* proche de *P. sojae* et de *P. cinnamoni* var. *robiniae*, agent provoquant des pourritures de la tige et du chancre sur l'écorce des robiniers (genre *Robinia*, *Fabaceae*).

#### III.2.1.3.2. Incidence et symptômes causés

L'incidence de *P. pisi*, testée sous serres à partir d'échantillons de sols infestés est assez faible (2 à 4,5% pour les années 2009 à 2011), relativement à celle d'*A. euteiches* testée sur ces mêmes échantillons (23 à 27%) (Heyman et al., 2013). Heyman et al. décrivent 7 légumineuses sensibles parmi les 16 testées avec 3 isolats différents de *P. pisi*, toutes faisant partie du clade des « Vicoides » (Wojciechowski et al., 2004) (le pois (*Pisum sativum* « *Finulf* ») ; le pois chiche (*Cicer arietinum*) ; le pois de senteur (*Lathyrus odoratus* « *Mammoth Scarlet* ») ; la lentille (*Lens culinaris*) ; la fève (*Vicia faba* « *Laura* ») et la vesce (*Vicia sativa* « *Candy* »)).

Les espèces sensibles développent de légères pourritures d'une couleur marron claire, à l'exception de la fève qui adopte une décoloration noire caractéristique au niveau des parties infectées. Les tissus lésés sont mous et de nombreuses oospores peuvent être visualisées au microscope. Les lésions touchent les racines principales et latérales et peuvent varier d'un individu à l'autre. La croissance des racines infectées peut être stoppée et seul l'apex présente alors des pourrissements, mais elle peut également être compensée par le développement et le buissonnement des parties saines du système racinaire. Chez toutes les plantes sensibles l'infection s'arrête au niveau de la graine, mais il arrive qu'une dégradation enzymatique soit observée sur le bas de la tige. Les infections les plus sévères mènent au rabougrissement et au dessèchement des parties supérieures de la plante. Des nécroses partielles peuvent survenir au niveau des feuilles basses et des stipules. Dans certains cas, ces symptômes peuvent mener à la mort de la plante au bout de 4 semaines.



### III.2.1.3.3. **Ecologie de *Phytophthora pisi***

L'emplacement et l'historique cultural des parcelles où a été mis en évidence la présence de *P. pisi*, ainsi que la culture intensive du pois sur de nombreuses années favoriseraient l'émergence de ce pathogène (Heyman et al. 2013). La colonisation des tissus de l'hôte et la production de spores sexuées et asexuées restreintes aux parties racinaires argumenteraient en faveur d'un cycle de vie strictement tellurique. La dispersion de ce pathogène, sur une culture qui ne nécessite pas de récolte racinaire, serait ainsi liée à des déplacements de sols ou des tissus infectés par les pratiques agricoles.

## III.2.2. **Les *Fusarium***

Le genre *Fusarium* a été mis en évidence par Johan H. F. Link il y a presque 200 ans. Les espèces qu'il regroupe sont présentes dans la plupart des environnements terrestres du monde, et peuvent être saprophytes ou parasites de plantes et d'animaux. La plupart d'entre elles présentent une grande diversité infraspécifique et il est possible de retrouver des souches pathogènes et saprophytes au sein d'une même espèce. Chez plusieurs espèces, certaines souches pathogènes ont développé une spécificité d'hôte. Chez *F. oxysporum* et *F. solani*, qui possèdent tout deux un spectre d'hôte assez large on retrouve ainsi de très nombreuses *formae speciales*.

### III.2.2.1. ***Fusarium solani* f. sp. *psi***

#### III.2.2.1.1. **Répartition et diversité de *Fusarium solani* f. sp. *psi***

*Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *psi* (F. R. Jones) W. C. Snyder & H. N. Hans. est communément cité dans la littérature comme l'agent des pourritures racinaires fusariennes. Il a été décrit pour la première fois comme responsable d'une maladie sérieuse du pois dans le Minnesota en 1918 et dans le Wisconsin en 1923. Il agit souvent en combinaison avec les autres pathogènes responsables de pourritures racinaires et peut causer des pertes importantes. Dans certaines province canadienne où *F. solani* f. sp. *psi* est le principal pathogène la baisse des rendements peut atteindre ainsi 35% à 57% (Kraft & Pflieger, 2001). Il a une distribution mondiale et a notamment été mis en évidence au Etats-Unis (Blume & Harman, 1979), au Canada (Reyes, 1980; Tu, 1987a; Hwang & Chang, 1989), en Chine (Ni et al., 2012), en Australie (Kerr, 1963), en Suède (Persson et al., 1997) et au Danemark (Oyarzun et al., 1993a).

#### III.2.2.1.2. **Ecologie et symptômes**

L'infection par *F. solani* f. sp. *psi* commence toujours au niveau d'un stomate de l'épicotyle ou de l'hypocotyle (Kraft & Pflieger, 2001). Elle se poursuit vers le bas jusqu'à infecter tout le système racinaire. Le champignon peut également pénétrer dans la plante au niveau de la cuticule de l'épicotyle via son activité enzymatique.

Il persiste dans l'environnement sous la forme de chlamydospores. La germination, la croissance, et l'infection sont favorisées par les nutriments que la graine et la plantule de pois

relâchent au moment de la germination et de la croissance. La sévérité de l'infection s'accroît à mesure que la quantité d'exsudats relâchés par la graine augmente et qu'elle perd de la vigueur. La température idéale pour la croissance du pathogène est d'environ 25-30°C et la maladie se développe à partir de 18°C. Les premiers symptômes apparaissent sous la forme d'une coloration rougeâtre à marron et de stries noires sur les racines primaires et secondaires. Le système vasculaire peut se colorer en rouge, souvent au niveau de l'attache du cotylédon mais ne dépasse pas la ligne du sol. La croissance des parties aériennes peut être retardée, et les feuilles basales peuvent jaunir voire se nécroser.

### III.2.2.1.3. Facteurs de pathogénicité

Chez *Nectria haematococca* (anamorphe *F. solani* f. sp. *pisi*), les pourritures racinaires sont liées à un cluster de 6 gènes localisés sur un chromosome surnuméraire et exprimés lors du processus infectieux sur le pois (« PEP genes » pour « Pea Pathogenicity Genes » : *PDA1*, *PEP1*, *PEP2*, *PEP3*, *PEP4* et *PEP5*) (Han et al. 2001; Funnell et al., 2002; Temporini & VanEtten, 2002). Ce cluster aurait été acquis par transfert horizontal et aurait joué un rôle important dans la détermination de la forme spéciale *pisi* ((Temporini & VanEtten, 2004 ; Milani et al., 2012). On retrouve notamment des gènes homologues aux gènes *PEP* chez *Neocosmospora boniensis* et à l'exception de *PEP3*, et chez *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Temporini & VanEtten, 2004). La quantification du gène *PEP3*, spécifique à *N. haematococca*, par qPCR, permet notamment de diagnostiquer la présence et quantifier le nombre de spores virulentes de *N. haematococca* dans les sols agricoles (Etebu & Osborn, 2010). Quatre de ces gènes, (*PDA1*, *PEP1*, *PEP2*, *PEP5*) seraient déterminant pour atteindre un niveau maximal de virulence sur le pois potager. Seul la fonction de *PDA1*, qui code pour une cytochrome P450 mono-oxygénase, la pisatine-déméthylase est connue. Cette enzyme permet de convertir la pisatine, une phytoalexine, composé de faible poids moléculaire avec une action antibiotique, en un composé moins toxique pour le champignon.

Huit autres gènes *PDA* ont été mis en évidence chez *N. haematococca* MPVI (anamorphe *F. solani* f. sp. *pisi*) (Coleman, Wasmann, et al., 2011). Les produits des gènes *PDA* ont un degré de spécificité et une affinité biochimique très importante pour la pisatine et sont nécessaires à la virulence du champignon lors de l'infection du pois, ce qui suggère que le système de détoxification basé sur ces cytochromes P450 est apparu durant l'évolution de *N. haematococca* comme pathogène du pois (Mackintosh et al., 1989). La production d'un Transporteur ABC (ATP-Binding-Cassette) spécifique, NhABC1, améliore également la tolérance à la pisatine (Coleman et al., 2011). L'énergie dépensée pour l'efflux de la pisatine par NhABC1 dispenserait, par un fonctionnement de manière séquentiel, la répression de la pisatine par le cytochrome P450 (Coleman et al., 2011). Le contournement de ce composé antimicrobien par les agents phytopathogènes du pois se fait ainsi par l'acquisition de multiples mécanismes de résistances au cours de l'évolution.

Le chromosome surnuméraire ou chromosome CD (Conditionally Dispensable) qui dispose du cluster *PEP* porte aussi les gènes de la famille *HUT* (Homoserine UTILization), qui permettent l'utilisation des homosérines. Ce sont des composés présents en grande quantité dans les exsudats racinaires du pois (Rodriguez-Carres et al., 2008). Les études de compétition démontrent que les souches de *N. haematococca* disposant du chromosome CD sont plus compétitives dans la rhizosphère du pois que celles n'en disposant pas (Rodriguez-Carres et al., 2008).

### III.2.2.2. *Fusarium oxysporum*

*Fusarium oxysporum* est une des espèces les plus fréquemment associées au complexe parasitaire du pois et peut également causer des dégâts importants aux cultures. On retrouve cependant trois contextes différents distinguant les isolats de *F. oxysporum*:

- Le premier concerne les souches de *F. oxysporum* saprophytes : même si elles sont fréquemment isolées au niveau de symptômes racinaires de type nécroses ou pourritures, ces souches endophytes ou issues de la rhizosphère du pois ne sont pas pathogènes et ne causent aucun symptôme apparent lors de tests du pouvoir pathogène (Skovgaard et al., 2002). L'écologie de ce type de *F. oxysporum* dans la rhizosphère du pois demeure peu étudiée. Dans d'autres pathosystèmes impliquant les formes pathogènes de *F. oxysporum*, les formes non pathogènes de ce champignons apparaissent comme des agents de contrôle en limitant l'activité infectieuse des pathogènes par compétition pour des ressources trophiques et spatiales et par une élévation des réactions de défense de la plante hôte (Aimé et al., 2013; Alabouvette et al., 2007 ; Alabouvette et al., 2009).
- Le deuxième cas est celui des souches de *F. oxysporum* responsables de nécroses racinaires sur le pois, des symptômes qui sont habituellement attribués à l'espèce *F. solani* f. sp. *pisi*. Ils peuvent être d'une sévérité non négligeable et avoir un impact réel sur les rendements (Soylu & Dervis, 2011; Persson et al., 1997 ; Skovgaard et al., 2002). Lors d'une étude épidémiologique sur les nécroses racinaires du pois effectuée au Canada, *F. oxysporum* a été isolé trois fois plus fréquemment que *F. solani* (Hwang & Chang, 1989). Malgré leur importance relative, ce type de *F. oxysporum* reste peu ou pas étudié et il existe peu d'informations disponibles dans la littérature.
- Le troisième cas, le plus courant et le mieux décrit, concerne *F. oxysporum* Schelcht f. sp. *pisi* (Van Hall) Snyd. et Hans., l'agent responsable de flétrissements fusariens du pois. Cette *forma specialis* est spécifiquement pathogène du pois même si elle a également été décrite pour causer des nécroses racinaires chez le pois chiche (Curtis et al., 2014). On la retrouve très souvent dans le complexe parasitaire associé aux nécroses racinaires du pois.

D'après une étude MLST (Multilocus Sequence Typing) menée sur des souches pathogènes, faiblement pathogènes et non pathogènes pour le pois provenant de différentes localités au Danemark, il ne semblerait pas y avoir de corrélation phylogénétique avec la virulence de ces trois différents types de souches (Skovgaard et al., 2002).

### III.2.2.3. Répartition et diversité de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*

*F. oxysporum* f. sp. *pisi* peut causer des dégâts importants aux cultures. Il a été rapporté de toutes les zones productrices de pois à travers le monde : au Canada (Tu, 1987a; Reyes, 1980), en Australie (Kerr, 1963), en Inde (Sharma, 2011), à Taiwan (Lin et al., 1984), en Algérie (Merzoug et al., 2014) en Turquie (Soylu & Dervis, 2011), en Suède (Persson et al., 1997), ou encore au Pays-Bas (Oyarzun & Loon, 1989).

Onze races ont été décrites chez ce pathogène, mais il existe des désaccords sur leur classification (Kraft & Haglund, 1978). La race 1 « wilt », et la race 2 « near-wilt » (appelée ainsi car les symptômes apparaissent plus tard dans la saison), ont été les premières répertoriées et ont une distribution mondiale. Chez le pois il existe des résistance monogéniques dominantes connues contre ces deux races (Kraft, 1994). Les races 3 et 4, initialement répertoriées au Danemark et au Canada, ont été finalement classifiées comme des isolats plus virulents de la race 2 (Kraft & Pflieger, 2001). Les races 5 et 6, décrites dans l'Etat de Washington dans les années 1970, ne représentent un problème qu'aux Etats-Unis (Merzoug et al., 2014 ; Infantino et al., 2006).

### III.2.2.3.1. **Ecologie de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi***

*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* peut survivre plus de 10 ans dans le sol sous la forme de chlamydospores. Sa survie est également liée à sa capacité à infecter les cellules corticales et épidermiques de nombreuses plantes non hôtes ou résistantes (Kraft, 1994). Les exsudats racinaires semblent être à l'origine de la germination des chlamydospores (Kraft, 1994 cite Huisman, 1982). *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* pénètre usuellement dans la plante hôte par l'apex, région indifférenciée des racines, le nœud cotylédonaire ou les racines blessées (Kraft & Pflieger, 2001). L'infection se propage de manière inter et intracellulaire jusqu'à l'envahissement total du xylème.

### III.2.2.3.2. **Symptômes causés par *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi***

Dans le Compendium of pea diseases, Kraft & Pflieger (2001) décrivent assez exhaustivement les symptômes causés par les races 1, 5 et 6. En premier lieu, les feuilles et les stipules s'enroulent vers le bas. Les tiges et les feuilles peuvent être plus fragiles que chez les plants sains. Le système racinaire superficiel semble normal, mais il peut apparaître une coloration jaune à orange des tissus vasculaires lorsqu'ils sont sectionnés longitudinalement. Cette coloration s'étend jusqu'à l'épicotyle et le nœud basal des plants infectés. La maladie se développe rapidement à des températures du sol proche de 20°C. Les feuilles jaunissent progressivement de la base de la tige à l'apex de la plante. Très vite la totalité des parties aériennes de la plante flétrit et meurt. Si le système racinaire n'est pas envahi par des microorganismes responsables de nécroses racinaires ou par des pathogènes secondaires, des bourgeons auxiliaires peuvent se développer à partir du premier ou du deuxième nœud basal. En plein champs, il n'est pas rare de rencontrer cette pathologie sous la forme de « patches » de plantes flétries ou mortes. Les plantes n'atteignant pas la maturité, la dissémination du pathogène se fera préférentiellement par les déplacements de sol et de débris végétaux infestés.

La race 2 se rencontrera plus spécifiquement sur des plants isolés dans le champ. L'infection débutera plus tard quand la plante a entamé sa floraison ou la production de cosses. Une dissémination de ce pathogène par les semences est ainsi possible. Les symptômes sont assez similaires à ceux des races 1, 5 et 6, même si la décoloration des tissus racinaires, de teinte orangée à rouge sombre, peu être plus intense et progresser des racines à l'apex de la plante.

### III.2.2.3.3. **Pathogénie de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi***

Au niveau génétique, des gènes orthologues à ceux du cluster de gènes *PEP* (*Pea Pathogenicity Gene*) de *N. haematococca* MPVI (anamorphe *F. solani* f. sp. *pisi*) sont présents chez *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Coleman, Wasmann, et al., 2011). On note l'existence du gène *FoPDA1*, qui possède 82% d'identité avec le gène *PDA1* du cytochrome P450 pisatine-déméthylase (*pda*) de *N. haematococca* MPVI. Ce gène *FoPDA1* code également pour une fonction de détoxification par déméthylation de la pisatine produite par le pois en réponse à l'infection par l'agent pathogène (Coleman, Wasmann, et al., 2011). L'introduction de ce seul gène dans une souche *pda*- de *F. oxysporum* f. sp. *lini* confère l'activité *pda* aux souches transformées et rend certains transformants pathogènes pour le pois. Ce gène est également présent chez *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* qui est pathogène pour le pois. Il n'y a cependant pas de lien entre les différents motifs d'hybridation de ce gène chez *F. oxysporum* f. sp. *pisi* et les différentes races existantes au sein de cette forme spéciale (Coleman, Wasmann, et al., 2011). L'agressivité de la race 2 est également due à la production d'acides fusariques et 9,10 dehydrofusariques qui ont une activité phytotoxique sur le pois (Bani et al., 2014).

#### III.2.2.4. Les autres *Fusarium*

Même si *F. solani* et *F. oxysporum* semblent avoir l'occurrence la plus importante dans les nécroses racinaires du pois, plusieurs autres espèces de *Fusarium* ont également été décrites (Hwang & Chang, 1989). En Alberta, 80% des *Fusarium* isolés à partir de nécroses racinaires de pois fourrager ont été identifiés comme *F. avenaceum* (N. Feng et al., 2009). En Europe du Nord également, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* et *F. redolens* ont été assez fréquemment isolés dans les années 1990 (Persson et al., 1997 ; Oyarzun et al., 1993a). Les deux premiers peuvent parfois causer des symptômes sévères de pourritures racinaires. Le DSI (Disease Severity Index) moyen de souches de *F. avenaceum* et *F. culmorum* isolés en Suède est respectivement 63,3 et 25,6 (Persson et al., 1997). L'occurrence importante dans certaines zones de *F. avenaceum* peut s'expliquer par sa pathogénie pour le lupin (Holtz et al., 2011) et le colza, deux cultures fréquemment incluses dans les rotations, et par l'absence de *formae speciales* inféodée à la niche, et limitant les mouvements d'un pathogène entre différentes espèces (N. Feng et al., 2009). Dans la majorité des cas, *F. redolens* ne cause que de faibles symptômes sur des plants tests même si il peut déclencher une décoloration des lésions ou parfois des flétrissements indifférenciables de ceux causés par *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Persson et al., 1997; Taheri et al., 2011).

#### III.2.3. *Rhizoctonia solani*

##### III.2.3.1.1. Répartition et diversité

*Rhizoctonia solani* Kühn (téléomorphe *Thanatephorus cucumeris* Donk) est un champignon basidiomycète de l'ordre des *Cantharellales* qui est responsable de la fonte des semis et de nécroses racinaires chez de nombreuses espèces végétales. Chez le pois, il est un membre à part entière du complexe parasitaire et est présent dans la plupart des pays producteurs, notamment au Canada (Reyes, 1980; Tu, 1991) aux Etats-Unis (Blume & Harman, 1979; Mathew et al., 2012; Sharma-Poudyal et al., 2015), aux Pays-Bas (Oyarzun et al., 1993a), ou encore en Turquie (Soylu & Dervis, 2011).

Il s'agit d'une espèce multinuclée divisée en 14 groupes d'anastomose (AG-1 à AG-13 et AG-BI), basés sur la compatibilité végétative des isolats, dont 8 sont subdivisés en sous-groupes. L'analyse des séquences ITS est fréquemment utilisée afin de caractériser les AGs et les sous-groupes de *Rhizoctonia* spp. et pour les relier à la pathogénie (Mathew et al., 2012). Plusieurs AGs peuvent être la cause de nécroses racinaires ou de fontes des semis chez le pois mais les isolats des AG-4 et AG-2-1 semblent être les plus fréquemment retrouvés et les plus virulents pour ces pathologies (Hwang et al., 2007; Sharma-Poudyal et al., 2015).

### III.2.3.2. **Ecologie et symptômes**

Ce microorganisme habituellement saprophyte peut survivre durant de longues périodes dans le sol sous la forme de sclérotés et d'hyphes libres ou associés à de la matière organique (Kraft & Pflieger, 2001). Les déplacements de terre et de débris de plantes infestés via le vent, les pratiques culturales ou les animaux favorisent la dissémination du champignon. Afin que l'infection débute, les propagules doivent germer, et le champignon doit croître de plusieurs millimètres dans le sol jusqu'à atteindre la surface de l'hôte sur laquelle il forme des coussins d'infection. Une fois à l'intérieur de l'hôte, l'infection se développe de manière intra et extracellulaire.

En ce qui concerne la fonte des semis, *R. solani* affecte en premier lieu l'hypocotyle et l'épicotyle des jeunes plantules. Les symptômes apparaissent sous forme de lésions aqueuses rougeâtres à brunes. Le point de croissance du semis peut mourir dès qu'elle émerge du sol. La partie terminale de la jeune pousse peut être atteinte et une seconde pousse peut alors survenir à partir du nœud basal proche de la graine, mais la plante ne récupérera jamais assez pour produire un légume normal. Chez les plants les plus âgés de larges lésions brunes et creuses peuvent survenir au niveau de l'épicotyle.

Au champ, les zones d'infection constituées de plants rabougries peuvent survenir sous la forme de « patches » d'1 à 10m de diamètre, et peuvent recouvrir plus de 10% de la surface cultivée. Ces plantes chétives ont tendance à fleurir et à devenir mature plus tôt que les plantes saines (Sharma-Poudyal et al., 2015).

### III.2.4. ***Thielaviopsis basicola***

#### III.2.4.1. **Répartition et diversité**

*Thielaviopsis basicola* (Berk. And Broome) Ferraris (syn. *Chalara elegans* Nag Raj & Kendrick) est un champignon ascomycète phytopathogène qui possède un très large spectre d'hôtes parmi les *Solanaceae*, les *Fabaceae* ou les *Cucurbitaceae* au sein desquels sont inclus la luzerne, le haricot, la betterave, le maïs, le coton, la carotte, la tomate ou encore le tabac (Kraft & Pflieger, 2001). Il a une distribution cosmopolite et on le retrouve communément dans les sols cultivés à travers le monde (Geldenhuis et al., 2006).

Il est un membre à part entière du complexe parasitaire des pourritures racinaires du pois sur lequel il a été mis en évidence dans de nombreux pays, notamment en Amérique du Nord et en Europe Aux USA (Lloyd et al., 1963 ; Blume & Harman, 1979), au Canada (Tu, 1991), en Angleterre (Biddle et

al., 1988), aux Pays-Bas (Oyarzun et al., 1993a), au Danemark (Bodker et al., 1993) ou encore en Suède (Persson et al., 1997)).

### III.2.4.2. **Ecologie et symptômes**

Le champignon semble être favorisé par un fort taux d'humidité et une température du sol assez élevée (28°C), mais il peut également être la cause de pertes sévères sur les cultures de pois à des températures plus basses (< 20°C). Les chlamydospores peuvent survivre durant de longues périodes dans les sols et produisent de nombreux hyphes et tubes germinatifs au moment de la germination qui se développent vers les racines de l'hôte (Kraft & Pflieger, 2001). Les chlamydospores sont produites au niveau des tissus infectés puis sont libérées dans le sol au fur et à mesure que les tissus se désintègrent. Le pathogène peut ainsi être disséminé par les mouvements de sols infestés, de tissus infectés, d'eau ou par les pratiques culturales.

Il cause des pourritures noires très caractéristiques du système racinaire entier qui peuvent remonter jusqu'au bas de la tige. L'infection par *T. basicola* ne commence pas au niveau des cotylédons quand il est inoculé seul sous serre. Les symptômes peuvent être indistincts dans les champs car il peut profiter de lésions causées par d'autres pathogènes ou champignons secondaire du complexe s'attaquant aux cotylédons (Bodker et al., 1993). Les infections les plus sévères peuvent aboutir à des flétrissements des feuilles basses et à des retards de croissance de la plante.

### III.2.5. ***Phoma medicaginis* var. *pinodella* (syn. *Ascochyta pinodella*) et *Mycosphaerella pinodes***

*Phoma medicaginis* var. *pinodella* (L. K. Jones) Boerema (syn. *Ascochyta pinodella* L. K. Jones) et *Mycosphaerella pinodes* sont deux agents pathogènes, qui avec *Ascochyta pisi*, sont responsables de l'ascochytose du pois (anthracnose). Cette maladie est caractérisée par des noircissements de la base des tiges et l'apparition de points noirs sur les feuilles et les gousses. Ils ont également été répertoriés plusieurs fois comme des pathogènes du complexe parasite des pourritures racinaires du pois. *P. medicaginis* var. *pinodella* a pu être isolé occasionnellement à partir de racines infectées au Canada (Tu, 1991); en Australie (Kerr, 1963) et en Inde (Sagar & Sugha, 1997). Il a également été répertorié, avec *M. pinodes*, comme un acteur majeur des pourritures racinaires au Danemark et en Suède (Oyarzun et al., 1993a; Persson et al., 1997), notamment sous la forme de *Phoma sojicola*, un pathogène connu du soja, qu'une étude taxonomique a récemment regroupé avec *P. medicaginis* var. *pinodella* (Yu et al., 2012a; Irinyi et al., 2009). Ils peuvent donner une couleur noire à l'épicotyle et faire baisser légèrement la masse des plants infectés, mais leur impacte sur les rendements reste difficile à déterminer (Persson et al., 1997).

### III.2.6. **Les pathogènes occasionnels**

Différents microorganismes comme *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, ou *Cylindricarpon* spp. sont répertoriés seulement occasionnellement par les différentes études épidémiologiques concernant les pourritures racinaires du pois. Il existe peu d'études sur les interactions qu'ils entretiennent avec le pois et les autres pathogènes du complexe parasite. Il est ainsi difficile de savoir si leur présence relève de caractéristiques pathogéniques spécifiques ou de



l'opportunisme. Leur rôle dans l'émergence de la maladie et leur importance sur les rendements agricoles est ainsi discutable.

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agent de pourritures blanches chez le pois, a été décrit par certains auteurs comme un membre du complexe parasitaire du pois (Soylu & Dervis, 2011; Xue, 2003). C'est un champignon nécrotrophe possédant un très large spectre d'hôte et son occurrence dans les pourritures racinaires du pois reste assez faible sous serre (1-6% (Kim et al., 2006)), comme en plein champs (Soylu & Dervis, 2011). Il peut survivre dans les sols sous la forme de sclérotés, une structure composée d'un mycélium compact. Le sclérote germe pour produire une apothécie. Elle peut libérer des ascospores qui servent de première source d'inoculum lors l'infection de l'hôte (Jain et al., 2015). Les symptômes produits sont caractérisés par la présence d'un mycélium blanc et duveteux qui va croître à la surface des lésions au niveau de la tige, des feuilles ou des cosses. Ils sont assez différenciables des symptômes classiques du Pieds Noirs du pois mais la présence de *S. sclerotiorum* est répertoriée parmi le complexe de pathogène. Son rôle dans l'émergence des pourritures racinaires est assez peu documenté et il est possible que sa présence soit d'ordre opportuniste.

*Alternaria alternata* peut être également retrouvé dans les racines nécrosées de pois (Xue, 2003; Feng et al., 2010; Xu et al., 2012; Kirpicheva, 1990). Il est plus connu pour causer des symptômes de type taches sur les feuilles et les cosses. Son rôle dans l'émergence des pourritures racinaires n'est que très peu documenté.

*Cylindricarpon* spp. peut être retrouvé occasionnellement au niveau des pourritures racinaires du pois (Persson et al., 1997; Oyarzun et al., 1993a). La présence avérée dans la rhizosphère du pois de champignons de ce genre (Xu et al., 2012) et leur faible occurrence dans les tissus infectés laisse penser qu'ils s'y développeraient de manière opportuniste.

*Tetracladium maxilliforme*, un hyphomycète répertorié comme endophyte (Selosse et al., 2008) et pour dégrader la matière organique, ainsi que *Microdochium bolleyi*, un faible pathogène du blé, ont été retrouvés avec une abondance particulièrement élevée dans des pourritures racinaires de pois issus de deux parcelles au Danemark également infestés par *P. sojicola* et *A. euteiches* (Yu et al., 2012a). Ils pourraient jouer un rôle éventuel dans l'infection ou être impliqués dans la décomposition des tissus lésés (Yu et al., 2012a).

### III.3. LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX INFLUENCANT L'ÉMERGENCE DES POURRITURES RACINAIRES DU POIS

#### III.3.1. Les facteurs climatiques

##### III.3.1.1. Température et humidité

Le rôle du climat sur le développement de nombreux microorganismes phytopathogènes et sur l'émergence des maladies qu'ils occasionnent est déterminant. Dans le cas des pourritures racinaires du pois, le développement des pathogènes et des symptômes est lié à des conditions de température et d'humidité particulières.

Les pourritures racinaires dues à *Fusarium* sont favorisées lors des saisons chaudes et sèches (Hagedorn, 1984). La croissance *in vitro* de *Fusarium solani* f. sp. *lisi* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi*, serait stimulée à des températures entre 20°C et 30°C, ce qui correspondrait à la température du sol lors des pics épidémiques observés durant l'été (Alberghina et al., 1979). En dessous de 20°C et au-delà de 30-32°C, le taux de croissance *in vitro* de ces deux pathogènes décroît fortement, ce qui coïncide d'une part avec les périodes printanières durant lesquels la maladie se développe plus lentement et requiert plus de temps pour s'installer et d'autre part avec les périodes chaudes d'été, quand les températures du sol dépassent les 35°C, durant lesquels l'incidence de la maladie est réduite (Alberghina et al., 1979). Il a été observé *in vivo* que la sévérité des pourritures racinaires dues à *Fusarium* augmente progressivement entre 10°C et 30°C et très rapidement entre 25°C et 30°C. A 30°C, les plantes sont sévèrement rabougries et 80% des feuilles jaunissent (Tu, 1994).

L'influence de l'inondation des sols et de l'humidité du sol sur les pourritures racinaires dues à *Fusarium* a également été expérimentée (Tu, 1994). L'augmentation de la durée d'inondation des sols augmente la sévérité des symptômes et la masse fraîche de la plante diminue. La sévérité des pourritures racinaires est minimale à un taux d'humidité de 75% de la capacité aux champs. Un excès d'humidité fournit des conditions favorables au pathogène et aboutit à une augmentation des symptômes jusqu'à atteindre une incidence maximale à 100% de la capacité aux champs. Une déficience du sol en eau, en dessous de 25% de la capacité au champ, augmente significativement la sévérité des symptômes. Cette augmentation est dans ce cas principalement liée à un stress de la plante causé par le manque d'eau.

Chez *A. euteiches*, la maladie est connue pour être favorisée par des sols lourds, très humides, voir inondés, mal drainés, ou durant les périodes avec de fortes précipitations (Johnson et al. 2002). Le pathogène peut infecter à toutes les températures propices à la croissance du pois, avec des symptômes qui apparaissent plus rapidement de 22 à 28°C, et il est favorisé par un sol très humide (Kraft & Pflieger, 2001). La maladie ne se développerait pas en dessous de 45% de la capacité au champs et les pourritures sévères n'apparaîtraient pas tant que le sol n'est pas proche de la saturation (100% de la capacité au champs) (Burke et al., 1969).

Les maladies du pois dues à *Pythium* spp. sont favorisées par un sol frais et mal drainé. La température optimale d'infection serait de 15 à 22,5°C pour *P. ultimum* et légèrement plus élevée (17,5 à 27,5°C) pour *P. irregulare* (Hwang et al., 2000b). Chez le haricot, il a été montré que les

pourritures racinaires dues à *P. ultimum* sont maximales à une température du sol proche de 15°C avec une humidité importante proche de la capacité au champs (Potentiel hydrique de 0 à -1 Bar)(Piecarka & Abawi, 1978). Les conditions humides sont nécessaires à la survie, à la germination des spores, aux activités saprophytes et donneraient également un avantage écologique à *Pythium* spp. (Piecarka & Abawi, 1978). Un sol très humide et par conséquent pauvre en oxygène, affecte la physiologie de l'hôte chez lequel l'exsudation racinaire augmente, ce qui stimule la germination des spores et favorise l'incidence de la maladie et la sévérité des symptômes (Kerr, 1964; Piecarka & Abawi, 1978).

*Rhizoctonia solani* est plus agressif durant les périodes chaudes (24 à 30°C) (Kraft & Pflieger, 2001) et humides (20 à 60% de la capacité au champs) (Kumar et al., 1999 citent Papavizas et al., 1975). En Inde, une étude récente a mis en évidence que les pourritures dues à *Rhizoctonia* sur différentes légumineuses sont favorisées par une large gamme de températures et d'humidité relative du sol (respectivement 18°C à 41°C et 28% à 68%) et de l'atmosphère (8°C à 46,3°C et 20% à 87%) (Dubey, et al. 2012).

*Thielaviopsis basicola* est également favorisé par un sol très humide et chaud (28°C), mais des pertes sévères ont été rapportées à des températures plus froides (en dessous de 20°C) (Kraft & Pflieger, 2001).

Ainsi, on se rend compte que les différents agents responsables de pourritures racinaires ont des exigences écologiques différentes en termes de température et d'humidité. La gamme de ces exigences recouvre une diversité de conditions qui toutes vont aboutir à l'expression de l'activité infectieuse de l'un ou l'autre de ces agents, ce qui explique sans doute la fréquence d'apparition de la maladie.

### III.3.1.2. La date des semis

Les variations saisonnières des températures et de l'humidité du sol influencent le développement des pathogènes du complexe parasitaire et des pourritures racinaires. Les conditions climatiques au moment du semis peuvent être très variables d'une année sur l'autre ou d'un site à un autre. Elles ont un effet important sur le microenvironnement du germe (Hwang, 1994). C'est pourquoi la date des semis est un paramètre modulable permettant d'éviter, dans une certaine mesure, les conditions météorologiques favorables au développement de la maladie et qui peut influencer l'expression de la vigueur des semences (Castillo et al. , 1994). Plusieurs pathogènes du complexe parasitaire du pois sont capables d'infecter la plante à des stades précoces de son développement, aboutissant à la fonte des semis ou affectant la croissance de la plante (cf. III.2). L'implication de la date des semis sur l'émergence des pourritures racinaires a été testée au Canada pour plusieurs pathogènes (*Pythium* spp., *R. solani* et *F. avenaceum*) chez différentes légumineuses (Hwang, 1994 ; Chang et al., 2004 ; Chang et al., 2008; Hwang et al., 2000a). Les conditions climatiques très variables ont mené à des effets contrastés, avec une importante variance d'un site d'étude à l'autre, entre date des semis et pourritures racinaires.

Les facteurs climatiques bien trop variables d'une zone de production à une autre et d'une année sur l'autre peuvent ainsi annuler les effets bénéfiques que peut avoir la date des semis sur la maîtrise de la maladie. Des études plus transversales, effectuées dans plusieurs localités

géographiques avec des conditions climatiques différentes, permettraient de se faire une idée plus précise de l'impact de la date des semis sur l'apparition des pourritures racinaires du pois.

### III.3.2. La santé des sols

Les sols sont des environnements particulièrement complexes dont les composantes biotiques et abiotiques entretiennent de nombreuses interactions. Elles ont une implication dans de nombreuses fonctions écosystémiques majeures dont certains cycles biogéochimiques, la qualité des eaux, de l'air ou encore la croissance et la production végétale (Kibblewhite et al., 2008).

Afin d'assurer ces différentes fonctions, préserver « la santé des sols » est essentiel. La santé des sols se définit comme « la capacité continue du sol à fonctionner comme un système vivant, au sein d'un écosystème et dans le cadre de l'utilisation des terres, pour maintenir la productivité biologique, favoriser la qualité de l'air et de l'environnement aquatique, et assurer la santé des végétaux, des animaux et des hommes » (Doran et al., 1996). Cette définition prend en compte l'influence du fonctionnement des sols sur la santé des végétaux, et inclut l'apport des différents facteurs nécessaires au développement des plantes ainsi que la capacité à réguler les populations et l'activité pathogène des agents parasitaires telluriques.

Dans le contexte d'une culture intensive comme peut l'être celle du pois potager, les sols peuvent être victimes d'un appauvrissement en éléments nutritifs, de tassements et d'une réduction de l'aération, accompagnée de déstabilisation des populations microbiennes. Cette « fatigue des sols » ne leur permet plus d'assurer les fonctions caractéristiques d'un sol en bonne santé (Doran et al., 1996). Le déséquilibre écologique qui en résulte n'assure plus l'autorégulation des communautés, microbiennes notamment, laissant aux microorganismes pathogènes la possibilité de coloniser de nouvelles niches et de prospérer. Afin de maîtriser les maladies que ces agents pathogènes occasionnent, il est nécessaire de déterminer les paramètres biotiques et abiotiques du sol qui sont associés positivement ou négativement à leur développement et à leur activité pathogène.

#### III.3.2.1. La réceptivité des sols

##### III.3.2.1.1. Concepts et définitions

Les différents facteurs biotiques et abiotiques des sols et les interactions qu'ils entretiennent peuvent avoir un effet important sur l'émergence des maladies dues aux pathogènes telluriques. Etroitement liés à la santé du sol définie en introduction de ce chapitre (*cf. Erreur ! Source du renvoi introuvable.*), les concepts de « potentiel infectieux d'un sol », de « réceptivité du sol à une maladie » et de « sols résistants (suppressive soils) » et « sensibles (conducive soils) » permettent de mieux appréhender ces effets sur l'émergence des maladies d'origine tellurique.

La capacité d'un sol infesté à provoquer une maladie est représentée par son potentiel infectieux. Il est défini comme la quantité d'énergie pathogène stockée et disponible dans un sol infesté par un microorganisme pathogène (Bouhot & Joannes, 1983). L'énergie pathogène se

manifeste par ses effets sur la plante. Elle est constituée par l'inoculum du parasite qui se caractérise par sa densité et sa capacité infectieuse. Une unité de potentiel infectieux (UPI) peut ainsi être définie comme la quantité d'énergie pathogène stockée et disponible dans le sol nécessaire et suffisante pour induire une infection sur un hôte sensible (Bouhot & Joannes, 1983). Un volume de sol donné contient d'autant plus d'UPI que son potentiel infectieux est élevé. On peut ainsi définir l'UPI 50 comme le volume de sol nécessaire et suffisant pour induire 50% de mortalité sur la population de plante hôte (Davet, 1996).

La réceptivité d'un sol se traduit comme sa capacité à contrôler plus ou moins l'activité des populations microbiennes qu'il contient. Dans le cas d'un organisme pathogène, la réceptivité du sol est sa capacité à contrôler l'activité pathogène de cet agent infectieux. Dans un sol très réceptif, qualifié de sensible, une faible densité d'inoculum suffit pour provoquer des dégâts importants aux cultures alors que dans un sol peu réceptif, ou résistant, la maladie ne se manifeste pas, même en présence d'une forte concentration d'inoculum (Alabouvette et al., 1982; Janvier et al., 2007).

Les sols résistants ont été décrits comme des sols dans lesquels la sévérité et l'incidence d'une maladie restent faibles, en dépit de la présence du pathogène, d'une plante hôte susceptible, et de conditions climatiques favorables au développement de la maladie. Plusieurs mécanismes peuvent mener à des sols résistants : l'agent pathogène ne s'établit pas ou ne persiste pas, s'établit mais provoque pas ou peu de dégâts, ou s'établit et provoque une maladie qui par la suite devient moins importante, même si l'agent pathogène persiste dans le sol (Baker & Cook, 1974).

### III.3.2.1.2. Réceptivité des sols aux agents des pourritures racinaires du pois

Plusieurs études ont été effectuées sur la réceptivité de sols aux pourritures racinaires du pois, notamment pour des pathogènes comme *A. euteiches* (Persson et al., 1999; Heyman et al., 2007; Heyman, 2008; Oyarzun et al. 1998; Oyarzun et al., 1997) , *F. solani* f. sp. *pisi* (Oyarzun et al. 1994; Castejon-Munoz & Oyarzun, 1995; Oyarzun et al., 1998; Oyarzun et al., 1997) ou encore *T. basicola* (Oyarzun et al., 1998; Oyarzun et al., 1997).

Ces études révèlent qu'un même sol peut réagir aux différents microorganismes du complexe parasitaire de manières totalement différentes, pouvant être sensible à l'activité d'un pathogène et résistant à celle d'un autre. Une étude comparative de la réceptivité de 57 sols différents à *T. basicola*, *A. euteiches* et *F. solani* f. sp. *pisi*, a mis en évidence un niveau de réceptivité généralement plus élevé pour *A. euteiches* que pour les deux autres pathogènes (Oyarzun et al., 1997; Oyarzun et al., 1994). La majorité des sols se sont montrés résistants à l'activité de *T. basicola* et modérément résistants à celle de *F. solani* f. sp. *pisi*. Aucune corrélation entre la densité de l'inoculum de *T. basicola* et *F. solani* f. sp. *pisi* et le potentiel infectieux du sol n'a été mise en évidence, alors que pour *A. euteiches*, ces paramètres semblent reliés.

La majorité de sols réceptifs à *A. euteiches* testés dans cette étude permet de concevoir l'intérêt d'un test de potentiel infectieux pour la maîtrise prophylactique de ce pathogène. Des sols résistants à l'activité pathogène d'*A. euteiches* ont cependant été répertoriés en Suède (Persson et al., 1999).

La réceptivité des sols est la résultante de nombreux facteurs biotiques et abiotiques qui interviennent dans le mécanisme d'une façon différenciée pour chaque pathogène. Certains paramètres associés à des sols plus ou moins réceptifs aux pourritures racinaires du pois ont été déterminés, et sont répertoriés dans la partie dédiée (cf. III.3.2.2 et III.3.2.3) (Oyarzun et al., 1998). Les résultats ont montré que la réceptivité des sols à l'activité de ces trois agents du complexe parasitaire du pois est principalement contrôlée par le microbiote du sol, les propriétés physiques et chimiques agissant principalement à travers leurs effets sur l'activité de ce microbiote. La réceptivité des sols aux pourritures racinaires du pois étant pathogène-spécifique, il a été difficile d'établir des facteurs influençant l'activité de ces trois pathogènes de manière commune.

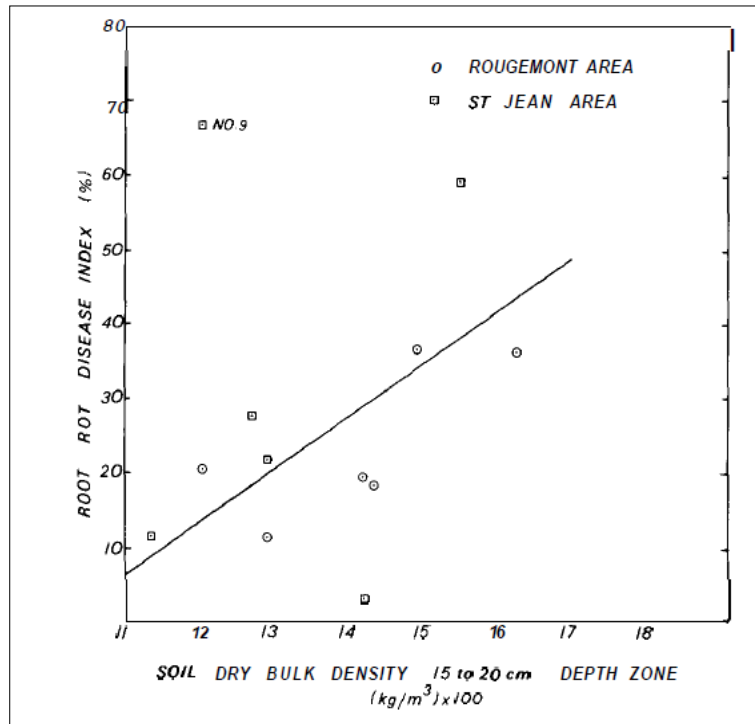
### **III.3.2.2. Composantes abiotiques : structure et composition des sols.**

Si de nombreux scientifiques et acteurs du secteur ont observé l'importance de la structuration et la composition des sols sur l'émergence des pourritures racinaires du pois, peu d'études ont été réalisées spécifiquement sur leur réelle implication.

On peut noter cependant la mise en évidence d'un lien entre la compaction des sols par les pratiques culturales et l'émergence de la maladie. Ce processus abouti à un réarrangement des particules de sol, causant une réduction de l'espace disponible et une augmentation de la densité apparente du sol (ou masse volumique apparente) (Scott, 1987). La porosité plus faible réduit l'aération et l'apport en eau nécessaire pour la croissance des plantes. Elle prédispose les plantes aux nécroses racinaires et réduit la nodulation, la fixation d'azote et la photosynthèse. Une augmentation de l'incidence et de la sévérité des symptômes de pourritures racinaires du pois de conserve causées par *F. solani* f. sp. *pisi* et *F. oxysporum* f. sp. *pisi* serait directement proportionnelle au degrés de compaction (Vigier & Raghavan, 1980; Tu, 1994; Figure 16).

La densité de l'inoculum en pathogène n'est pas forcément élevée dans les couches condensées du sol, par contre, les contraintes physiques fragilisent les systèmes racinaires et freinent leur développement comparativement à celui observé en sol travaillé. L'abondance en propagules de *F. solani* f. sp. *pisi* par exemple est jusqu'à 100 fois plus importante dans la couche labourée que dans les couches compactes situées en dessous et dans lesquelles les racines, du haricot notamment, ne peuvent s'étendre. C'est donc la combinaison des 2 composantes qui est nécessaire et suffisante à l'activité du pathogène. (Burke, 1968 ; Burke et al., 1969 ; Burke et al., 1970; Burke, Holmes, & Barker, 1972).

L'activité pathogène de *T. basicola* et *F. solani* f. sp. *pisi* sont plus sensible aux variations des conditions physico-chimiques que l'est *A. euteiches* (Oyarzun et al., 1998). Ainsi, les pourritures causées par *T. basicola* sont sévères en sols lourds, riches en limons, mais l'augmentation de certains paramètres abiotiques comme le carbone, le magnésium et le phosphore aboutissent à un contrôle de l'activité de ce pathogène.



**Figure 17 :** Relation entre Disease Index des pourritures racinaires et densité apparente de sol, zone de Rougemont et de Saint Jean (Source : Vigier & Raghavan, 1980) .

Une capacité au champ plus importante et une sensibilité à la sécheresse plus élevée, caractéristiques des sols lourds, sont corrélées avec une sensibilité plus importante à *F. solani* f. sp. *pisi*, de même que l'augmentation des concentrations individuelles en K, P, Mg, C totale et N totale. Par contre, aucune corrélation directe n'a été retrouvée entre les différentes variables physiques et chimiques testées et la réceptivité du sol et *A. euteiches* (Oyarzun et al.). Heyman et al., (2007), ont pourtant mis en évidence plusieurs variables corrélées négativement (K, pH) ou positivement (Ca) avec la résistance des sols à *A. euteiches*. Le Ca libre paraît être un des paramètres les plus importants pour contrôler le degré de résistance des sols à *A. euteiches*.

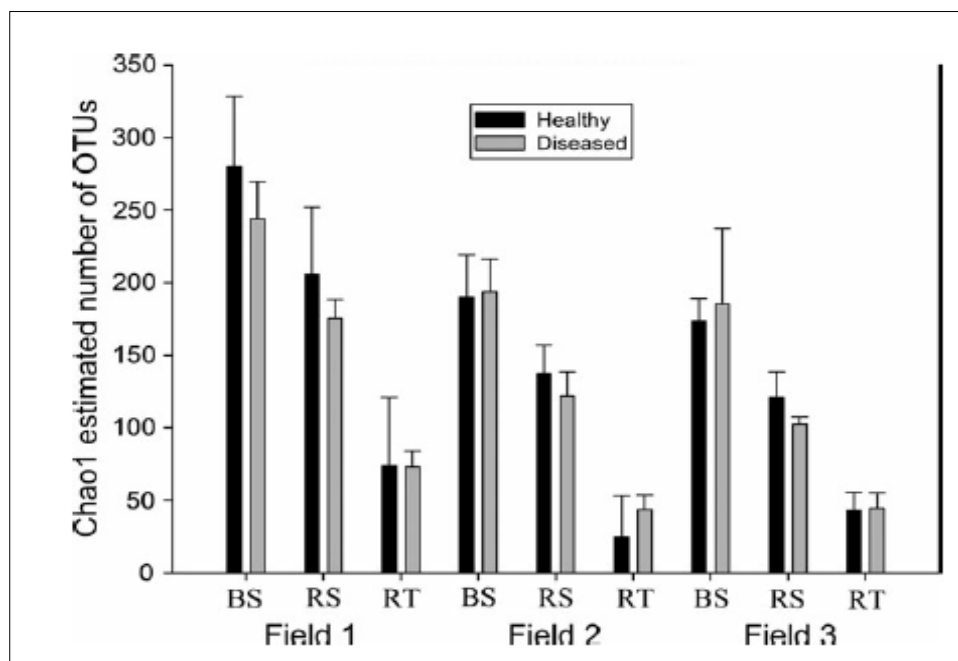
Le pH du sol n'est, dans une certaine mesure, par forcément associé avec l'apparition des pourritures racinaires. Si les pourritures noires dues à *T. basicola* sont favorisées par un sol alcalin ou par des facteurs associées à l'alcalinité du sol (Ca, NO<sub>3</sub>) (Oyarzun et al., 1998), l'abondance des populations pathogènes de *A. euteiches* et *F. solani* f. sp. *pisi* n'est pas corrélée avec les pH mesurés ni avec l'historique infectieux des parcelles de pois étudiées (Burke et al., 1970). Le développement des pourritures racinaires dues à *R. solani* sur d'autres légumineuses s'établit également dans une gamme de pH du sol assez large (entre 5,6 à 8,7) (Dubey et al., 2012).

Les différences de comportement de ce groupe de pathogènes responsables de pourritures racinaires face à des situations abiotiques différentes expliquent la dispersion de la maladie dans les nombreux environnements sols où ils peuvent être présents conjointement. Elles expliquent la difficulté à caractériser les conditions d'expression de leurs activités et les difficultés à contrôler les activités de tous ces pathogènes de façon simultanée.

### III.3.2.3. Composante biotique des sols, abondance et diversité des populations microbiennes.

Les sols hébergent une importante biodiversité qui joue un rôle clef dans des processus écologiques nécessaires à leur structuration, à la décomposition de la matière organique, à leur fertilité, aux cycles du carbone, de l'azote, du phosphore et du soufre ou encore à leur détoxification. L'hétérogénéité de la microflore qu'ils hébergent, composées de communautés génotypiquement et phénotypiquement très diversifiées nécessaires à ces processus, est favorisée par la composition, la structure et les différentes interactions entre les facteurs biotiques et abiotiques qui offrent une importante diversité de microenvironnements à coloniser (Garbeva, Veen, & Elsas, 2004). Cette biodiversité microbiologique a une implication directe dans la régulation des populations biologiques, y compris celles des agents phytopathogènes telluriques (Kibblewhite et al., 2008). Trois types d'interactions sont mis en jeu dans ces processus de régulation biologique des populations pathogènes: la compétition, l'antagonisme et l'hyperparasitisme (Raaijmakers, Paulitz, Steinberg, Alabouvette, & Moëgne-Loccoz, 2009). Ces mêmes propriétés sont utilisées chez certains microorganismes comme mécanismes de biocontrôle et sont définies dans la partie dédiée (cf. III.4.4).

L'impact de la culture intensive et continue du pois sur la structure, la composition et la fonction des communautés microbiennes et leur rôle sur la susceptibilité des cultures aux pourritures racinaires est connu (Nayyar et al., 2009). Cependant, il existe peu d'informations sur la composition des communautés telluriques en culture de pois et les interactions qu'elles entretiennent avec les pathogènes du complexe parasitaire. Seules quelques études ont abordées les changements intervenant au sein des communautés microbiennes dans les champs de pois affectés par des pourritures racinaires. Elles se sont notamment intéressées à leur diversité et leur abondance dans le sol, la rhizosphère, le rhizoplan et les racines (microorganismes endophytes dont les symbiontes) dans les champs de pois sains et infestés.



**Figure 18 :** Comparaison de la diversité fongique dans le sol (BS), la rhizosphère (RS) et les racines (RT) d'un champs sain et d'un champs atteint de pourritures racinaires (Xu et al. a, 2012).



La structure des communautés microbiennes du sol peut varier fortement d'un champ à un autre mais le même schéma est fréquemment rencontré. Que ce soit dans un champ sain ou un champ atteint de pourritures racinaires, la diversité est ainsi toujours plus riche dans les sols que dans la rhizosphère et les racines (Xu et al., 2012a) (Figure 17). L'abondance dans le sol des champs de pois est généralement dominée par un faible nombre d'espèces qui sont présentes en grande quantité. Dans certaines études de diversité, les dix espèces les plus abondantes peuvent ainsi représenter plus de 65% de l'abondance totale (Xu et al. a, 2012). Les sols peuvent notamment être infestés par le (s) pathogène(s) responsable(s) de l'infection. Les autres pathogènes du complexe parasitaire peuvent également être présents en plus faible quantité. A titre d'exemple, lors d'une étude effectuée par séquençage haut débit sur la diversité et l'abondance des communautés fongiques dans les sols provenant de champs plus ou moins affectés par les pourritures racinaires, *P. medicaginis var pinodella*, l'agent probablement responsable de la maladie, a représenté près de 25% de l'abondance totale et les autres pathogènes du complexe ont été retrouvés avec une abondance relative beaucoup plus faible (*A. euteiches* (0,02%) ; *Fusarium* sp. (1,16%) ; *Pythium* spp. (1,26%) ; *Thielaviopsis* sp. (0,01%)) (Xu et al., 2012b). De nombreuses autres espèces peuvent être présentes à un niveau faible voir cryptique. Certaines d'entre elles sont seulement présentes dans le sol environnant et absentes de la rhizosphère et des racines (*Aleuria*, *Athelia*, *Clonostachys*, *Cyphellophora*, *Mrakia*, *Peziza*, *Plectosphaerella*, *Pseudaleuria*, *Scedosporium*, *Sistotrema*, *Thielaviopsis*, *Waitea*) (Xu et al., 2012a). Le statu sain ou infesté du sol peut être également corrélé significativement avec l'abondance de certaines espèces. Celles-ci peuvent être considérées comme des espèces indicatrices de la maladie. Les genres *Podospora* (0.13%), *Pseudaleuria* (0.13%) et *Veronaea* (0.06%) ont ainsi été retrouvés avec une abondance relative faible mais corrélée négativement avec l'indice de sévérité de la maladie du à *P. medicaginis var pinodella* (Xu et al., 2012b). De même, le genre *Pyrenochaeta* a été mis en évidence dans une étude comparant les communautés fongiques entre le sol, la rhizosphère et les racines du pois sains et infestés par *F.oxysporum* et *A. euteiches* (Xu et al., 2012a). Ces résultats suggèrent que ces populations microbiennes interagissent directement avec le développement de la maladie et qu'elles pourraient éventuellement, si d'autres études viennent confirmer ces interactions, être utilisées comme indicateurs de la santé des sols en culture de pois.

Dans la rhizosphère la structure des communautés microbiennes est également assez spécifique. La microflore, bien que moins diversifiée que dans le sol environnant, est enrichie par le carbone des rhizodépôts. Ceux-ci sont libérés par les plantes au niveau des racines et favorisent le développement des communautés microbiennes composant l'écosystème racinaire ou rhizobiome. Une part importante de ces microorganismes a un effet neutre sur la plante, quand d'autres, pathogènes (champignons, nématodes, oomycètes et bactéries), ou bénéfiques (bactéries Rhizobia, endo- et ectomycorhizes, bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)) auront un effet sur sa santé et sa croissance (Raaijmakers et al., 2009). Dans les champs de pois, l'abondance des dix espèces de champignons les plus représentées peut atteindre plus de 74% de l'abondance totale (Xu et al., 2012). Comme pour le sol, la présence de certains champignons semblent être spécifique à la rhizosphère (*Cylindrocarpon*, *Minimedusa*, *Phialophora*, *Rhinoctadiella*, *Sporidiobolus*) (Xu et al., 2012). La présence de certaines populations y est corrélée avec la résistance du sol à certains agents des pourritures racinaires. C'est notamment le cas des genres *Mortiella* et *Penicillium* pour les pourritures causées par *T. basicola*, pour *Actinomyces* spp. et *Acremonium* pour les pourritures causées par *F. solani* f. sp. *pisi* et enfin pour le genre *Acremonium* pour les pourritures causées par *A. euteiches* (Oyarzun et al., 1998). A contrario, l'abondance d'*Ascochyta* spp. est un paramètre augmentant significativement dans les

sols sensibles à *F. solani* f. sp. *pisi* (Oyarzun et al., 1998). *Glomus mossae*, un champignon mycorhizien, a été la seule « espèce indicatrice » de la rhizosphère dont l'abondance a varié suivant le statu sain ou malade du pois (Xu et al., 2012).

Les communautés microbiennes du rhizoplan et des racines sont celles présentant les plus fortes interactions avec les pathogènes du complexe parasitaire du pois. Une étude sur l'abondance et la diversité fongiques de racines de pois à différents stades de son développement (stade végétatif, floraison et sénescence) a permis de répertorier une diversité de 121 OTUs (Operational Taxonomic Units) représentant 121 espèces différentes (Yu et al., 2012). Les 20 espèces les plus représentées correspondent à 95% de l'abondance totale en champignons présents dans les racines. Les espèces potentiellement pathogènes, notamment *F. solani* et *Phoma* sp., et les champignons mycorhiziens à arbuscules comme *G. mossae* ont tendance à dominer durant la période végétative quand les champignons saprotrophes, notamment *Helotiales* sp., qui jouent un rôle clef dans la décomposition de la matière organique, dominant durant la période de sénescence (Yu et al., 2012). Certains genres sont uniquement présents dans les racines et absent de la rhizosphère et du sol (*Acaulospora*, *Ambispora*, *Davidiella*, *Epicoccum*, *Glomus*, *Leohumicola*) (Xu et al. a, 2012).

Plusieurs espèces présentes dans la racine ont une abondance qui varie significativement suivant le statu sain ou malade du pois et peuvent être considérées comme espèces indicatrices de la maladie. C'est notamment le cas de *Mortiella elongata* et de nombreux champignons arbusculaires mycorhiziens comme *Glomus* sp. (Xu et al. a, 2012). De nombreuses autres espèces présentes sur le rhizoplan ou endophytes peuvent être en interactions ou en compétition avec les pathogènes du complexe parasitaire. Dans l'étude de Xu et al. (2012), *Exophiala salmonis* et *Epicoccum nigrum* ont ainsi été retrouvées avec une abondance beaucoup plus importante dans les racines saines issues des champs dont l'agent causal suspecté était *F. oxysporum*, ce qui suggère un effet antagoniste entre ces deux espèces et ce pathogène. Il est notable que les Glomeromycètes aient été retrouvés seulement dans les racines saines issues des 3 champs échantillonnés. De même, l'abondance des populations de *Pseudomonas* fluorescents, et de *F. solani* saprophytes présentes à la surface de la racine sont un des facteurs important de la résistance de sols à *T. basicola* et *F. solani* f. sp. *pisi* (Oyarzun et al., 1998). La compétition pour la colonisation de la racine entre *Fusarium* saprophytes et *F. solani* f. sp. *pisi* serait à l'origine de cet antagonisme.

Ces différents résultats, même s'ils sont issus de contextes culturels et infectieux spécifiques, donnent une idée de la structuration des communautés fongiques et oomycètes présentes dans les cultures de pois. Ils confirment notamment l'impact d'un contexte infectieux et des facteurs environnementaux, spatiaux et temporels sur les variations qui interviennent dans la diversité et l'abondance de ces communautés. Ils laissent suspecter le rôle important de différents genres et espèces fongiques dans la réceptivité des sols aux pathogènes responsables des pourritures racinaires du pois. L'emploi comme agent de biocontrôle de certaines de ces communautés mises en évidence par ces études de diversité a parfois déjà été testé (cf. 0).

### III.4. LES STRATEGIES DE CONTROLE

#### III.4.1. Les sources de résistances variétales

##### III.4.1.1. Résistance à *Aphanomyces euteiches*

Chez le pois, la résistance à *A. euteiches* est de nature polygénique, partielle et souvent corrélée avec des traits agronomiques indésirables comme de longs inter-nœuds, la production d'anthocyanine et des floraison tardives (Pilet-Nayel et al., (2002) ; Hamon et al., (2013)). Bien qu'assez rares, des ressources génétiques et des lignées agronomiques avec un niveau de résistance partiel ont été identifiées depuis plusieurs années. Quatre principales sources de résistances (90-2079 ; 90-2131, PI180693 et 552) avec un degré de résistance plus élevé et plus stable ont fait l'objet d'analyses génétiques en vue de leur introduction dans des programmes de sélection (Gritton, (1990) ; Lockwood et al., (1960) ; Kraft , (1992) ; Pilet-Nayel et al., (2002) ; Pilet-Nayel et al., (2005); Hamon et al., (2013) ; Lavaud et al., (2015)). A partir de ces lignées, 7 QTL ont été identifiés parmi 27 méta-QTL associés à une résistance à *A. euteiches* et ont été validés dans des lignées quasi isogéniques obtenues à partir de cultivars d'intérêt agronomique de pois d'hiver et de printemps (NILs ; Near Isogenic Lines) (Hamon et al., (2013) ; Lavaud et al., (2015)). Parmi eux, le QTL *Ae-Ps7.6*, localisé sur le groupe de liaison VII (LG VII) présente un effet majeur qui explique plus de 60% de la variation phénotypique. Des associations entre certaines sources de résistance et des allèles codant pour plusieurs critères morphologiques indésirables ont également été retrouvées. Des travaux supplémentaires sont nécessaires afin d'identifier la meilleure combinaison de QTLs et d'augmenter durablement la résistance partielle à *A. euteiches*.

L'analyse transcriptomique de la réponse à une infection précoce par *A. euteiches* et *P. pisi* chez la plante modèle *Medicago truncatula* a permis de mettre en évidence certaines voies impliquées dans la résistance et activées par la plante. L'expression différentielle de gènes impliqués dans le renforcement de la paroi cellulaire, dans l'induction de signaux hormonaux, dans la régulation de la biosynthèse de l'acide jasmonique, dans l'induction de la voie de l'éthylène et dans le métabolisme du phénylpropanoïde est une réponse commune à l'infection de la plante par ces deux oomycètes. L'induction chez la plante de la synthèse de chalcones et de la voie de l'auxine représente des changements transcriptionnels spécifiques à la réponse à l'infection par *A. euteiches* (Hosseini et al., 2015).

De manière générale, bien que certaines sources de résistances partielles à *A. euteiches* soient caractérisées, leur introduction dans des cultivars commercialisés n'est pas d'actualité. Les mécanismes impliqués dans la résistance du pois à *A. euteiches* et à *P. Pisi* restent trop mal définis.

### III.4.1.3. Résistances à *Fusarium solani* f. sp. *pisi*

Chez le pois, certains gènes candidats pour la résistance à *F. solani* f. sp. *pisi*, notamment des défensines, ont été identifiés (Culley et al., 1995; Lai et al., 2002). Aucun cultivar commercial n'a de résistance totale contre les pourritures racinaires dues à *F. solani* f. sp. *pisi* mais de nombreuses sources de résistances ont été identifiées (Lockwood et al., 1960; Ondrej, 1992; Infantino et al., 2006; Kraft, 1994; Hagedorn, 1960), dont certaines avec un haut niveau de résistance partielle (Grunwald et al., 2003; Hance et al., 2004; Porter, 2010). Certaines lignées avec un degré de résistance élevé et des traits agronomiques acceptables sont désormais disponibles (Porter, 2014; Coyne et al., 2008).

Plusieurs QTLs contrôlant un haut niveau de résistance partielle à *F. solani* f. sp. *pisi* sont présents sur les groupes de liaisons (LG) II, III, IV, VI et VII (Hance et al., 2004; Weeden & Porter, 2007; Coyne et al., 2015). Un QTL du LG II a l'effet le plus important sur la résistance. Il chevauche le locus du gène *A* qui est impliqué dans la voie des anthocyanines/polyphénols/flavonoïdes et qui serait à l'origine de la résistance (Weeden & Porter, 2007). Un QTL du LG IV a des effets seulement si le QTL du LG II est présent, ce qui indique qu'il pourrait jouer un rôle en aval dans la voie de biosynthèse.

Il est intéressant qu'un autre QTL, situé sur le chromosome VII, semble expliquer la résistance à plusieurs pathogènes du complexe parasitaire. L'analyse de la gravité de la maladie due à *F. solani* f. sp. *pisi* au sein d'une population de recombinants d'une lignée autofécondée (RIL) issue du croisement entre deux cultivars commerciaux (un sensible et un résistant), a montré que ce QTL, flanqué de deux marqueurs SSR (AA416 et AB60), expliquerait 39% de l'expression de la variation de ce caractère phénotype (Feng et al., 2011). Cette même région du chromosome VII abriterait également 21,7% de la variance de la résistance à *F. avenaceum* (Li et al., 2013) et un QTL qui contribue à la résistance à *A. euteiches* (Hamon et al., 2011).

### III.4.1.4. Résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*

Des résistances monogéniques dominantes contre les races 1, 2, 5 et 6 de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* sont connues. Des gènes différents confèrent la résistance à ces 4 races de façon indépendante. La résistance à la race 1 est conférée par le gène *Fw* situé sur le LG III (Grajal-Martin & Muehlbauer, 2002). Des marqueurs permettant une sélection assistée de *Fw*, notamment THO, un marqueur codominant de type CAPS (Cleave Amplified Polymorphic Sequence), sont disponibles (McClendon et al., 2002; Jain et al., 2015). Le locus du gène de résistance à la race 2, *Fnw*, serait situé sur le LG IV avec deux loci mineurs sur le LG III (McPhee et al., 2012). *Fwf*, qui confère la résistance à la race 5, est situé sur le LG II, sur le chromosome VI (Coyne et al., 2000). Le locus du gène de résistance à la race 6 n'est pas encore connu.

Plusieurs cultivars commerciaux de pois potager possédant les résistances aux races 1 et 2 ont été développés et sont disponibles sur le marché. Il en existe moins pour la race 5, principalement car elle ne pose des problèmes que dans l'Etat de Washington aux Etats-Unis. De nouvelles sources de résistance à la race 2 ont été identifiées (Bani et al., 2012) et de nouvelles lignées avec des traits agronomiques acceptables, également résistantes à *F. solani* f. sp. *pisi* sont également disponibles (Porter et al., 2014).

Cependant les résistances monogéniques peuvent être aisément surmontées par l'émergence de nouveaux variants chez le pathogène. Les sources de résistance à *F. oxysporum* f. sp. *pisi* restent pour le moment limitées et la recherche de nouvelles sources de résistances, notamment polygéniques, est ainsi déterminante afin de compléter et de renforcer les cultivars élités.

#### III.4.1.5. Résistance à d'autres pathogènes du complexe parasitaire

Les résistances variétales aux autres pathogènes du complexe parasitaire ont été peu étudiée, hormis dans le cas *Mycosphaerella pinodes* en ce qui concerne la résistance à l'antracnose.

On note tout de même que des résistances à *Pythium* ssp. sont disponibles et ont été incorporées dans des lignées de sélection (Kraft et al., 1994). Bien qu'il existe des exceptions, la résistance serait liée à la présence de l'allèle dominant *A* du gène associé à la pigmentation des téguments par l'anthocyanine, des graines rondes et des graines avec des cotylédons jaunes (Kraft & Pflieger, 2001). La résistance serait due à la présence de delphinidine, une anthocyanine du tégument qui est un fongistatique pour de nombreux pathogènes des semences et des racines (Kraft et al., 1994). Une autre forme de résistance serait liée à la libération d'éléments nutritifs et au type de graines utilisé. Les cultivars à graines ridées libèrent plus d'éléments nutritifs à la germination que ceux à graines lisses. Comme ces éléments attirent les spores mobiles des *Pythium*, ces lignées sont souvent plus sujettes à l'infection des semis. De même, les graines endommagées par une manipulation brutale libèrent plus d'éléments nutritifs au moment de la germination et, par conséquent, sont plus sensibles à la fonte des semis (Goodwin, 2008).

Quelques cultivars et des lignées de sélections partiellement résistants à l'AG 4 de *R. solani* ont été obtenus (Shehata et al., 1981). La résistance serait reliée à l'épaisseur de l'épicotyle de la plantule de pois, plus il est épais, moins les pourritures apparaissent (Kraft & Pflieger, 2001).

#### III.4.2. La lutte chimique

Plusieurs traitements chimiques appliqués sur les semences permettent de limiter l'impact de certains pathogènes responsables de la fonte des semis chez le pois. Ainsi, les traitements de la graine de pois à base de métalaxyle ont montré une efficacité pour améliorer la levée des plantules. Il serait notamment efficace contre *F. avenaceum* (Chang et al., 2011), les *Pythium* (Hwang et al., 2001) ou encore à *R. solani* (Silva et al., 2013; Hwang et al., 2007). Si plusieurs traitements fongicides peuvent interférer négativement sur la nodulation des *Rhizobia* et la fixation d'azote, l'Apron Maxx®, à base de métalaxyle, n'aurait pas d'effet sur leur implantation (Kyei-Boahe et al., 2001; Chang et al., 2011). D'autres traitements de la graine à base de carbendazime, pencycurone, iprodione, thirame sont efficaces contre la fonte des semis due à *R. solani* (Silva et al., 2013; Hwang et al., 2007). Cependant, si le traitement des semences permet de protéger l'émergence de la plantule des pourritures, ils n'agissent pas à des stades plus avancés du développement du pois (Gaurilcikiene et al., 2008).

Ainsi, il n'existe pas de traitements chimiques disponibles dans le commerce qui sont efficaces pour le contrôle des principaux pathogènes du complexe parasitaire responsables des nécroses racinaires comme *A. euteiches*. La composition de la paroi des Oomycètes et certaines voies

biochimiques qui leurs sont propres les rendent insensibles à de nombreux fongicides (Wakelin et al., 2002). *Aphanomyces euteiches* est également résistant à des traitements ciblant les Oomycètes, notamment le métalaxyle ou les éthyle-phosphonates (fosetyle-A1, cymoxamyle) (Wakelin et al., 2002). Dans les années 1980, l'utilisation de Tachigaren à 2kg/T de graines (hydroxyisoxazole ou hymexazole) a montré une efficacité pour réduire les symptômes et augmenter les rendements (Kotova & Tsvetkova, 1979), mais des études ultérieures n'ont pas permis de confirmer ce résultat (Jermyn et al., 1982). Certains herbicides destinés au contrôle des mauvaises herbes en culture de pois se sont également montrés toxiques pour *A. euteiches*. C'est le cas des herbicides de la famille des dinitroanilines comme la dinitramine ou la trifluraline (Grau & Reiling, 1977; Teasdale, 1979), mais ces molécules ne sont pas commercialisées à cause de leur effets toxiques sur les animaux et les organismes aquatiques (Byrd et al., 1995; Van der Schalie, 1983). Une application foliaire d'acide phosphorique au stade précoce du développement du pois serait cependant assez prometteuse pour la lutte contre *A. euteiches* (Porter, 2010).

### III.4.3. Les pratiques culturales

Les populations des pathogènes du complexe parasitaire du pois sont influencées par les facteurs climatiques et les composantes physico-chimiques et biologiques des sols. Certaines pratiques culturales, en modulant l'impact de ces facteurs environnementaux, ont une influence importante sur la densité et l'activité de ces populations pathogènes. Des pratiques culturales comme le labour, l'ajout d'amendements organiques, la biofumigation ou la rotation des cultures ont la capacité, seules ou en combinaison, de réduire l'incidence de la maladie. L'optimisation de ces pratiques culturales est ainsi une des voies envisageable pour le contrôle des pourritures racinaires du pois.

#### III.4.3.1. Travail du sol, la compaction et le labour

La compaction des sols est la résultante de multiples causes : la consolidation naturelle durant la formation du sol, le piétinement par les animaux, le rétrécissement lors de l'assèchement du sol après des intempéries ou l'irrigation, ou encore la pression et la déformation imposées par les roues des engins agricoles (Bowen et al., 1981). Plusieurs études ont relié la compaction du sol, résultant principalement de facteurs mécaniques, à l'émergence des pourritures racinaires du pois. La relation entre les pourritures racinaires du pois de conserve dues à *F. solani* f. sp. *pisi* et la masse volumique du sol sec, elle-même corrélée à la pression de contact des pneus de tracteurs utilisés pour la culture, a déjà été mise en évidence (Vigier & Raghavan, 1980) (cf. III.3.2.2). La porosité, l'aération et la disponibilité en eau du sol nécessaire à la croissance normale de la plante sont réduites. Consécutivement, la nodulation, la quantité d'azote fixée et la photosynthèse sont diminuées et la plante devient plus sensible aux pourritures racinaires (Tu, 1994). L'adoption de meilleures pratiques de labour et de semis aboutit à des plantes en meilleure santé avec des symptômes moins sévères (Tu, 1987b; Tu, 1991).

Cependant le labour conventionnel a des effets contradictoires sur les maladies d'origine tellurique. Il fait diminuer le potentiel infectieux en déplaçant les pathogènes vers des niches écologiques moins favorables situées plus profondément dans le sol mais perturbe son équilibre écologique (Steinberg et al., 2007). La densité de l'inoculum en pathogène peut tout de même rester

élevée dans la couche labourée du sol. L'abondance en propagules de *F. solani* f. sp. *pisi* retrouvées dans la couche labourée est notamment bien plus importante que dans les couches compactes situées en dessous (Burke et al., 1970).

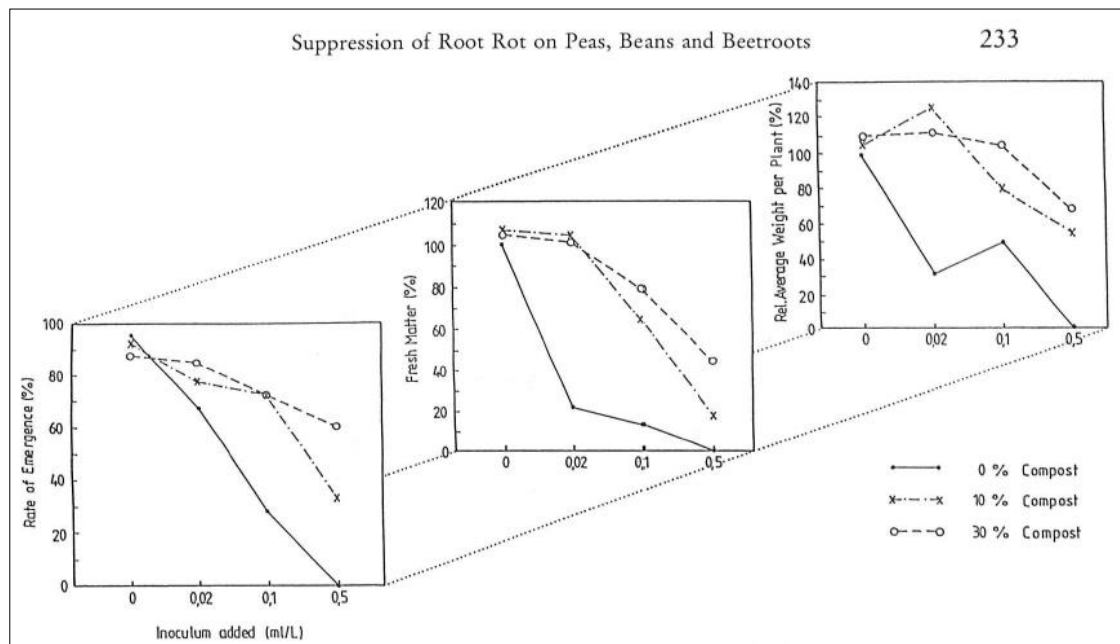
La réduction du labour est connue pour favoriser les pathogènes telluriques, notamment en protégeant les pathogènes logeant dans les résidus de la culture précédente de la dégradation microbienne, en abaissant la température du sol, en augmentant son humidité et en le laissant inchangé (Bockus & Shroyer, 1998). L'adoption de labour de conservation ou de non-labour permet ainsi de maintenir un résidu de la récolte précédente à la surface du sol qui va permettre de changer le microclimat du sol et fournir un substrat pour la croissance et la survie des communautés microbiennes (Bailey et al., 2001). Pour autant, diminuer la fréquence des labours n'a pas forcément d'impact sur la manifestation de la maladie. Des études comparatives entre différents régimes de labour en culture de pois (labour conventionnel, labour minimal (un seul labour) et absence de labour) utilisés avec différents assolements n'ont pas permis de mettre en évidence un impact sur l'incidence des pourritures racinaires du pois (Bailey et al., 1992; Bailey et al., 2001).

### III.4.3.2. Les amendements organiques :

Les amendements organiques d'origine animale ou végétale contiennent des nutriments, dont des microéléments qui améliorent la fertilité du sol. Ils peuvent être utilisés pour contrôler les maladies d'origine tellurique. Certains types de composts, en modifiant la diversité des communautés microbiennes ou la structure du sol et en favorisant la présence d'organismes antagonistes, peuvent réprimer les maladies causées par un ou plusieurs microorganismes (Alabouvette et al., 2006). Les compositions physiques, biologiques et chimiques très diversifiées des composts ne permettent pas d'obtenir la même efficacité sur tous les pathogènes et dans tous les pathosystèmes (Termorshuizen et al., 2006). Il est commun qu'ils n'aient aucun effet sur l'établissement de la maladie voire dans de rares cas aboutissent à sa stimulation (Steinberg et al., 2007).

L'influence d'amendements organiques de natures différentes sur les pourritures racinaires du pois a été évaluée dans quelques études. L'ajout de paille de blé, de mil ou de cellulose à un effet significatif sur l'incidence des pourritures *F. solani* f. sp. *pisi* (Respectivement 8% ; 4,2% ; 32% d'incidence en moins). L'addition simultanée de nitrate d'ammonium à la paille de blé et à la paille de mil aboutit à un effet encore plus important (respectivement 20% et 42% d'incidence en moins) (Mehrotra & Garg, 1977). L'addition de composts issus de déchets ménagers organiques réduit fortement l'apparition des pathologies du pois causées par *P. ultimum* (Figure 18) et dans une moindre mesure par *R. solani*, même à des niveaux d'inoculum particulièrement propices à l'apparition de la maladie (Schuler et al., 1989). Enfin, l'apparition des flétrissements dus à *F. oxysporum* f. sp. *pisi* est également significativement diminuée par l'ajout de fumier ou de vermicompost (Pandey et al., 2006).

Ces observations nécessitent de comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de l'abondance et de l'activité des populations pathogènes par les amendements organiques. Dans le cas des pourritures racinaires du pois, les facteurs abiotiques et les communautés antagonistes à l'origine de ces mécanismes n'ont été que très peu étudiées.



**Figure 19 :** Variations de plusieurs paramètres influençant le niveau d'inoculum de *P. ultimum* à différentes concentrations en compost (Schuler et al., 1989).

Une seule étude sur la réponse des communautés fongiques des racines de pois à l'ajout d'un fertilisant organique (Protamylasse, un composé résiduel de la production industrielle de l'amidon de pommes de terre.) a été effectuée. Elle met en œuvre des outils moléculaires de type séquençage à haut débit (Yu et al., 2013). L'abondance des deux espèces endophytes les plus représentées, *F. oxysporum* et *Olpidium brassicae*, répond très fortement à la concentration en Protamylasse. L'abondance en *O. brassicae* s'accroît très fortement en fonction de l'augmentation de la concentration en Protamylasse alors que celle de *F. oxysporum* diminue fortement dans le même temps. Une explication possible viendrait de la transition de certaines populations d'une stratégie biotrophe ou pathogène vers une stratégie saprotrophe (*F. oxysporum*), ce qui aboutirait à une compétition moins intense avec les champignons strictement biotrophes (*O. brassicae*) (Yu et al., 2013). On peut émettre l'hypothèse que la décroissance importante des populations de *F. oxysporum*, dont certains sont potentiellement pathogènes et passeraient vers stratégie saprotrophe, pourrait aboutir à une décroissance de la maladie corrélée avec l'augmentation de la concentration en Protamylasse.

L'abondance des populations de certains champignons mycorhiziens connus pour leur rôle antagoniste envers plusieurs pathogènes, est également fortement influencée par la concentration en amendement organique (baisse de *Paraglomus* sp., augmentation significative de *Glomus mossae* et *G. caledonium*). En dépit de leur nature biotrophe, ces champignons mycorhiziens sont connus pour accélérer la décomposition de la matière organique (Hodge, 2001).

A l'exception de *F. oxysporum*, potentiellement pathogène et dont la population décroît significativement quand la concentration de Protamylasse augmente, ces données ne sont pas suffisantes pour établir les mécanismes associant l'apport d'amendements organiques à la régulation des pathogènes du complexe parasitaire. Il serait intéressant de mener ce genre d'étude de manière plus transversale, dans différents contextes agricoles et avec différents types d'amendements organiques. Cela permettrait de caractériser de manière plus précise quels types d'amendements ont



un effet répressif sur l'apparition de la maladie, quelles sont les communautés microbiennes affectées par l'apport d'amendement qui peuvent avoir un rôle antagoniste vis-à-vis d'un ou de plusieurs pathogènes du complexe parasitaire du pois, et afin de caractériser plus précisément quels sont les composés abiotiques apportés par l'amendement qui permettent d'activer le développement de ces communautés antagonistes *in situ*.

### III.4.3.3. La biofumigation

La lutte par biofumigation contre les microorganismes pathogènes telluriques est assez documentée. Elle consiste généralement à cultiver des plantes de la famille des *Brassicaceae* jusqu'à la floraison. Elles sont alors coupées, hachées, et incorporées dans la couche supérieure du sol (Hossain, 2013). Elles peuvent être utilisées en culture intermédiaire, durant la rotation, ou directement mélangées au sol comme engrais vert (Steinberg et al., 2007). Les *Brassicaceae* produisent des anions glucosinolates, dont le type et la concentration diffèrent suivant les espèces et les parties végétatives de la plante (Sang et al., 1984; Fahey et al., 2001; Kabouw et al., 2009). L'hydrolyse des glucosinolates est effectuée par des enzymes endogènes de la famille des myrosinases et produit des composés toxiques comme des isothiocyanates, des ions thiocyanates, et des cyanures organiques. Ce sont ces composés qui ont un effet toxique sur les nématodes, les insectes, les champignons, les oomycètes, les bactéries et des effets phytotoxiques putatifs (Smith & Kirkegaard, 2002; Steinberg et al., 2007). L'effet inhibiteur des isothiocyanates diffère suivant leur mode d'action qui dépend de leur structure moléculaire et de leur concentration (Hossain, 2013 cite Kirkegaard et al., 1998 ; Smolinska et al., 2003 et Angus et al., 1994). L'effet sur les maladies d'origines telluriques est principalement due à la réduction de la densité d'inoculum en agents pathogènes dans le sol mais les changements dans la structure des populations de la microflore endogène et également mis en cause (Steinberg et al., 2007). Le développement et l'activité des communautés fongiques du sol, dont les agents pathogènes du pois, sont ainsi affectés par les effets fongicides ou fongistatiques des isothiocyanates.

Si la biofumigation et les isothiocyanates ont été testés sur de nombreux pathogènes telluriques comme *Pythium* spp. et *R. solani* (Manici et al., 2000; Charron & Sams, 1999), *T. basicola* (Shew et al., 1993) ou *F. oxysporum* (Smolinska et al., 2003), leurs effets ont été plus étudiés sur les pourritures racinaires du pois causées par *A. euteiches* (Hossain, 2013).

L'efficacité des *Brassicaceae* comme la moutarde blanche (*Sinapis alba* L.) (Tiges et feuilles) et de la moutarde brune (*Brassica juncea*) (Tiges) a été mise en évidence pour diminuer fortement le nombre de propagules d'*A. euteiches* et la sévérité des pourritures racinaires (Muehlchen et al., 1990; Hossain, 2013). Après deux cycles de rotations « moutarde blanche – pois », les symptômes de pourritures racinaires sont significativement moins sévères et les rendements de pois accrus (Muehlchen et al., 1990). Les isothiocyanates issus de l'hydrolyse des glucosinolates du colza (*Brassica napus*) inhibent également fortement *A. euteiches* et occasionnent une réduction dans la sévérité des pourritures racinaires (Jusqu'à -50% en bioessais) (Smolinska et al., 1997).

Plusieurs *Brassicaceae* peuvent ainsi influencer *A. euteiches* mais l'impact dépend du type de glucosinolates produits par la plante (aliphatique ou aromatique) et de la concentration des composés issus de leurs dégradations (Hossain et al., 2014). Par exemple, le composé dominant issu de l'hydrolyse des glucosinolates de colza, le 5-vinyloxazolidine-2-thione, semble être la principale source de toxicité contre les propagules d'*A. euteiches* (Smolinska et al., 1997). Les facteurs

environnementaux jouent également un rôle important dans l'efficacité de ces composés. L'ajout de hautes doses de  $\text{NO}_3^-$  au semis en conjugaison avec l'utilisation de *S. alba* et *B. juncea* réduit la sévérité des symptômes de pourritures racinaires (Hossain, 2013). Cet ajout pourrait compenser le déficit en azote issu d'éventuels effets toxiques des isothiocyanates sur les communautés microbiennes du cycle de l'azote. L'inhibition de la nitrification dans la sols par les glucosinolates des *Brassicaceae* a ainsi déjà été mis en évidence (Brown & Morra, 2009). Une baisse de la nodulation sur les racines de pois a déjà été observée lors de l'utilisation de *S. alba*, mais pourrait également être liée à l'apport d'azote inorganique sur les parcelles testées (Muehlchen et al., 1990). Une étude récente a cependant montrée que la toxicité des composés de dégradation des glucosinolates de *B. juncea* et *S. alba* ne modifie pas le potentiel fonctionnel des bactéries de cycle de l'azote (abondance du gène *amoA* (oxydant l'ammoniac) des communautés archae et bactériennes nitrifiantes (abondance du gène *nifH* des bactéries fixatrices d'azote) (Hossain et al., 2015). Les communautés bénéfiques de la rhizosphère du pois ne seraient ainsi pas impactées par la toxicité des isothiocyanates.

Ces effets toxiques des produits de l'hydrolyse des glucosinolates sur la microflore du sol sont connus et restent la principale limite à l'utilisation de la biofumigation. La modification de la structure des communautés microbiennes indigènes et de la microflore bénéfique du sol peut notamment rendre le sol sensible à d'autres maladies (Steinberg et al., 2007). La complexité des mécanismes responsables de la suppression des pathogènes telluriques par l'incorporation de biomasse de *Brassicaceae*, qui dépendent du/des pathogène(s) cible(s), du type et de la concentration en glucosinolates de la plante utilisée, de la concentration des produits issus de leur hydrolyse et de facteurs environnementaux en font de plus une technique difficile à paramétrer. Elle n'en reste pas moins efficace quant à la lutte contre *A. euteiches*. Elle a également l'avantage d'avoir des effets toxiques sur une large gamme de pathogènes du sol. Il serait nécessaire de vérifier ces effets sur les autres pathogènes dans le pathosystème complexe parasite-pois. A la vue de ses possibles effets toxiques sur la microflore bénéfique, cette technique devrait peut être limitée aux cas de parcelles aux sols très réceptifs aux pourritures racinaires du pois et fortement infestés, dans lesquels la déstabilisation des communautés microbiennes semble moins problématique.

### III.4.3.5. La rotation des cultures

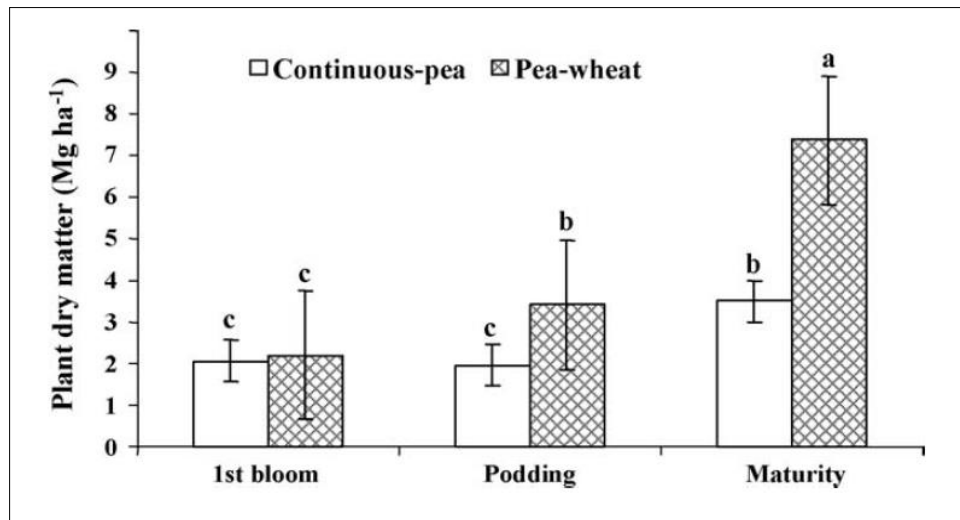
La rotation des cultures est une méthode effective pour le contrôle des pathogènes d'origine tellurique. Elle permet de maintenir la qualité du sol et de prévenir le développement de l'inoculum pathogène. L'interaction entre les populations d'un pathogène tellurique et les plantes peut être décrite comme un modèle dans lequel la densité de l'inoculum diminue en absence de plantes hôtes et augmente en présence de plantes hôtes (Levenfors, 2003). Trois conditions sont déterminantes dans ce contexte : la source de pathogène doit provenir du champ, le spectre d'hôte doit être étroit pour que le pathogène ne se propage pas à différentes cultures de la rotation et la durée de survie du pathogène dans le sol en l'absence d'hôte doit être limitée (Levenfors, 2003).

La rotation des cultures est particulièrement adaptée aux légumineuses et au pois en particulier dont la culture en rotation possède certains avantages. Elle permet de fixer l'azote atmosphérique et diminue la dépendance aux fertilisants (Soon et al., (2005) ; Peoples et al., (2009); Nemecek et al., (2008)) . Les rendements du blé sont ainsi toujours plus élevés après une culture de pois qu'après une culture d'oléagineux ou de céréales (Soon & Clayton, 2002). La culture des légumineuses a également un impact sur les propriétés physiques du sol comme la taille des agrégats et la densité apparente (Nayyar et al., 2009 citent Grant & Lafond, 1993). Certaines légumineuses comme la luzerne et le trèfle rouge forment également des racines pivotantes qui permettent de transporter et recycler des nutriments à partir de couches profondes dans le sol (Levenfors, 2003). Elles ont enfin un effet sur certaines maladies d'autres cultures utilisées dans la rotation, comme le pois sur certains pathogènes du blé (*B. sorokiniana* and *G. graminis*) (Bailey et al., 2001) ou la vesce velue (*Vicia villosa* Roth) sur les pourritures racinaires noires du coton dues à *T. basicola* (Candole & Rothrock, 1997). L'utilisation de la vesce velue pour la maîtrise de *T. basicola* dans une rotation avec du pois n'est pas malheureusement pas adaptée car elle est également connue pour faire augmenter les populations de *Rhizoctonia* spp. et *Pythium* spp. dans le sol, deux autres pathogènes du complexe parasitaire du pois (Rothrock, et al., 1995).

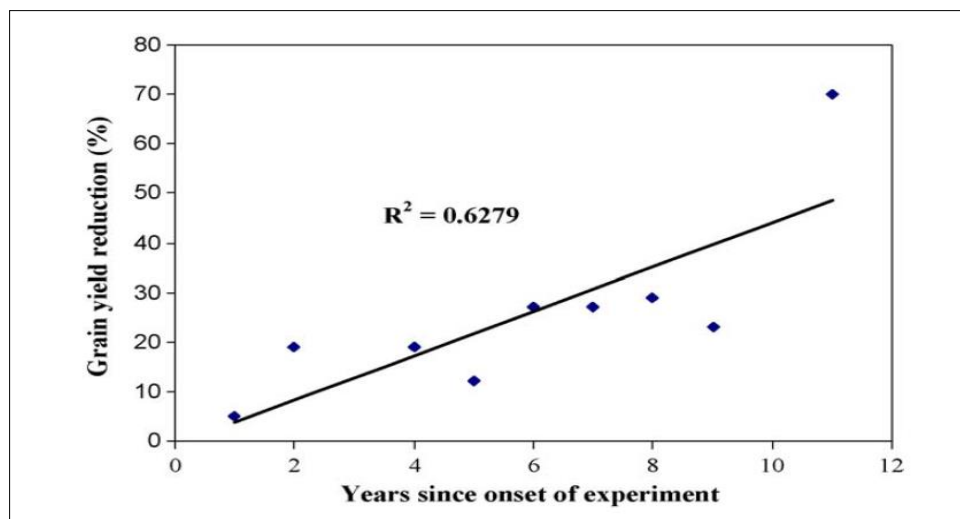
Dans le cas des pourritures racinaires du pois, les effets de la rotation des cultures sur la baisse des pourritures racinaires du pois ont été constatés (Bodker et al., 1993 ; Nayyar et al., 2009 ; Oyarzun et al., 1993b). Plusieurs espèces non hôtes peuvent être utilisées dans la rotation. L'utilisation de cultivars résistants de certaines légumineuses, notamment de la vesce et des féveroles pour le contrôle d'*A. euteiches*, est également possible (Moussart et al., 2013). Indépendamment de la résistance génétique aux pathogènes, certaines espèces utilisées comme précédents culturaux favoriseraient la résistance du sol à certains pathogènes du complexe (Le lin, le colza et le blé de printemps vis-à-vis de *F. solani* et les graminées et le maïs vis-à-vis de *A. euteiches*) (Oyarzun et al., 1998). Cependant la rotation pour le contrôle des pathogènes du complexe parasitaire du pois fait tout de même face à des problématiques. Les propagules de certaines espèces, comme les scléroties de *S. sclerotiorum* et les oospores de *A. euteiches*, peuvent persister dans l'environnement durant de longues périodes (Jusqu'à 10-20 ans pour les oospores d'*A. euteiches*), ce qui oblige à effectuer des rotations de plus en plus longues qui sont économiquement compliquées. D'autres pathogènes, comme *T. basicola*, *R. solani* (Levenfors, 2003) ou *F. avenaceum* (Fernandez et al., 2008), ont une gamme d'hôtes large dans laquelle ne doit pas figurer d'espèces ou de cultivars sensibles susceptibles d'augmenter l'inoculum.

Contrairement à la rotation des cultures, la monoculture du pois sur plusieurs années aboutit à une perte en biomasse significative (Nayyar et al., 2009) (Figure 19, 20). La mise en évidence de la

diminution de l'abondance racinaire (-50%), de la réduction des concentrations en N et P dans les tissus de la plante et d'une augmentation de la lixiviation du  $\text{NO}_3$  du sol lors de la culture continue du pois comparativement à une rotation pois-blé laisse penser que l'affaiblissement généralisé de la santé de la plante serait dû à une diminution des fonctions racinaires. Les concentrations élevées en Ca, Mg et en particulier en Mn et Fe dans les tissus de la plante en condition de culture continue peuvent atteindre un niveau toxique qui aboutit à la baisse de la croissance racinaire. Le stress induit par ces conditions peut favoriser la colonisation des racines par les pathogènes opportunistes du complexe parasite comme *F. avenaceum* (Nayyar et al., 2009).



**Figure 20** : Effet du système de culture sur les rendements de matière sèche du pois, à différents stade de développement du pois (Nayyar et al., 2009)

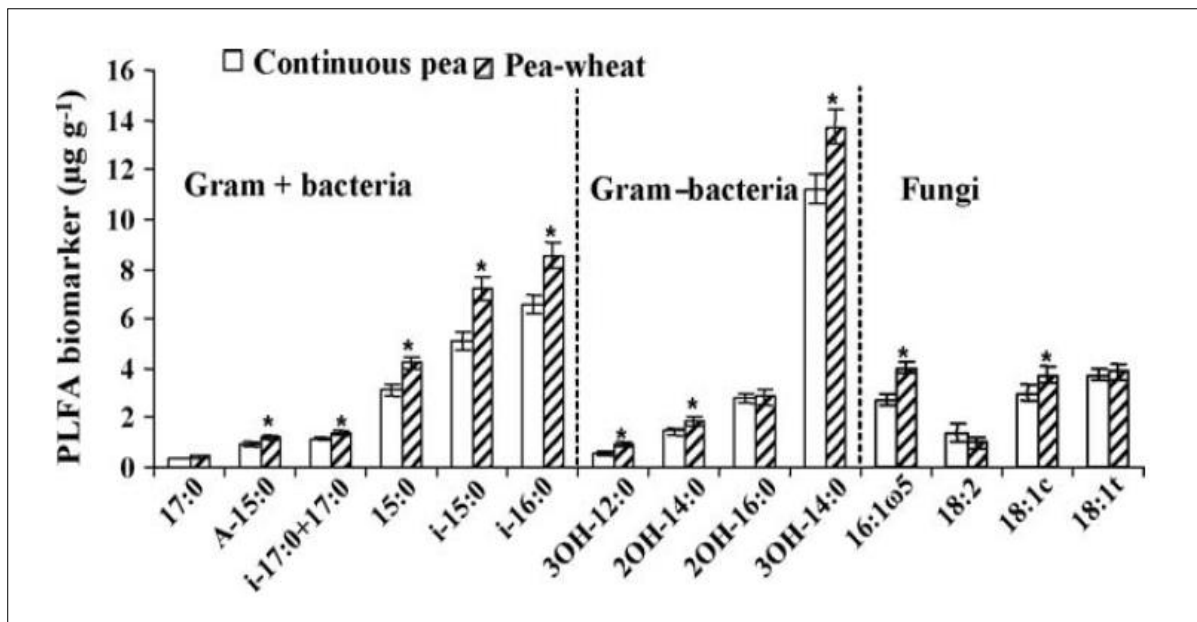


**Figure 21** : Relation entre la baisse de rendement observée entre une culture de pois continue et une rotation pois blé en fonction du nombre d'années de culture (Nayyar et al., 2009).

L'augmentation des concentrations en Mn et Fe dans les tissus peut être liée à l'activité des populations de microorganismes. Ils peuvent déclencher les réactions de défense de la plante qui produira des composés phénoliques qui complexent les cations métalliques du sol et augmentent leur biodisponibilité pour la plante (Nayyar et al., 2009 citent Graham & Stangoulis, 2003). La

biodisponibilité du Fe dans la rhizosphère du pois est une piste intéressante à développer. Le Fe est en effet connu pour être un élément limitant la prolifération des pathogènes du sol et fait l'objet d'une compétition entre la plante et les rhizobactéries produisant des sidérophores (Nayyar et al., 2009 ; Expert et al., 1996). Le Fe peut également améliorer la sporulation, la croissance ou l'activité de certaines enzymes de champignons phytopathogènes comme *Cylindrocarpon* spp. et favoriser les pourritures racinaires (Rahman & Punja, 2006). Les composés phénoliques produits par la plante dans les tissus blessés peuvent notamment augmenter la concentration en Fe au niveau du site d'infection de ce champignon (Rahman & Punja, 2006)

Les plantes sont également un déterminant majeur de la structure des communautés microbiennes dans le sol. Les racines libèrent dans la rhizosphère une large gamme de composés comme de l'éthylène, des sucres, des acides aminés, des vitamines, des polysaccharides et des enzymes qui créent un environnement unique pour les microorganismes présents (Garbeva et al., 2004). Le type de plante (l'espèce) et dans une moindre mesure le génotype et l'âge de la plante influencent fortement la structure des communautés bactériennes (Garbeva et al., 2004). La culture continue du pois a ainsi une influence différente sur la microflore rhizosphérique de celle d'une culture du pois en rotation avec d'autres espèces. Dans une culture continue du pois, les communautés microbiennes (les champignons saprophytes et les bactéries) sont beaucoup moins abondantes comparativement à celle d'une rotation pois-blé (Nayyar et al., 2009) (Figure 21). Les populations de bactéries Gram positif bénéfiques comme *Bacillus* spp. et *Clostridium* spp. ainsi que les champignons mycorhiziens sont notamment plus abondantes dans un système de rotations pois-blé. L'activité des communautés microbiennes est également fortement diminuée en culture continue de pois (jusqu'à -20% pour l'activité totale des uréases, phosphatases, déshydrogénases) ce qui indique une réduction dans les cycles des éléments nutritifs. Ces changements dans la microflore peuvent expliquer l'augmentation de l'incidence des pourritures racinaires.



**Figure 22** : Effet de la rotation des cultures sur les communautés microbiennes du sol, comparativement à une culture de pois continue. Analyse effectuée à l'aide de biomarqueurs PLFA (Nayyar et al., 2009).

### III.4.4. Le biocontrôle

#### III.4.4.1. Définition

Le contrôle biologique est défini comme « la réduction du niveau de l'inoculum ou de l'activité pathogène d'un microorganisme accomplie par ou via un ou plusieurs organismes autres que les hommes » (Cook & Baker, 1983). Cette large définition inclut le contrôle microbiologique par l'usage d'agents de biocontrôle. Ils peuvent agir par des effets antagonistes sur le microorganisme pathogène, pendant sa phase saprophyte principalement, ou indirectement en induisant la résistance de la plante hôte (Alabouvette et al., 2006).

L'antagonisme implique des interactions directes entre deux microorganismes qui partagent la même niche écologique. Le parasitisme, l'antibiose et la compétition pour les nutriments ou l'espace constituent les trois principaux modes d'actions antagonistes qui peuvent agir simultanément, successivement ou en synergie. Outre les interactions directes entre microorganismes, il y a l'induction des réactions de défense de la plante hôte (Alabouvette et al., 2009).

- Le parasitisme est une symbiose au cours de laquelle deux organismes sans liens phylogénétiques proches coexistent sur une longue durée et un organisme, le parasite, tire avantage de la relation aux dépens de l'autre organisme, nommé l'hôte (Pal & Gardener, 2006). L'activité de divers hyperparasites peut aboutir au biocontrôle des populations de pathogènes des plantes.
- L'antibiose est un antagonisme résultant de la production par un microorganisme de métabolites secondaires toxiques pour d'autres microorganismes (Alabouvette et al., 2006). C'est un mécanisme commun responsable de l'activité de nombreux agents de biocontrôle comme les *Pseudomonas* fluorescents, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. ou *Trichoderma* spp.. Diverses molécules de types antibiotiques, bactériocines, enzymes de dégradation de la paroi cellulaire, composés volatiles avec une activité antifongique ont été décrites et leurs rôles répressifs envers les pathogènes des plantes sont bien documentés (Daguerre et al., 2014). Généralement, la production de plusieurs de ces métabolites par l'agent de biocontrôle est nécessaire pour obtenir le biocontrôle d'un agent pathogène. Il est également plus prudent d'éviter toute généralisation d'un pathosystème à un autre ou d'un agent de biocontrôle à un autre (Alabouvette et al., 2006).
- La compétition est un phénomène général qui régule les populations de microorganismes lorsqu'elles partagent la même niche écologique et qu'elles nécessitent des besoins physiologiques identiques dans un environnement où les ressources trophiques sont limitées. La compétition pour les nutriments, comme le carbone ou le fer dans le sol est un phénomène connu qui est responsable d'un effet fongistase, notamment par l'inhibition de la germination des spores fongiques (Lockwood, 1977). La compétition a également lieu à la surface de la racine de l'hôte et au niveau des sites d'infection. Ce phénomène a notamment été observé entre souches de *F. oxysporum* pathogènes et souches de *F. oxysporum* non pathogènes (Mandeeel & Baker, 1991).

L'élicitation des défenses des plantes par les microorganismes est une autre méthode de biocontrôle. L'induction des défenses de l'hôte peut être locale ou systémique, dépendant du type, de la source, ou de niveau du stimulus. Elle nécessite une reconnaissance précoce d'un agent, pathogène ou non, par la plante. De nombreuses souches d'agents de biocontrôle colonisant les racines (*Trichoderma* spp.) et des souches promotrices de croissance de la plante (pour les bactéries, on parle de PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria) peuvent activer les défenses d'une plante hôte par la production d'éliciteurs comme l'acide salicylique, des sidérophores, des lipopolysaccharides, le 2,3-butanediol et d'autres substances volatiles ((Pal & Gardener (2006) citent Van Loon & Van Strien (1999), Ongena et al., (2004); Ryu et al., (2004), (Daguerre et al., 2014)). La Résistance Systématique Acquise (SAR) est une voie activée par ces éliciteurs. Elle est médiée, entre autres, par l'acide salicylique, un composé fréquemment produit lors d'une infection qui mène à l'expression de protéines PR (Pathogenesis-Related proteins) dont certaines peuvent agir en lysant les cellules invasives, en renforçant la paroi cellulaire ou en induisant localement la mort cellulaire (Pal & Gardener, 2006). La Résistance Systématique Induite (ISR) est une autre voie activée par ces éliciteurs qui est médiée par l'acide jasmonique et l'éthylène. Elle résulte également en la production de protéines PR, de phytoalexines et en un renforcement de la paroi cellulaire qui freine la progression de l'agent pathogène (Wiesel et al., 2014). La magnitude et la durée de l'induction des défenses de l'hôte varient dans le temps.

Généralement, un agent de biocontrôle peut agir en combinant plusieurs de ces différents mécanismes. Celui-ci devra le plus souvent coloniser la rhizosphère de la plante hôte et persister dans le milieu durant la culture pour assurer une protection efficace. C'est ce que l'on appelle l'adaptabilité à l'environnement ou "ecological fitness" d'une souche. Ce phénomène n'a malheureusement pas été suffisamment pris en compte pendant des années, ce qui explique en partie les échecs de la lutte biologique en grande culture.

### **III.4.4.2. Les agents de lutte utilisés dans le cas des pourritures racinaires du pois**

#### **III.4.4.2.1. Les agents de biocontrôle fongiques**

##### **III.4.4.2.1.1. Les champignons mycorhiziens**

Les champignons mycorhiziens forment un groupe hétérogène qui a établi une symbiose avec plus de 90% de toutes les espèces de plantes. On parle plutôt de bioprotection quand on évoque le rôle des mycorhizes car les mécanismes d'antibiose directe ont rarement été mis en évidence. Par contre, la compétition pour les ressources trophiques et surtout spatiales (colonisation de la racine) d'une part, et le renforcement de la vigueur de la plante par une facilitation de l'accès aux nutriments comme le phosphore ou même l'eau d'autre part, constituent des mécanismes souvent rapportés. Parmi les champignons mycorhiziens, on retrouve les champignons mycorhiziens à arbuscules, un groupe d'endomycorhizes qui peuvent s'associer aux légumineuses (du Jardin, 2015). Plusieurs champignons mycorhiziens à arbuscules du genre *Glomus* dont *G. mossae* (Slezacek et al., 2000), *G. fasciculatum* (Rosendahl, 1985), *G. intraradices* (dont le nouveau nom est désormais *Rhizophagus*

*intraradices*) (Kjoller & Rosendahl, 1996), *G. claroideum* (Thygesen, Larsen, & Bodker, 2004) sont des antagonistes connus d'*A. euteiches* chez le pois. La bioprotection serait dépendante d'une symbiose bien établie avec la présence d'arbuscules (Rosendahl, (1985); Slezack et al., (2000)). L'activité enzymatique d'*A. euteiches* au cours du processus infectieux dans les racines serait modifiée en présence de *Glomus* (Kjoller & Rosendahl, 1996). Elle pourrait être due en partie à l'élicitation des réactions de défense de la plante (Mycorrhiza Induced Resistance (MIR)), qui a également été décrite dans différents pathosystèmes impliquant des champignons et des oomycètes pathogènes telluriques dont *A. euteiches* et des champignons mycorrhiziens (Zhang & Franken, (2014) ; Hilou et al. (2014)), mais aussi à l'induction de la production de chitinases chez le pois par *G. mossae* (Symbiosis Related chitinases, SR-chi) (Slezack et al., 2001).

#### III.4.4.2.1.2. *Trichoderma* spp.

Plusieurs espèces de *Trichoderma* spp. ont été testées pour lutter contre les pathogènes du complexe parasitaire du pois comme *F. solani* f. sp. *pisi* (Kumar & Dubey, (2001); Jha & Jalali, (2006); Hamid et al., (2012)), *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Ali et al., 2014), *Pythium* spp. (El-Mohamedy & El-Baky, 2008), *S. sclerotiorum* (Jain et al., (2015); Kapoor et al., (2006)) et *A. euteiches* (Dandurand & Knudsen, 1993). Les champignons du groupe des *Trichoderma* sp. présentent l'avantage d'être facilement isolés du sol (Harman et al., 2004). Ils colonisent les racines de la plante, peuvent induire ses défenses et promouvoir sa croissance. Il contrôle également les champignons phytopathogènes par compétition pour les nutriments ou le fer (Production de sidérophores), antibiose (production d'antibiotiques variés et de métabolites secondaires), ou encore par mycoparasitisme (Daggerre et al., 2014). Après stimulation des hyphes de *Trichoderma* par chimiotropisme, la reconnaissance de l'hôte intervient par la liaison d'une agglutinine présente dans sa paroi (la lectine chez *R. solani*) et de sucres présents dans la paroi de *Trichoderma* sp. (le L-fucose chez *T. harzianum*). Le parasite s'enroule autour des hyphes de l'hôte et la pénétration a lieu grâce à la sécrétion d'enzymes qui dégradent la paroi cellulaire (chitinases ;  $\beta$ -1,3-glucanase). D'autres enzymes (protéases, lipases) sont alors sécrétées et la cellule de l'hôte est rapidement lysée (Davet, (1996); Harman et al., (2004); Srivastava et al., (2015)). Les espèces les plus prometteuses dans le cas des pourritures racinaires du pois sont *T. harzianum* et *T. viride*. Leur utilisation en tant qu'agents de biocontrôle mène à une augmentation de la germination des semences sur les sols infestés par *S. sclerotiorum* et *Pythium* spp., à une baisse de la sévérité des symptômes et de l'incidence des pourritures racinaires et à une augmentation significative des rendements. La co-inoculation avec d'autres agents de biocontrôle comme *G. virens* (Nawal et al., 2001), ou *A. niger* (Jha & Jalali, 2006) permet parfois d'optimiser les effets. Cependant, même si la compatibilité avec d'autres agents de biocontrôle existe, elle n'aboutit pas forcément à un meilleur contrôle de la maladie (Dandurand & Knudsen, 1993).

#### III.4.4.2.1.3. *Fusarium oxysporum* non pathogènes

Des souches non pathogènes de *Fusarium oxysporum* ont également été testées pour lutter contre *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (Oyarzun et al., 1994) et *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (Mandeel, 2006) et permettent, même dans les champs fortement infestés, de diminuer la sévérité de la maladie et d'augmenter les rendements (Oyarzun et al., 1994). Leur antagonisme est dû à l'induction de la



résistance chez la plante (ISR) et à la compétition pour les sites d'infections. La proximité physiologique et la similarité des exigences écologiques entre l'agent de biocontrôle et l'agent pathogène seraient plus efficaces pour retarder l'apparition de la maladie en comparaison avec d'autres agents de biocontrôle (Biles & Martyn, (1989); Olivain et al., (2006)). Certaines souches nécessiteraient que les racines soient blessées pour induire le biocontrôle alors que pour d'autres souches des tissus sains suffisent (Mandeel, 2006). L'induction de la résistance nécessiterait une germination rapide des spores, leur orientation en réponse aux exsudats racinaires, la pénétration et la colonisation des cellules épidermales, ainsi qu'une translocation passive des conidies dans la tige pour initier la réaction de défense (Mandeel, 2006).

#### III.4.4.2.1.4. *Chlonostachys rosea*

*Chlonostachys rosea*, anciennement nommé *Gliocladium roseum* (Schroers et al., 1999), est un agent de biocontrôle ayant déjà été étudié contre les pathogènes du complexe parasitaire du pois. Il est notamment antagoniste de *F. solani* f. sp. *pisi* et il permet de réduire la sévérité des symptômes causés par ce dernier (Castejon-Munoz & Oyarzun, 1995). L'utilisation de la souche ACM 941 de *Chlonostachys rosea* pour le contrôle biologique du complexe parasitaire chez le pois fourrager a également été testée (Xue, 2003a ; Xue, 2003b)). Cette souche mycoparasite produit des hyphes qui enlacent le mycélium du pathogène lorsqu'elle se trouve proche de lui. La pénétration et la croissance interne des hyphes n'a cependant été observée que chez *A. alternata*. En application sur la graine de pois, *C. rosea* peut se propager dans la rhizosphère et coloniser le tégument, l'hypocotyle et les racines et ainsi y persister sur une longue durée. La souche ACM941 de *C. rosea* présente l'avantage d'avoir un effet antagoniste sur la plupart des pathogènes du complexe parasitaire du pois (*F. solani* f. sp. *pisi* ; *F. oxysporum* f. sp. *pisi* ; *M. pinodes* ; *Aschochyta* spp. ; *R. solani* ; *S. sclerotiorum* ; *A. alternata*) et réduit fortement leur capacité à infecter la graine et les racines. Elle a permis d'augmenter *in vitro* la germination de 44%, l'émergence de 22% et réduit la sévérité des symptômes de 76%. Lors de tests en plein champ avec différents pathogènes du complexe utilisés séparément, l'émergence des plantules a augmenté de 13% à 22% et les rendements de 6% à 28% (Xue, 2003a). La hausse de l'émergence des plantules de pois et la réduction de la sévérité des symptômes ont été confirmés par d'autres travaux avec différents produits dérivés commerciaux de cette souche (Xue, 2003b).

#### III.4.4.2.1.5. *Gliocladium* spp.

Certaines espèces de *Gliocladium* sont antagonistes de pathogènes du complexe parasitaire du pois. *G. virens*, le plus étudié dans ce pathosystème, est un antagoniste de *R. solani*, *Pythium* spp., *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* (Hwang & Chakravarty, 1993) ou encore *F. solani* f. sp. *pisi* (D. Kumar & Dubey, 2001). Il agit par différents mécanismes incluant le parasitisme, l'antibiose (production de gliotoxines ; gliovirine) et la compétition. Il est notamment capable de parasiter *R. solani*. Des essais ont montré qu'il inhibe *R. solani in vitro* comme en plein champ et peut être utilisé seul ou en combinaison avec un fongicide. En présence de *G. virens*, la population de *R. solani* dans la rhizosphère du pois décroît fortement et le taux de survie des plantules de pois ainsi que la masse sèche des tiges et des racines augmentent (Hwang & Chakravarty, 1993)

#### III.4.4.2.1.6. Autres agents de biocontrôle fongiques.

D'autres champignons ont été utilisés pour le biocontrôle des pourritures racinaires du pois. Les effets antagonistes de *Muscodor cinnamomi* CMU-Cib 461 sur *R. solani* AG-2 ont été observés *in vitro* et *in planta* (contrôle de la fonte des semis) et seraient dus à la production de composés volatiles inhibant la croissance mycélienne du pathogène (Suwannarach et al., 2012). De même, *Aspergillus niger*, qui agit par mycoparasitisme et compétition, a également montré des effets antagonistes intéressants sur *F. oxysporum* f. sp. *pisi* *in vitro* (Ali et al., 2014) et sur *F. solani* f. sp. *pisi* en essais sous serre (Jha & Jalali, 2006).

### III.4.4.2.2. Les agents de biocontrôle bactériens

#### III.4.4.2.2.1. Les bactéries *Rhizobia*

Les rhizobia possèdent de nombreux effets bénéfiques pour la croissance des *Fabaceae* comme la fixation d'azote, l'apport en nutriments, la synthèse de phytohormones et la solubilisation des minéraux grâce à la symbiose qui s'établit entre les bactéries et les légumineuses. Dans le cas du pois, c'est avec l'espèce *Rhizobium leguminosarum* que s'établit cette relation symbiotique. Les rhizobia sont considérées comme des PGPR et ont également la capacité d'inhiber de nombreux pathogènes telluriques. Les mécanismes impliqués peuvent être i) l'antibiose (*B. japonicum* produit de la rhizobitoxine qui protège le soja de l'infection par *M. phaseolina* ; *R. leguminosarum* bv. *trifolii* T24 produit de la trifolitoxine), ii) la compétition pour le fer avec la production de sidérophores en condition de stress ferrique (rhizobactine (*S. meliloti*) ; citrate (*B. japonicum*) ; anthralinate et vicibactine (*R. leguminosarum* bv. *viciae*) ; catéchol (*R. leguminosarum* et *Bradyrhizobium japonicum*)), iii) la production d'HCN chez certaines souches, ou iv) l'induction de la production de phytoalexines chez la plante hôte (Deshwal et al., 2003). *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* a notamment fait l'objet de quelques études pour ses effets antagonistes contre les pathogènes du complexe parasitaire du pois. Cette bactérie permettrait d'améliorer la résistance du pois à *F. solani* f. sp. *pisi* en induisant chez ce dernier la production d'une phytoalexine, la 4-hydroxy-2,3,9-trimethoxypterocarpan (Chakraborty & Chakraborty, 1989). Certaines souches de *R. leguminosarum* bv. *viciae* se sont également montrées antagonistes à *Pythium* spp. et ont permis d'augmenter l'émergence des plantules de pois fourrager, le nombre de nodules, la biomasse et les rendements en graines en présence de ce pathogène comparativement à un contrôle sans traitement (Bardin et al., 2004 ; Huang & Erickson, 2007). Il est cependant difficile de faire la part du rôle promoteur de croissance lié à la symbiose et celle du rôle d'antagoniste vis-à-vis des agents pathogènes. L'interaction entre *R. leguminosarum* et *A. euteiches* d'une part et entre *R. leguminosarum* et le complexe responsable de la pourriture racinaire dans la rhizosphère du pois mériterait d'être étudiée plus en détail afin que la promotion du premier ne bénéficie pas au second et à l'inverse, que le contrôle des agents pathogènes ne se fasse pas au détriment de la relation symbiotique.

#### III.4.4.2.2.2. *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp.

Parmi les différentes espèces bactériennes utilisées en biocontrôle, *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. sont les plus étudiées pour la maîtrise du complexe parasitaire du pois. De nombreuses études ont montré leurs effets antagonistes sur les agents pathogènes qui le composent, qu'ils soient responsables de nécroses racinaires ou/et de la fonte des semis. Elles peuvent éliciter les défenses de la plante ou agir sur l'agent pathogène par antibiose ou compétition. De nombreuses

souches de *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. font parties des PGPR et produisent des phytohormones, des régulateurs de croissance des plantes comme l'acide indole acétique, des cytokinines, des gibbérellines et des inhibiteurs de la production d'éthylène, qui peuvent mener à l'augmentation du nombre de racines et de la surface d'échange nécessaire à l'absorption d'eau et de nutriments par les plantes (Nihorimbere et al., 2011). Utilisées en consortium, notamment avec *T. harzianum*, ces bactéries peuvent ainsi augmenter significativement la biomasse et les rendements de la culture du pois en présence ou en absence de pathogène (A. Jain et al., 2015).

Plusieurs espèces de *Bacillus* ont ainsi été mises en évidence pour leurs effets antagonistes sur les pathogènes du complexe parasitaire (Pieta & Pastucha, 2008; Wakelin et al., 2002; Wang et al., 2003). L'inhibition de *R. solani* par *Bacillus subtilis*, qui serait principalement due à des effets d'antibiose (production de bacilyline, fengymycine, bacitracine, bacilline, bulbiformine, mycosubtiline, subtiline) induit ainsi une baisse de la sévérité des symptômes (Hwang & Chakravarty, 1992). Son action antagoniste sur *S. sclerotiorum* et sa capacité à promouvoir la croissance du pois en absence de pathogène a également été constatée (Jain et al., 2015). Elle permet, tout comme certaines souches de *B. pumilus*, *B. cereus* et *B. mycoides* de réduire la formation des oospores d'*A. euteiches* au sein des tissus racinaires du pois (Wakelin et al., 2002). Par exemple, une souche isolée de *B. mycoides* (MW27) a permis de réduire, comparativement aux contrôles, de près de 83% la formation d'oospores d'*A. euteiches* (Wakelin et al., 2002) et d'augmenter d'environ 17% les rendements par application de cette souche sous forme de granules dans des champs infestés par *A. euteiches* et *Fusarium* spp. (Wakelin et al., 2002).

Chez les *Pseudomonas*, les espèces les plus utilisées pour lutter contre les agents du complexe parasitaire du pois sont *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, et *P. putida*. De nombreux isolats de ces espèces à partir de la rhizosphère de pois peuvent avoir des effets inhibiteurs de la croissance sur un ou plusieurs pathogènes du complexe parasitaire (Wang et al., 2003). Certaines souches issues de la rhizosphère du pois ont ainsi montré leur capacité à réduire la mortalité des plantes infectées par *F. solani* f. sp. *pisi* et *R. solani* sous serre (de 63,3% à 100%) comme en plein champ (20-100%), appliquées seules ou en combinaisons (Negi et al., 2005; Negi et al., 2008; Negi et al., 2011). Les mécanismes de biocontrôle intervenant dans le pathosystème pois-complexe parasitaire ne sont pas toujours très bien connus. Certaines souches de *P. putida* (N1R), qui ont un effet antagoniste sur *Pythium* spp., sont capables d'une part de jouer un rôle dans la compétition pour le fer grâce à la production de sidérophores mais également de réduire les concentrations en éthanol et en acétaldéhyde produites par la graine ce qui inhibe l'attractivité pour *Pythium ultimum* (Paulitz, 1991). L'antagonisme de certaines souches de *P. fluorescens* envers *A. euteiches* serait du à la production de phénazine (Dandurand & Knudsen, 1993). L'utilisation des souches de *P. fluorescens* PRA 25 et *Burkholderia cepacia* AMMD pour lutter contre *A. euteiches*, *Pythium* spp. et *R. solani* chez le pois est plus documentée mais les travaux datent de plus de 20 ans (Bowers & Parke, 1993; Parke, 1991a; Parke et al., 1991b; King & Parke, 1993; Xi et al., 1995). Comparativement aux contrôles, ces deux souches permettent de diminuer l'infection de la graine de pois (notamment par *Pythium* spp.) et d'augmenter significativement l'émergence des jeunes plantules. La baisse de l'incidence et de la sévérité de la maladie et la hausse significative des rendements sont également observées dans la plupart des essais effectués. *B. cepacia* AMMD semble être la plus prometteuse de ces deux souches. Une augmentation de l'émergence des plantules de pois de plus de 59% et une hausse des rendements jusqu'à 155% ont pu être observées lors de son application seule comparativement aux contrôles (Xi et al., 1995). *B. cepacia* AMMD a la capacité de se développer rapidement dans la spermosphère du pois mais le

traitement des semences avec cette souche diminue drastiquement la densité des populations bactériennes indigènes qui leur sont associées (Parke, 1990). Elle agirait par la production d'un antibiotique qui réduirait d'une part, l'attractivité des exsudats racinaires aux *Pythium* mais aussi en inhibant la formation des oogones chez *A. euteiches* et la colonisation mycélienne des tissus de l'hôte par *Pythium* spp. (Heungens & Parke, 2000; Heungens & Parke, 2001). Même si la température et l'humidité du sol jouent un rôle primordial dans l'émergence des pathogènes et augmentent considérablement l'incidence de la maladie (cf. III.3.1.1), l'effet des souches PRA 25 et AMMD persiste dans le temps (Bowers & Parke, 1993).

#### III.4.4.2.3. Stratégies d'optimisation du contrôle biologique

Le contrôle biologique dépend de l'établissement et du maintien d'une population seuil de l'agent de biocontrôle dans le sol. Une baisse de sa viabilité peut affecter l'efficacité du contrôle biologique. De nombreux facteurs édaphiques peuvent influencer la survie des microorganismes de biocontrôle et leur interaction avec le pathogène, c'est pourquoi l'écological fitness des populations introduites sont des paramètres clés à prendre en compte dans le choix de l'agent, du mode de formulation et du mode d'application.

Dans le cas du contrôle des pourritures racinaires du pois, l'utilisation de souches endémiques, adaptées aux conditions environnementales locales, semble permettre de meilleurs résultats en plein champs. (Wang et al., (2003) ; Negi et al., (2005); Negi et al., (2008); Negi et al., (2011)). La formulation à également une importance notable sur l'efficacité des traitements par les agents de biocontrôle. L'enrobage des graines de pois avec *B. mycoïdes* permet une augmentation significative de la levée (9%) alors qu'un traitement sous la forme de prills permettra l'augmentation significative de la masse des gousses (17%) (Wakelin et al., 2002). L'utilisation de tourbe pour l'application de souches de *P. fluorescens* PRA 25 améliore sensiblement ses effets comparativement à une formulation en granules (Xi et al., 1995). Enfin, il a été montré que des traitements de type Biopriming (traitement des semences associé à l'hydratation de la graine (Reddy, 2012)) améliore l'efficacité du traitement comparativement à l'enrobage de la graine (El-Mohamedy & El-Baky, 2008).

Plusieurs pathogènes peuvent être à l'origine des pourritures racinaires du pois dans une même parcelle. Ils ne partagent pas tous les mêmes caractéristiques biologiques et physiologiques et les agents de contrôle disponibles n'ont pas forcément d'effets antagonistes sur la totalité de ces pathogènes. Il paraît ainsi nécessaire de caractériser les interactions entre les microorganismes du rhizobiome sous l'influence des exsudats racinaires (i.e. du génotype de la plante) dans un environnement abiotique déterminé. Cette étape doit permettre d'optimiser le biocontrôle par la combinaison de plusieurs espèces ou de plusieurs souches de micro-organismes antagonistes adaptées à cet environnement dans lequel elles pourront exprimer leurs activités (fitness écologique). Il sera alors possible d'associer les modes d'actions, simultanément ou successivement et ainsi de cibler la gamme la plus large possible de pathogènes impliqués et de mutualiser les effets.

## IV. CONCLUSION

Les pourritures racinaires du pois potager sont dues à un consortium d'agents pathogènes d'origine tellurique regroupant plus d'une vingtaine d'espèces répertoriées dans la littérature scientifique. Parmi les principaux pathogènes, on retrouve des oomycètes dont *A. euteiches*, *P. pisi* et plusieurs espèces de *Pythium* ainsi que les champignons tels que *R. solani*, *T. basicola*, *P. medicaginis* var. *pinodella*, *M. pinodes.*, *F. oxysporum*, *F. solani* f. sp. *psi*, *F. avenaceum* et *F. culmorum*. Ces agents pathogènes peuvent persister sous forme libre dans le sol ou associés aux résidus de cultures sous la forme d'oospores et de sporanges (*A. euteiches*, *Pythium* spp.), de chlamydospores (*Fusarium* et *T. basicola*) ou encore sous forme d'hyphes ou de sclérotites (*R. solani*, *S. sclerotiorum*). Les oospores d'*A. euteiches* peuvent ainsi persister de 10 à 20 ans dans les champs infestés et imposent des rotations de culture de longues durées. La germination de ces propagules peut être stimulée par les exsudats des racines ou de la graine de pois germante. Certains composés de ces mêmes exsudats jouent un rôle chimioattractant pour les zoospores d'*A. euteiches* et de *Pythium* qui initieront l'infection.

Tous ces agents pathogènes sont différents par leur biologie et leur écologie et ils peuvent être retrouvés dans des proportions très variables suivant le lieu, les années, les conditions culturales et environnementales. L'expression de l'activité infectieuse de ces agents peut être favorisée par des facteurs pédoclimatiques. La température et l'humidité du sol jouent un rôle important dans cette expression. Les exigences écologiques nécessaires à l'activité infectieuse de chacun de ces pathogènes correspondent assez bien à la saisonnalité et aux conditions climatiques dominantes intervenant à chaque stade de la culture où le pois est victime de la maladie. Ainsi chez *Pythium* spp., responsable de fonte des semis, l'activité infectieuse est favorisée par des sols humides et frais (15 à 22,5°C) généralement observés en début de culture. Chez *A. euteiches*, qui est impliqué dans les pourritures racinaires du stade précoce de développement, l'activité infectieuse est favorisée par des températures douces (22° à 28°C) et des sols très humides. Enfin les températures chaudes et les sols secs de fin de culture favoriseront les pourritures dues à *F. solani* f. sp. *psi* (24-30°C). D'une manière plus générale, les agents du complexe parasitaire possèdent des exigences écologiques différentes qui recouvrent une large gamme de conditions pédoclimatiques ce qui pourrait expliquer la transversalité et la distribution mondiale de la maladie.

La santé des sols agricoles en culture de pois semble également être un facteur influençant le développement des pourritures racinaires, les sols fatigués favorisant le développement de la maladie. La modification de nombreux facteurs abiotiques et biotiques dans les champs intensément cultivés semble fournir des conditions favorables au développement des pathogènes ou à l'expression de leurs activités infectieuses. Plusieurs facteurs abiotiques sont corrélés avec une sensibilité du sol plus importante à l'activité pathogène de certains champignons du complexe parasitaire (pH, K pour *A. euteiches* ; Mg, P, K, C, Ntot pour *F. solani* f. sp. *psi* ; Ca, pH pour *T. basicola*) alors que d'autres au contraire seront corrélés à la résistance du sol à l'activité de ces mêmes pathogènes (NH<sub>4</sub>, Mg, P, C, N, C/N pour *T. basicola*, Ca pour *A. euteiches*). De même, des facteurs biotiques vont influencer ces activités infectieuses. Il est difficile d'associer des espèces fongiques particulières à la sensibilité des sols, espèces qui apparaîtraient soit comme incitatrices si elles sont actives et stimulent les agents pathogènes, soit comme indicatrices de la sensibilité des sols si elles ne participent pas activement à l'expression de la maladie. Les deux comportements sont par ailleurs tout à fait compatibles. Par

contre, plusieurs espèces fongiques ont pu être associées à une plus faible expression de l'activité pathogène de l'une ou l'autre des composantes du consortium de pourritures racinaires. C'est le cas notamment de champignons mycorhiziens du genre *Glomus* en présence desquels la culture est moins affectée par *A. euteiches*. Au-delà de leur rôle dans l'expression de la maladie, ces différents facteurs biotiques et abiotiques peuvent être considérés, si leur fonction vient à être confirmée par de nouvelles études, comme de potentiels indicateurs de la santé des sols dans un contexte de culture de pois. Enfin, même si des sols résistants aux activités pathogènes d'*A. euteiches*, *T. basicola* ou *F. solani* f. sp. *psi* ont été répertoriés, il a été difficile d'établir des facteurs les influençant de manière commune. La réceptivité des sols aux pourritures racinaires du pois peut être ainsi considérée comme pathogène-spécifique.

La plupart des stratégies de lutte contre les pourritures racinaires du pois employées jusque là ont des effets limités. Si l'enrobage des semences avec certains traitements chimiques, notamment à base de métalaxyle, toxique sur les *Pythium* spp., *F. avenaceum* ou encore *R. solani*, peut limiter la fonte des semis et améliorer la levée des plantules de pois, ces traitements chimiques n'agissent pas à des stades plus avancés du développement du pois. Seules quelques molécules herbicides de la famille des dinitroalines destinées au contrôle des mauvaises herbes en culture de pois se sont montrées toxiques sur *A. euteiches* mais ces molécules ne sont pas commercialisées à cause de leurs effets toxiques sur les animaux et les organismes aquatiques.

La sélection variétale ne permet pas à ce jour de proposer des génotypes résistants aux différents agents du complexe parasitaire. Seul sont disponibles des variétés résistantes, d'origines monogéniques, à *F. oxysporum* f. sp. *psi* et *Pythium* spp.. Plusieurs sources de résistances partielles pour *F. solani* f. sp. *psi* et *A. euteiches* ont été caractérisées, et permettent d'envisager l'obtention future de variétés commercialisables résistantes, mais un long travail de recherche et de sélection reste encore nécessaire.

L'adoption de pratiques culturales adaptées reste un moyen de contrôle, plus ou moins efficace, des pourritures racinaires du pois. Le drainage des terres, l'évitement de la compaction, l'ajout d'amendements organiques ont dans la plupart des cas un effet négatif sur le développement de la maladie. La biofumigation, qui consiste à se servir de l'effet fongicide ou fongistatique des isothiocyanates résultant de l'hydrolyse des glucosinolates contenus dans les parties végétatives des *Brassicaceae*, possède l'avantage d'être efficace contre la plupart des pathogènes du complexe parasitaire. Cependant, ses effets toxiques sur la flore fongique endogène peuvent être un facteur limitant. La restriction de son application aux parcelles fortement infestées et très réceptives à la maladie est ainsi préférable.

Seule la rotation longue des cultures est aujourd'hui utilisée avec efficacité pour le contrôle des pathogènes de complexe parasitaire. Elle permet de maintenir la qualité du sol et de prévenir le développement de l'inoculum pathogène à conditions d'utiliser des espèces non hôtes ou des variétés de légumineuses résistantes, notamment la vesce ou la féverole, pour le contrôle d'*A. euteiches*. La capacité du pois à fixer l'azote atmosphérique via sa symbiose avec *R. leguminosarum* en fait de plus une espèce bien adaptée à la rotation. Cependant la persistance des propagules de certaines espèces dans le sol durant de longues périodes, comme les sclérotites de *S. sclerotiorum* et les oospores d'*A. euteiches*, rend nécessaire la réalisation de rotations longues qui peuvent causer des problèmes pour la gestion des surfaces agricoles et notamment leurs extensions. La gestion du risque via des moyens

prophylactiques adaptés comme les tests de potentiel infectieux, avant toute nouvelle culture de légumineuses sensibles, reste nécessaire. Néanmoins ce test ne concerne que certaines espèces du complexe, notamment *A. euteiches*, ce qui limite la portée de son caractère préventif.

Au vu de l'importance qu'ont certaines communautés microbiennes dans la réceptivité des sols aux pathogènes du complexe parasitaire, le biocontrôle semble être une méthode à développer. Certains groupes fongiques, comme les champignons mycorhiziens à arbuscules de genre *Glomus* spp., sont non seulement bénéfiques pour la nutrition de la plante, mais assurent également sa bioprotection vis-à-vis d'*A. euteiches*. Les *F. oxysporum* non pathogènes, qui élicitent la réponse immunitaire de la plante et parce qu'ils entrent en compétition pour les ressources et pour les sites d'infections avec les *Fusarium* pathogènes sont de bons candidats pour la lutte biologique. De même, les bactéries PGPR comme *R. leguminosarum*, qui promeuvent la croissance du pois et élicitent ses réactions de défenses sont des antagonistes connues de pathogènes du complexe parasitaire comme *Pythium* spp. ou *F. solani* f. *pisi* et représentent une piste intéressante pour le biocontrôle. D'autres champignons, comme *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. ou *C. rosea*, qui agissent par différents mécanismes comme la compétition, l'antibiose ou le mycoparasitisme, ont l'avantage d'être antagonistes de nombreux agents du complexe parasitaire. C'est également le cas de bactéries du genre *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp., des PGPR qui, par des mécanismes de compétition (Nutriments, Fe), d'antibiose, d'élicitation des défenses et de promotion de la croissance de la plante, ont montré une certaine efficacité pour la lutte contre les pourritures racinaires du pois .

Cependant, de nombreux facteurs édaphiques peuvent influencer la survie des microorganismes de biocontrôle et leur interaction avec le pathogène, c'est pourquoi l'adaptabilité ou « l'ecological fitness » des populations introduites sont des paramètres clés à prendre en compte dans le choix de l'agent, le mode de formulation et le mode d'application. L'association de différents agents de biocontrôle d'une manière simultanée ou successive semble également être une piste envisageable afin de mutualiser leurs modes d'actions et de cibler la gamme la plus large possible de pathogènes du complexe parasitaire du pois.

Il y a à ce jour peu de méthodes de lutte disponibles contre les pourritures du pois potager à cause sans doute de la complexité des facteurs incriminés et en particulier i) du nombre actuellement connu de microorganismes impliqués dans les pourritures racinaires du pois, ii) de la diversité de leurs caractéristiques écologiques et pathogéniques, iii) de l'absence de variétés résistantes durablement à la maladie, c'est à dire aux différentes composantes du complexe parasitaire. Ainsi, la maîtrise effective de la maladie nécessite des approches complémentaires répondant à ces contraintes :

=> Une meilleure caractérisation du consortium et de son évolution en relation avec les conditions biotiques et abiotiques, incluant les pratiques culturales et leur histoire, dans lesquelles ce consortium peut se développer et exercer son activité infectieuse dans un sol dit fatigué. Les agronomes pourront alors intégrer cette connaissance dans l'établissement de systèmes de culture prévenant le développement du complexe parasitaire.

=> Les modes d'action du processus infectieux des différents microorganismes pathogènes du complexe doivent être déterminés pour fournir aux sélectionneurs variétaux le matériel qu'ils pourront intégrer dans leurs programmes de sélection, ayant ainsi à leur disposition les cibles clairement identifiées. La tâche n'est pas forcément plus aisée mais pour le moins, cette

connaissance permet de prévenir un trop rapide contournement mais surtout permet d'identifier la gamme des QTL sur lesquels doivent porter la sélection.

=> Certains microorganismes, bactéries et champignons se sont révélés capables de contrôler l'activité infectieuse de l'un ou l'autre des champignons et oomycètes responsables de pourritures racinaires de diverses légumineuses mais peu sont proposés sur le marché pour lutter contre cette maladie, en particulier chez le pois qu'il soit protéagineux, fourrager ou potager. Il y a là un potentiel qu'il faut exploiter. C'est pourquoi un focus particulier doit être porté sur la recherche d'agents de lutte biologique utilisables seuls ou sous forme de mélanges plus à même de contrôler le complexe parasitaire dans un ensemble de conditions environnementales variées.

=> L'adoption de bonnes pratiques culturales dans le contexte du développement de l'agriculture de précision sera également un facteur déterminant pour accompagner le développement de méthodes de lutte contre les pourritures racinaires du pois. L'éventuel trade-off entre résistance et productivité pourra être contourné en n'utilisant les variétés résistantes que dans les foyers à risques en associant le diagnostique préventif intégré par les agronomes dans leur système de culture et l'agriculture de précision. Cette même agriculture de précision doit pouvoir être associée à l'utilisation des méthodes de lutte biologique.



## Bibliographie

- Aimé, S., Alabouvette, C., Steinberg, C., & Olivain, C. (2013). The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47: a good candidate for priming the defense responses in tomato roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(8), 918–926.
- Alabouvette, C., Couteaudier, Y., & Louvet, J. (1982). Comparaison de la réceptivité de différents sols et substrats de culture aux fusarioses vasculaires. *Agronomie*, 2(1), 1–6.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Floriane, L., Aimé, S., Steinberg, C., & others. (2007). Using strains of *Fusarium oxysporum* to control *Fusarium* wilts: dream or reality? In *Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management* (pp. 157–177).
- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., & Steinberg, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*, 184(3), 529–544.
- Alabouvette, C., Olivain, C., & Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology*, 114(3), 329–341.
- Alberghina, A., Benni, A., & Fantino, M. G. (1979). Effects of temperature and polyphenols on fusaria growth. *Phytopathologische Zeitschrift*, 96(1), 40–49.
- Ali, M., Jain, S. K., Mehi lal, M. Z., Kumar, S., & Srivastva, A. S. (2014). Survey, media and management of *Fusarium* wilt of pea. *The Bioscan*, 9(3), 1213–1216.
- Angus, J. F., Gardner, P. A., Kirkegaard, J. A., & Desmarchelier, J. M. (1994). Biofumigation: Isothiocyanates released from brassica roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant and Soil*, 162(1), 107–112.
- Arnoldi, A., Zanoni, C., Lammi, C., & Boschini, G. (2015). The role of grain legumes in the prevention of hypercholesterolemia and hypertension. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 144–168.
- Bailey, K. L., Gossen, B. D., Lafond, G. P., Watson, P. R., & Derksen, D. A. (2001). Effect of tillage and crop rotation on root and foliar diseases of wheat and pea in Saskatchewan from 1991 to 1998: univariate and multivariate analyses. *Canadian Journal of Plant Science*, 81(4), 789–803.
- Bailey, K. L., Mortensen, K., & Lafond, G. P. (1992). Effects of tillage systems and crop rotations on root and foliar diseases of wheat, flax, and peas in Saskatchewan. *Canadian Journal of Plant Science*, 72(2), 583–591.
- Baker, K., & Cook, R. J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. San Francisco, USA: W.H. Freeman and Company.
- Bani, M., Rispaill, N., Evidente, A., Rubiales, D., & Cimmino, A. (2014). Identification of the main toxins isolated from *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 2 and their relation with isolates' pathogenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12), 2574–2580.
- Bani, M., Rubiales, D., & Rispaill, N. (2012). A detailed evaluation method to identify sources of quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 2 within a *Pisum* spp. germplasm collection. *Plant Pathology*, 61(3), 532–542.
- Bardin, S. D., Hung Chang, H., 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.
- Baudoin, J. P., Busogoro, J. P., Rusagara Nzungize, J., & Lyumugabe, F. (2013). *Pythium* root rot of common bean: biology and control methods. A review. *Base*.
- Belbahri, L., McLeod, A., Paul, B., Calmin, G., Moralejo, E., Spies, C. F. J., ... Lefort, F. (2008). Intraspecific and within-isolate sequence variation in the ITS rRNA gene region of *Pythium mercuriale* sp. nov. (*Pythiaceae*). *FEMS Microbiology Letters*, 284(1), 17–27.
- Biddle, A. J., Knott, C. M., & Gent, G. P. (1988). *Pea growing handbook*. Peterborough, U.K.: Processors and Growers Research Organisation.
- Biles, C. L., & Martyn, R. D. (1989). Local and systemic resistance induced in watermelons by *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 79, 856–860.
- Blume, M., & Harman, G. (1979). *Thielaviopsis basicola* - Component of the Pea Root-Rot Complex in New-York State. *Phytopathology*, 69(8), 785–788.
- Bockus, W. W., & Shroyer, J. P. (1998). The impact of reduced tillage on soilborne plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 485–500.
- Bodker, L., Leroul, N., & Smedegaard-Petersen, V. (1993). Influence of pea cropping history on disease severity and yield depression. *Plant Disease*, 77(9), 896–900.
- Bodker, L., Leroul, N., & Smedegaard-Petersen, V. (1993). The Occurrence in Denmark of Black Root-Rot of Pea Caused by *Thielaviopsis basicola*. *Plant Pathology*, 42(5), 820–823.
- Boyardieu, J. (1991). *Produire des grains oléagineux et protéagineux*. Paris: Technique et documentation-Lavoisier
- Botha, W. J., & Coetzer, R. L. J. (1996). Species of *Pythium* associated with root-rot of vegetables in South Africa. *South African Journal of Botany*, 62(4), 196–203.
- Bouhot, D., & Joannes, H. (1983). Potentiel infectieux des sols - concept et modes. *Bulletin OEPP*, 13(2), 291–295.
- Bowen, H. D., ARKIN, G., & Taylor, H. M. (1981). Modifying the root environment to reduce crop stress. *American Society of Agricultural Engineers Monograph*, 4, 21.
- 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.
- Brown, P. D., & Morra, M. J. (2009). Brassicaceae Tissues as Inhibitors of Nitrification in Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7706–7711.
- Burke, D. W. (1968). Root growth obstructions and *Fusarium* root rot of beans. *Phytopathology*, 58, 1575–1576.
- Burke, D. W., Hagedorn, D. J., & Mitchell, J. E. (1969). *Aphanomyces* and *Fusarium* root rot of peas with partial vs. total exposure of roots to infested soil. *Phytopathology*.
- Burke, D. W., Hagedorn, D. J., Mitchell, J. E., & others. (1970). Soil conditions and distribution of pathogens in relation to Pea root rot in Wisconsin soils. *Phytopathology*, 60(3), 403–406.

- Burke, D. W., Holmes, L. D., & Barker, A. W. (1972). Distribution of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* and bean roots in relation to tillage and soil compaction. *Phytopathology*, 62(5), 550–554.
- Byrd, R., Markham, J. K., & Emmerson, J. L. (1995). Developmental Toxicity of Dinitroaniline Herbicides in Rats and Rabbits. *Toxicological Sciences*, 26(2), 181–190.
- Candole, B. L., & Rothrock, C. S. (1997). Characterization of the Suppressiveness of Hairy Vetch-Amended Soils to *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathology*, 87(2), 197–202.
- Castejon-Munoz, M., & Oyarzun, P. J. (1995). Soil receptivity to *Fusarium solani* f.sp. *pisi* and biological control of root rot of pea. *European Journal of Plant Pathology*, 101(1), 35–49.
- Castillo, A. G., Hampton, J. G., & Coolbear, P. (1994). Effect of sowing date and harvest timing on seed vigour in garden pea (*Pisum sativum* L.). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 22(1), 91–95.
- Cerenius, L., & Soderhall, K. (1985). Repeated zoospore emergence as a possible adaptation to parasitism in *Aphanomyces*. *Experimental Mycology*, 9(3), 259–263.
- Chakraborty, U., & Chakraborty, B. N. (1989). Interaction of *Rhizobium leguminosarum* and *Fusarium solani* f.sp. *pisi* on pea affecting disease development and phytoalexin production. *Canadian Journal of Botany*, 67(6), 1698–1701.
- Chang, K. F., Hwang, S. F., Gossen, B. D., Strelkov, S. E., Turnbull, G. D., & Bing, D. J. (2011). Effect of seeding practices, temperature and seed treatments on *Fusarium* seedling blight of narrow-leaved lupin. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(5), 859–872.
- Chang, K. F., Hwang, S. F., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Howard, R. J., & Blade, S. F. (2004). Effects of soil temperature, seeding depth, and seeding date on rhizoctonia seedling blight and root rot of chickpea. *Canadian Journal of Plant Science*, 84(3), 901–907.
- Chang, K. F., Hwang, S. F., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Wang, H., & Howard, R. J. (2008). Effects of inoculum density, temperature, seeding depth, seeding date and fungicidal seed treatment on the impact of *Rhizoctonia solani* on lentil. *Canadian Journal of Plant Science*, 88(4), 799–809.
- Charron, C. S., & Sams, C. E. (1999). Inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by Shredded Leaves of Brassica Species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(5), 462–467.
- Coleman, J. J., Wasmann, C. C., Usami, T., White, G. J., Temporini, E. D., McCluskey, K., & VanEtten, H. D. (2011). Characterization of the gene encoding pisatin demethylase (FopDA1) in *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(12), 1482–1491.
- Coleman, J. J., White, G. J., Rodriguez-Carres, M., & VanEtten, H. D. (2011). An ABC transporter and a cytochrome P450 of *Nectria haematococca* MPVI are virulence factors on pea and are the major tolerance mechanisms to the phytoalexin pisatin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(3), 368–376.
- Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society.
- Coyne, C. J., Inglis, D. A., Whitehead, S. J., McClendon, M. T., & Muehlbauer, F. J. (2000). Chromosomal location of *Fwf*, the *Fusarium* wilt race 5 resistance gene in *Pisum sativum*. *Pisum Genetics*, 32, 20–22.
- Coyne, C. J., Pilet-Nayel, M.-L., McGee, R. J., Porter, L. D., Smykal, P., & Gruenwald, N. J. (2015). Identification of QTL controlling high levels of partial resistance to *Fusarium solani* f. sp. *pisi* in pea. *Plant Breeding*, 134(4), 446–453.
- Coyne, C. J., Porter, L. D., Inglis, D. A., Gruenwald, N. J., McPhee, K. E., & Muehlbauer, F. J. (2008). Registration of W6 26740, W6 26743, and W6 26745 Green Pea Germplasm Resistant to *Fusarium* Root Rot. *Journal of Plant Registrations*, 2(2), 137–139.
- Culley, D. E., Horovitz, D., & Hadwiger, L. A. (1995). Molecular characterization of disease-resistance response gene DRR206-d from *Pisum sativum* (L.). *Plant Physiology*, 107(1), 301.
- Curtis, F. de, Palmieri, D., Vitullo, D., & Lima, G. (2014). First report of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* as causal agent of root and crown rot on chickpea (*Cicer arietinum*) in Southern Italy. *Plant Disease*, 98(7), 995.
- Daguerrre, Y., Siegel, K., Edel-Hermann, V., & Steinberg, C. (2014). Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. *Fungal Biology Reviews*, 28(4), 97–125.
- Dahl, W. J., Foster, L. M., & Tyler, R. T. (2012). Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *British Journal of Nutrition*, 108(Supplement S1), S3–S10.
- Dandurand, L. M., & Knudsen, G. R. (1993). Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the spermosphere and rhizosphere of pea. *Phytopathology*, 83(3), 265–270.
- Davet, P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétale*. Editions Quae.
- Deacon, J. W., & Saxena, G. (1998). Germination triggers of zoospores cysts of *Aphanomyces euteiches* and *Phytophthora parasitica*. *Mycological Research*, 102(1), 33–41.
- Defago, G., Memmen, K. F., & Kern, H. (1975). Influence du cholestérol et des aponines sur le pouvoir pathogène du *Pythium paroeocandrum*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 83(2), 167–184.
- Deshwal, V. K., Pandey, P., Kang, S. C., & Maheshwari, D. K. (2003). Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41(10), 1160–1164.
- Dick, M. W. (2001). *The Peronosporomycetes*. Springer Berlin Heidelberg.
- Didelot, D., & Chaillet, I. (1995). Relevance and interest of root disease prediction tests for pea crop in France. In *2nd European Conference on Grain Legumes—Improving production and utilisation of grain legumes, Copenhagen-Denmark* (pp. 9–13).
- Doran, J. W., Sarrantonio, M., & Liebig, M. A. (1996). Soil health and sustainability. *Advances in Agronomy*, 56, 1–54.
- Dreschsler, C. (1940). Three Species of *Pythium* Associated with Root Rots., 30(3), 189–213.
- Dubey, S. C., Tripathi, A., Upadhyay, B. K., & Singh, B. (2012). Influence of weather and soil parameters on development of wet root rot in pulse crops and virulence analysis of *Rhizoctonia solani* isolates. *Journal of Agricultural Science (Toronto)*, 4(11), 195–205.
- El-Mohamedy, R. S. R., & El-Baky, M. M. H. A. (2008). Evaluation of different types of seed treatment on control of root rot disease, improvement growth and yield quality of pea plant in Nobaria Province. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(6), 611–622.

- Etebu, E., & Osborn, A. M. (2010). Molecular quantification of the pea footrot disease pathogen (*Nectria haematococca*) in agricultural soils. *Phytoparasitica*, 38(5), 447–454.
- Expert, D., Enard, C., & Masclaux, C. (1996). The role of iron in plant host-pathogen interactions. *Trends in Microbiology*, 4(6), 232–237.
- Fabbri, A. D. T., & Crosby, G. A. (n.d.). A review of the impact of preparation and cooking on the nutritional quality of vegetables and legumes. *International Journal of Gastronomy and Food Science*.
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., & Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56(1), 5–51.
- FAOSTAT. (2016). Retrieved December 9, 2015, from <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>
- Feng, J., Hwang, R., Chang, K. F., Conner, R. L., Hwang, S. F., Strelkov, S. E., ... Xue, A. G. (2011). Identification of microsatellite markers linked to quantitative trait loci controlling resistance to *Fusarium* root rot in field pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(1), 199–204.
- Feng, J., Hwang, R., Chang, K. F., Hwang, S. F., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., ... Turnbull, G. D. (2010). Genetic variation in *Fusarium avenaceum* causing root rot on field pea. *Plant Pathology*, 59(5), 845–852.
- Feng, N., XiaoYing, Z., LiHua, Y., YuHu, Z., & WeiXing, S. (2009). A method for high-efficiency isolation of *Phytophthora sojae* from heavily infected soybean tissues. *Journal of Northwest A & F University - Natural Science Edition*, 37(5), 139–143.
- Fernandez, M. R., Huber, D., Basnyat, P., & Zentner, R. P. (2008). Impact of agronomic practices on populations of *Fusarium* and other fungi in cereal and noncereal crop residues on the Canadian Prairies. *Soil and Tillage Research*, 100(1–2), 60–71.
- Funnell, D. L., Matthews, P. S., & VanEtten, H. D. (2002). Identification of new pisatin demethylase genes (PDA5 and PDA7) in *Nectria haematococca* and non-Mendelian segregation of pisatin demethylating ability and virulence on pea due to loss of chromosomal elements. *Fungal Genetics and Biology*, 37(2), 121–133.
- Garbeva, P., Veen, J. A. van, & Elsas, J. D. van. (2004). Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 243–270.
- 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.
- 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.
- Gaurilickiene, I., Janusauskaite, D., Cesnuleviciene, R., & Ramanauskiene, J. (2008). The suppression of stem base and root rot diseases of pea as affected by fungicidal seed treatment. *Zemdirbyste (Agriculture)*, 95(3), 50–57.
- Geldenhuis, M. M., Roux, J., Cilliers, A. J., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2006). Clonality in South African isolates and evidence for a European origin of the root pathogen *Thielaviopsis basicola*. *Mycological Research*, 110(3), 306–311.
- Goodwin, M. S. (2008). *Profil de la culture du pois de grande culture au Canada*. Ottawa: Agriculture et agroalimentaire Canada.
- Graham, R. D., & Stangoulis, J. C. (2003). Trace element uptake and distribution in plants. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1502S–1505S.
- Grajal-Martin, M. J., & Muehlbauer, F. J. (2002). Genomic location of the *Fw* gene for resistance to *fusarium* wilt race 1 in peas. *Journal of Heredity*, 93(4), 291–293.
- Grant, C. A., & Lafond, G. P. (1993). The effects of tillage systems and crop sequences on soil bulk density and penetration resistance on a clay soil in southern Saskatchewan. *Canadian Journal of Soil Science*, 73(2), 223–232.
- Grau, C. R., & Reiling, T. P. (1977). Effect of trifluralin and dinitramine on *Aphanomyces* root rot of pea. *Phytopathology*, 67(2), 273–276.
- Greenhalgh, F. C., Merriman, P. R., & Keane, P. J. (1988). Relative importance of root rots of subterranean clover caused by *Aphanomyces euteiches* and *Phytophthora clandestina*. *Plant Pathology*, 37(3), 344–350.
- Greenhalgh, F. C., & Taylor, P. A. (1985). *Phytophthora clandestina*, cause of severe taproot rot of subterranean clover in Victoria, Australia. *Plant Disease*, 69(11), 1002–1004.
- Gritton, E. T. (1990). Registration of five root rot resistant germplasm lines of processing pea. *Crop Science*, 30(5), 1166–1167.
- Grunwald, N. J., Coffman, V. A., & Kraft, J. M. (2003). Sources of partial resistance to *fusarium* root rot in the *Pisum* core collection. *Plant Disease*, 87(10), 1197–1200.
- Haan, R. L. de, Sheaffer, C. C., & Samac, D. A. (1996). First report of *Phytophthora medicaginis* causing *Phytophthora* root rot on annual Medicago spp. *Plant Disease*, 80(6), 710.
- Hagedorn, D. J. (1984). *Compendium of pea diseases*. St. Paul: America Phytopathological Society.
- Hagedorn, D. J., & others. (1960). Testing commercial Pea varieties for reaction to *Fusarium* root rot, *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Phytopathology*, 50(9).
- Hamid, A., Bhat, N. A., Sofi, T. A., Bhat, K. A., & Asif, M. (2012). Management of root rot of pea (*Pisum sativum* L.) through bioagents. *African Journal of Microbiology Research*, 6(44), 7156–7161.
- Hamon, C., Baranger, A., Coyne, C. J., McGee, R. J., Le Goff, I., L'Anthoene, V., ... Pilet-Nayel, M.-L. (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., Lesne, A., Esnault, R., Mangin, P., ... Pilet-Nayel, M.-L. (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, 45.
- Hance, S. T., Grey, W., Weeden, N. F., & others. (2004). Identification of tolerance to *Fusarium solani* in *Pisum sativum* ssp. *elatius*. *Pisum Genetics*, 36, 9–13.
- Han, Y., Liu, X., Benny, U., Kistler, H. C., & VanEtten, H. D. (2001). Genes determining pathogenicity to pea are clustered on a supernumerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca*: Pathogenicity genes in *Nectria haematococca*. *The Plant Journal*, 25(3), 305–314.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43–56.

- 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.
- Heungens, K., & Parke, J. L. (2001). Postinfection Biological Control of Oomycete Pathogens of Pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. *Phytopathology*, 91(4), 383–391. <http://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.4.383>
- Heyman, F. (2008). *Root rot of pea caused by Aphanomyces euteiches: calcium-dependent soil suppressiveness, molecular detection and population structure*. Dept. of Forest Mycology and Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Heyman, F., Blair, J. E., Persson, L., & Wikstrom, M. (2013). Root rot of pea and faba bean in southern Sweden caused by *Phytophthora pisi* sp. nov. *Plant Disease*, 97(4), 461–471.
- Heyman, F., Lindahl, B., Persson, L., Wikstrom, M., & Stenlid, J. (2007). Calcium concentrations of soil affect suppressiveness against *Aphanomyces* root rot of pea. *Soil Biology & Biochemistry*, 39(9), 2222–2229.
- Hilou, A., Zhang, H., Franken, P., & Hause, B. (2014). Do jasmonates play a role in arbuscular mycorrhiza-induced local bioprotection of *Medicago truncatula* against root rot disease caused by *Aphanomyces euteiches*? *Mycorrhiza*, 24(1), 45–54.
- Hodge, A. (2001). Arbuscular mycorrhizal fungi influence decomposition of, but not plant nutrient capture from, glycine patches in soil. *New Phytologist*, 151(3), 725–734.
- Holtz, M. D., Chang, K. F., Hwang, S. F., Gossen, B. D., & Strelkov, S. E. (2011). Characterization of *Fusarium avenaceum* from lupin in central Alberta: genetic diversity, mating type and aggressiveness. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33(1), 61–76.
- 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.
- Hossain, S. (2013). Impact of Brassicaceae cover crops on pea root rot (*Aphanomyces euteiches*) in subsequent peas.
- Hossain, S., Bergkvist, G., Berglund, K., Glinwood, R., Kabouw, P., Martensson, 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.
- Hossain, S., Bergkvist, G., Glinwood, R., Berglund, K., Martensson, A., Hallin, S., & Persson, P. (2015). Brassicaceae cover crops reduce *Aphanomyces* pea root rot without suppressing genetic potential of microbial nitrogen cycling. *Plant and Soil*, 392(1-2), 227–238.
- Hosseini, S., Elfstrand, M., Heyman, F., Jensen, D. F., & Karlsson, M. (2015). Deciphering common and specific transcriptional immune responses in pea towards the oomycete pathogens *Aphanomyces euteiches* and *Phytophthora pisi*. *Bmc Genomics*, 16, 627.
- Huang, H. C., & Erickson, R. S. (2007). Effect of seed treatment with *Rhizobium leguminosarum* on *Pythium* damping-off, seedling height, root nodulation, root biomass, shoot biomass, and seed yield of pea and lentil. *Journal of Phytopathology*, 155(1), 31–37.
- Huisman, O. C. (1982). Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root-invading fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 20, 303–327.
- Hwang, S. F. (1994). Potential for integrated biological and chemical control of seedling rot and preemergence damping-off caused by *Fusarium avenaceum* in lentil with *Bacillus subtilis* and Vitaflo-280. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz*, 101(2), 188–199.
- Hwang, S. F., & Chakravarty, P. (1992). Potential for the integrated control of *Rhizoctonia* root-rot of *Pisum sativum* using *Bacillus subtilis* and a fungicide. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz*, 99(6), 626–636.
- Hwang, S. F., & Chakravarty, P. (1993). Integrated biological and chemical control of *Rhizoctonia* root rot of field pea by *Gliocladium virens* and a fungicide. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz*, 100(3), 308–316.
- Hwang, S. F., & Chang, K. F. (1989). Incidence and severity of root rot disease complex of field pea in northeastern Alberta in 1988. *Canadian Plant Disease Survey*, 69(2), 139–141.
- Hwang, S. F., Gossen, B. D., Chang, K. F., Turnbull, G. D., & Howard, R. J. (2001). Effect of seed damage and metalaxyl seed treatment on *pythium* seedling blight and seed yield of field pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 81(3), 509–517.
- Hwang, S. F., Gossen, B. D., Conner, R. L., Chang, K. F., Turnbull, G. D., Lopetinsky, K., & Howard, R. J. (2007). Management strategies to reduce losses caused by *rhizoctonia* seedling blight of field pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 87(1), 145–155.
- Hwang, S. F., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Chang, K. F., Howard, R. J., & Thomas, A. G. (2000a). Effect of temperature, seeding date, fungicide seed treatment and inoculation with *Fusarium avenaceum* on seedling survival, root rot severity and yield of lentil. *Canadian Journal of Plant Science*, 80(4), 899–907.
- Hwang, S. F., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Chang, K. F., Howard, R. J., & Thomas, A. G. (2000b). Seeding date, temperature, and seed treatment affect *Pythium* seedling blight of field pea. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie*, 22(4), 392–399.
- Infantino, A., Kharrat, M., Riccioni, L., Coyne, C. J., McPhee, K. E., & Grunwald, N. J. (2006). Screening techniques and sources of resistance to root diseases in cool season food legumes. *Euphytica*, 147(1/2), 201–221.
- Irinyi, L., Kövics, G. J., & Sándor, E. (2009). Taxonomical re-evaluation of Phoma-like soybean pathogenic fungi. *Mycological Research*, 113(2), 249–260.
- Jain, A., Singh, A., Singh, S., & Singh, H. B. (2015). Biological management of *Sclerotinia sclerotiorum* in pea using plant growth promoting microbial consortium. *Journal of Basic Microbiology*, 55(8), 961–972.
- Jain, S., Weeden, N. F., Kumar, A., Chittam, K., & McPhee, K. (2015). Functional codominant marker for selecting the *Fw* gene conferring resistance to *Fusarium* wilt race 1 in pea. *Crop Science*, 55(6), 2639–2646.
- 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 & Biochemistry*, 39(1), 1–23.
- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14.
- Jermyn, W. A., Banfield, R. A., Hedley, J., & Russell, A. C. (1982). Effect of seed treatment on *Aphanomyces* root rot of peas. *Proceedings, Twelfth Annual Conference, Agronomy Society of New Zealand*, 12, 15–18.
- Jha, P. K., & Jalali, B. L. (2006). Biocontrol of pea root rot incited by *Fusarium solani* f. sp. *pisii* with rhizosphere mycoflora. *Indian Phytopathology*, 59(1), 41–43.

- Johnson, T. W., Seymour, R. L., Padgett, D. E., University of North Carolina at Wilmington, & Department of Biological Sciences. (2002). *Biology and systematics of the Saprolegniaceae*. [Wilmington, N.C.]: University of North Carolina at Wilmington, Dept. of Biological Sciences.
- Jones, F. R., & Drechsler, C. (1925). Boot rot of Peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches* (n. sp.). *Journal of Agricultural Research*, 30(4), 293–325 pp.
- Kabouw, P., Biere, A., van der Putten, W. H., & van Dam, N. M. (2009). Intra-specific differences in root and shoot glucosinolate profiles among white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 411–417.
- Kageyama, K., Nakashima, A., Kajihara, Y., Suga, H., & Nelson, E. B. . Phylogenetic and morphological analyses of *Pythium graminicola* and related species. *Journal of General Plant Pathology*, 71(3), 174–182.
- Kamoun, S. (2001). Non host resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4), 295–300.
- Kapoor, A. S., Paul, Y. S., & Singh, A. (2006). Integrated management of white rot and root rot-wilt disease complex of pea. *Indian Phytopathology*, 59(4), 467–474.
- Kerr, A. (1963). The Root Rot-*Fusarium* Wilt Complex of Peas. *Australian Journal of Biological Sciences*, 16(1), 55–69.
- Kerr, A. (1964). The influence of soil moisture on infection of peas by *Pythium ultimum*. *Australian Journal of Biological Sciences*, 17(3), 676–685.
- Kibblewhite, M. G., Ritz, K., & Swift, M. J. (2008). Soil health in agricultural systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1492), 685.
- Kim, W.-G., Hong, S.-K., & Lee, S.-Y. (2006). Occurrence of *Sclerotinia* Rot in Four Leguminous Crops Caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *The Plant Pathology Journal*, 22(1), 16–20.
- 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.
- Kirkegaard, J. A., & Sarwar, M. (1998). Biofumigation potential of brassicas. *Plant and Soil*, 201(1), 71–89.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., & Minter, D. W. (2008). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. Retrieved from [https://books.google.fr/books/about/Ainsworth\\_Bisby\\_s\\_Dictionary\\_of\\_the\\_Fung.html?hl=fr&id=IFD4\\_VFRDdUC](https://books.google.fr/books/about/Ainsworth_Bisby_s_Dictionary_of_the_Fung.html?hl=fr&id=IFD4_VFRDdUC)
- Kirpicheva, T. S. (1990). Root rot of peas in Ukraine. *Zashchita Rastenii (Moskva)*, (3), 23–24.
- Kjoller, R., & Rosendahl, S. (1996). The presence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* influences enzymatic activities of the root pathogen *Aphanomyces euteiches* in pea roots. *Mycorrhiza*, 6(6), 487–491.
- Kotova, V. V., & Tsvetkova, N. A. (1979). Effectiveness of chemical treatments for the control of *Aphanomyces* root rot of peas. *Khimiya v Sel'skom Khozyaistve*, 17(4), 37–39.
- Kraft, J. M. (1994). *Fusarium* wilt of peas (a review). *Agronomie*, 14(9), 561–567.
- Kraft, J. M., & Haglund, W. A. (1978). A reappraisal of the race classification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. *Phytopathology*, 68(3), 273–275.
- Kraft, J. M., Haware, M. P., Jimenez-Diaz, R. M., Bayaa, B., & Harrabi, M. (1994). Screening techniques and sources of resistance to root rots and wilts in cool season food legumes. *Euphytica*, 73(1/2), 27–39.
- Kraft, J. M., & others. (1992). Registration of 90-2079, 90-2131, and 90-2322 pea germplasms. *Crop Science*, 32(4).
- Kraft, J. M., & Pflieger, F. L. (2001). *Compendium of pea diseases and pests*. (J. M. Kraft & F. L. Pflieger, Eds.). St. Paul, USA: American Phytopathological Society (APS Press).
- Kumar, D., & Dubey, S. C. (2001). Management of collar rot of pea by the integration of biological and chemical methods. *Indian Phytopathology*, 54(1), 62–66.
- Kumar, S., Sivasithamparam, K., Gill, J. S., & Sweetingham, M. W. (1999). Temperature and water potential effects on growth and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-11 to lupin. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(5), 389–395.
- Kyei-Boahen, S., Slinkard, A. E., & Walley, F. L. (2001). Rhizobial survival and nodulation of chickpea as influenced by fungicide seed treatment. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(6), 585–589.
- Lai, F.-M., DeLong, C., Mei, K., Wignes, T., & Fobert, P. R. (2002). Analysis of the DRR230 family of pea defensins: gene expression pattern and evidence of broad host-range antifungal activity. *Plant Science*, 163(4), 855–864.
- Lavaud, C., Lesne, A., Piriou, C., Roy, G. le, 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. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 128(11), 2273–2288.
- Leur, J. van, Southwell, R., & Mackie, J. (2003). *Aphanomyces* root rot, a potential threat to an expanding faba bean industry in northern NSW. (B. Martin, Ed.). Tamworth, Australia: NSW Agriculture.
- Levenfors, J. (2003). Soil-borne pathogens in intensive legume cropping - *Aphanomyces* spp. and root rots. In *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae - Agraria* (p. 54 pp. + papers I–IV). Alnarp, Sweden: Sveriges Lantbruksuniversitet (Swedish University of Agricultural Sciences).
- Lévesque, C. A., & de Cock, A. W. A. M. (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*, 108(Pt 12), 1363–1383.
- Lewis, G. P., Schrire, B., Mackinder, B., & Lock, M. (2005). *Legumes of the World* (Vol. 577). Royal Botanic Gardens, Kew Richmond, UK.
- Lin, Y. S., Sun, W., & Wong, P. H. (1984). *Fusarium* root rot and wilt of garden peas in Taiwan. *Journal of Agricultural Research of China*, 33(4), 395–405.
- Li, W. J., Feng, J., Chang, K. F., Conner, R. L., Hwang, S. F., Strelkov, S. E., ... McLaren, D. L. (2013). Microsatellite DNA markers indicate quantitative trait loci controlling resistance to pea root rot caused by *Fusarium avenaceum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(1), 117–117.

- Lloyd, A. B., Lockwood, J. L., & others. (1963). Effect of soil temperature, host variety, & fungus strain on *Thielaviopsis* root rot of peas. *Phytopathology*, 53, 329–331.
- Lockwood, J. L. (1977). Fungistasis in soils. *Biological Reviews*, 52(1), 1–43.
- Lockwood, J. L., Ballard, J. C., & others. (1960). Evaluation of pea introductions for resistance to *Aphanomyces* and *Fusarium* root rots. *Quarterly Bulletin. Michigan State University Agricultural Experiment Station*, 42, 704–13.
- Lumsden, R. D., Garcia-E, R., Lewis, J. A., & Frias-T, G. A. (1987). Suppression of damping-off caused by *Pythium* spp in soil from the indigenous Mexican chinampa agricultural system. *Soil Biology & Biochemistry*, 19(5), 501–508.
- Mackintosh, S. F., Matthews, D. E., & VanEtten, H. D. (1989). Two additional genes for pisatin demethylation and their relationship to the pathogenicity of *Nectria haematococca* on pea. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2(6), 354–362.
- Madoui, M.-A. (2009). *Identification d'effecteurs du pouvoir pathogène et de voies métaboliques chez l'oomycète Aphanomyces euteiches par une approche génomique*. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Malvick, D. K., Grunwald, N. J., & Dyer, A. T. (2009). Population structure, races, and host range of *Aphanomyces euteiches* from alfalfa production fields in the central USA. *European Journal of Plant Pathology*, 123(2), 171–182.
- Malvick, D. K., & Percich, J. A. (1998). Variation in pathogenicity and genotype among single-zoospore strains of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, 88(1), 52–57.
- Mandeel, Q. A. (2006). Influence of plant root exudates, germ tube orientation and passive conidia transport on biological control of fusarium wilt by strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Mycopathologia*, 161(3), 173–182.
- Mandeel, Q., & Baker, R. (1991). Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 81(4), 462–469.
- Manici, L. M., Lazzeri, L., Baruzzi, G., Leoni, O., Galletti, S., & Palmieri, S. (2000). Suppressive activity of some glucosinolate enzyme degradation products on *Pythium irregulare* and *Rhizoctonia solani* in sterile soil. *Pest Management Science*, 56(10), 921–926.
- 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.
- Mathew, F. M., Lamppa, R. S., Chittam, K., Chang, Y. W., Botschner, M., Kinzer, K., ... Markell, S. G. (2012). Characterization and Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* Isolates Affecting *Pisum sativum* in North Dakota. *Plant Disease*, 96(5), 666–672.
- McClendon, M. T., Inglis, D. A., McPhee, K. E., & Coyne, C. J. (2002). DNA markers linked to fusarium wilt race 1 resistance in pea. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(4), 602–607.
- McPhee, K. E., Inglis, D. A., Gundersen, B., & Coyne, C. J. (2012). Mapping QTL for *Fusarium* wilt race 2 partial resistance in pea (*Pisum sativum*). *Plant Breeding*, 131(2), 300–306.
- Mehrotra, R. S., & Garg, D. K. (1977). Effect of organic amendments and fungicides on root rot and wilt of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil*, 46(3), 691–694.
- Merzoug, A., Belabid, L., Youcef-Benkada, M., Benfreha, F., & Bayaa, B. (2014). Pea *Fusarium* wilt races in western Algeria. *Plant Protection Science*, 50(2), 70–77.
- Milani, N. A., Lawrence, D. P., Arnold, A. E., & VanEtten, H. D. (2012). Origin of pisatin demethylase (PDA) in the genus *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(11), 933–942.
- 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.
- 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.
- Munier-Jolain, N., Véronique Biarnès, Isabelle Chaillet, J. Lecoeur, et Marie-Helene J. (2005). *Agrophysiologie du pois protéagineux*. INRA Editions. <https://hal.inrae.fr/hal-02833860>.
- Nawal, A. E., Abdel-Mageed, M. H., Fawzy, R. N., & Mansour, A. S. (2001). Chemical and biological control of some soil-borne fungi infecting pea roots. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 39(1), 161–183.
- Nayyar, A., Hamel, C., Lafond, G., Gossen, B. D., Hanson, K., & Germida, J. (2009). Soil microbial quality associated with yield reduction in continuous-pea. *Applied Soil Ecology*, 43(1), 115–121.
- Negi, Y. K., Garg, S. K., & Kumar, J. (2005). Cold-tolerant fluorescent *Pseudomonas* isolates from Garhwal Himalayas as potential plant growth promoting and biocontrol agents in pea. *Current Science*, 89(12), 2151–2156.
- Negi, Y. K., Garg, S. K., & Kumar, J. (2008). Plant growth promoting and biocontrol activities of cold-tolerant *Pseudomonas fluorescens* isolates against root rot in pea. *Indian Phytopathology*, 61(4), 461–470.
- Negi, Y. K., Prabha, D., Garg, S. K., & Kumar, J. (2011). Genetic diversity among cold-tolerant fluorescent *Pseudomonas* isolates from Indian Himalayas and their characterization for biocontrol and plant growth-promoting activities. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30(2), 128–143.
- Nemecek, T., von Richthofen, J.-S., Dubois, G., Casta, P., Charles, R., & Pahl, H. (2008). Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *European Journal of Agronomy*, 28(3), 380–393.
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., & Thonart, P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(2), 327.
- Ni, X., CanXing, D., YanNong, X., XiaoMing, W., & ZhenDong, Z. (2012). Identification of the pathogen causing *Fusarium* root rot of pea and diversity of pathogenicity genes. *Scientia Agricultura Sinica*, 45(14), 2838–2847.
- Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., L'Haridon, F., & Alabouvette, C. (2006). Colonization of Tomato Root by Pathogenic and Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Strains Inoculated Together and Separately into the Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1523–1531.
- Ondrej, M. (1992). Differences in Varietal Resistance of Pea (*Pisum sativum* L) to Root Diseases and Leaf-Spot of Peas. *Rostlinna Vyroba*, 38(2), 157–164.

- Ongena, M., Duby, F., Rossignol, F., Fauconnier, M.-L., Dommès, J., & Thonart, P. (2004). Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a nonpathogenic *Pseudomonas* strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(9), 1009–1018.
- Oyarzun, P., Gerlagh, M., & Hoogland, A. E. (1993a). Pathogenic fungi involved in root rot of peas in the Netherlands and their physiological specialization. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99(1), 23–33.
- Oyarzun, P., Gerlagh, M., & Hoogland, A. E. (1993b). 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. J., Dijst, G., & Maas, P. W. T. (1994). Determination and analysis of soil receptivity to *Fusarium solani* f.sp. *pisi* causing dry root rot of peas. *Phytopathology*, 84(8), 834–842.
- Oyarzun, P. J., Dijst, G., Zoon, F. C., & Maas, P. W. T. (1997). Comparison of soil receptivity to *Thielaviopsis basicola*, *Aphanomyces euteiches*, and *Fusarium solani* f. sp. *pisi* causing root rot in pea. *Phytopathology*, 87(5), 534–541.
- Oyarzun, P. J., Gerlagh, M., & Zadoks, J. C. (1998). Factors associated with soil receptivity to some fungal root rot pathogens of peas. *Applied Soil Ecology*, 10(1/2), 151–169.
- Oyarzun, P. J., Postma, J., Lutikholt, A. J. G., & Hoogland, A. E. (1994). Biological control of foot and root rot in pea caused by *Fusarium solani* with nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates. *Canadian Journal of Botany*, 72(6), 843–852.
- Oyarzun, P., & Loon, J. van. (1989). *Aphanomyces euteiches* as a component of the complex of foot and root pathogens of peas in Dutch soils. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95(5), 259–264.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 2, 1117–1142.
- Pandey, A. K., Gopinath, K. A., Chattacharya, P., Hooda, K. S., Sushil, S. N., Kundu, S., ... Gupta, H. S. (2006). Effect of source and rate of organic manures on yield attributes, pod yield and economics of organic garden pea (*Pisum sativum* subsp. *hortense*) in north west Himalaya. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 76(4), 230–234.
- Papavizas, G. C., Adams, P. B., Lumsden, R. D., Lewis, J. A., Dow, R. L., Ayers, W. A., & Kantzes, J. G. (1975). Ecology and epidemiology of *Rhizoctonia solani* in field soil. *Phytopathology*, 65(8), 871–877.
- Papavizas, G. C., & Ayers, W. A. (1974). *Aphanomyces* species and their root diseases in pea and sugarbeet. *Technical Bulletin Agricultural Research Service United States Department of Agriculture*, (1485), 158 pp.
- Parke, J. L. (1990). Population dynamics of *Pseudomonas cepacia* in the pea spermosphere in relation to biocontrol of *Pythium*. *Phytopathology*, 80(12), 1307–1311.
- Parke, J. L. (1991). Efficacy of *Pseudomonas cepacia* AMMD and *Pseudomonas fluorescens* PRA25 in biocontrol of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of pea. *Bulletin SROP*, 14(8), 30–33.
- Parke, J. L., Rand, R. E., Joy, A. E., & King, E. B. (1991). Biological control of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. *Plant Disease*, 75(10), 987–992.
- Paulitz, T. C. (1991). Effect of *Pseudomonas putida* on the stimulation of *Pythium ultimum* by seed volatiles of pea and soybean. *Phytopathology*, 81(10), 1282–1287.
- Peoples, M. B., Brockwell, J., Herridge, D. F., Rochester, I. J., Alves, B. J. R., Urquiaga, S., ... Jensen, E. S. (2009). The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*, 48(1-3), 1–17.
- Persson, L., Bodker, L., & Larsson-Wikstrom, M. (1997). Prevalence and pathogenicity of foot and root rot pathogens of pea in southern Scandinavia. *Plant Disease*, 81(2), 171–174.
- Persson, L., Larsson-Wikstrom, M., & Gerhardson, B. (1999). Assessment of soil suppressiveness to *Aphanomyces* root rot of pea. *Plant Disease*, 83(12), 1108–1112.
- Pfender, W. F. (1983). Disease Progress and Yield Loss in *Aphanomyces* Root Rot of Peas. *Phytopathology*, 73(8), 1109.
- Pieczarka, D. J., & Abawi, G. S. (1978). Influence of soil water potential and temperature on severity of *Pythium* root rot of snap beans. *Phytopathology*, 68(5), 766–772.
- Pieta, D., & Pastucha, A. (2008). Antagonistic bacteria and their post-culture liquids in the protection of pea (*Pisum sativum* L.) from diseases. *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus*, 7(4), 31–42.
- 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.
- 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.
- Plaats-Niterink, A. J. van der. (1981). *Monograph of the Genus Pythium*. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Porter, L. (2010). *Emerging and common disease en peas - Lyndon Porter, Green Pea 2010*.
- Porter, L. D. (2010). Identification of tolerance to *Fusarium* root rot in wild pea germplasm with high levels of partial resistance. *Pisum Genetics*, 42, 1–6.
- Porter, L. D., Kraft, J. M., & Grunwald, N. J. (2014). Release of pea germplasm with *Fusarium* resistance combined with desirable yield and anti-lodging traits. *Journal of Plant Registrations*, 8(2), 191–194.
- Pratap, A., & Kumar, J. (2011). *Biology and Breeding of Food Legumes*. CABI.
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moënne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1-2), 341–361.
- Rahman, M., & Punja, Z. K. (2006). Influence of Iron on *Cylindrocarpum* Root Rot Development on Ginseng. *Phytopathology*, 96(11), 1179–1187.
- Reddy, P. P. (2012). Bio-priming of Seeds. In *Recent advances in crop protection* (pp. 83–90). Springer India.
- Reyes, A. A. (1980). Pea root rot development and associated pathogens in Ontario fields. *Plant Disease*, 64(4), 392–393.
- Robideau, G. P., De, C., ARTHUR, W., COFFEY, M. D., VOGLMAYR, H., BROUWER, H., ... others. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1002–1011.

- Rodriguez-Carres, M., White, G., Tsuchiya, D., Taga, M., & VanEtten, H. D. (2008). The supernumerary chromosome of *Nectria haematococca* that carries pea-pathogenicity-related genes also carries a trait for pea rhizosphere competitiveness. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3849–3856.
- Rosendahl, S. (1985). Interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. *Phytopathologische Zeitschrift*, 114(1), 31–40.
- Rothrock, C. S., Kirkpatrick, T. L., Frans, R. E., & Scott, H. D. (1995). The influence of winter legume cover crops on soilborne plant pathogens and cotton seedling diseases. *Plant Disease*, 79(2), 167–171.
- Ryu, C.-M., Farag, M. A., Hu, C.-H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(3), 1017–1026.
- Sagar, V., & Sugha, S. K. (1997). Role of individual and combined inocula on the development of pea root rot. *Indian Phytopathology*, 50(4), 499–503.
- Sang, J. P., Minchinton, I. R., Johnstone, P. K., & Truscott, R. J. W. (1984). Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed, radish and swede. *Canadian Journal of Plant Science*, 64(1), 77–93.
- Schroers, H.-J., Samuels, G. J., Seifert, K. A., & Gams, W. (1999). Classification of the Mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, Its Relationship to *Bionectria ochroleuca*, and Notes on Other *Gliocladium*-like Fungi. *Mycologia*, 91(2), 365–385.
- Schuler, C., Biala, J., Bruns, C., Gottschall, R., Ahlers, S., & Vogtmann, H. (1989). Suppression of root rot on peas, beans and beetroots caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* through the amendment of growing media with composted organic household waste. *Journal of Phytopathology*, 127(3), 227–238.
- Scott, R. E. (1987). Root rot and soil compaction problems of pea crops. *Peas: Management for Quality. Agronomy Society of New Zealand, Special Publication No. 2*, 45–50.
- Scott, W. W. (1961). *A Monograph of the Genus Aphanomyces*. Virginia Agricultural Experiment Station.
- 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 & Pharmaceutical Bulletin*, 16(7), 698–701.
- Sharma, P. (2011). Alarming occurrence of *Fusarium* wilt disease in pea (*Pisum sativum* L.) cultivations of Jabalpur district in Central India revealed by an array of pathogenicity tests. *Agric. Biol. JN Am*, 2(6), 981–994.
- Sharma-Poudyal, D., Paulitz, T. C., Porter, L. D., & du Toit, L. J. (2015). Characterization and Pathogenicity of *Rhizoctonia* and *Rhizoctonia*-Like spp. From Pea Crops in the Columbia Basin of Oregon and Washington. *Plant Disease*, 99(5), 604–613.
- Shehata, M. A., Davis, D. W., & Anderson, N. A. (1981). Screening peas for resistance to stem rot caused by *Rhizoctonia solani*. *Plant Disease*, 65(5), 417–419.
- Sherwood, R. T., & Hagedorn, D. J. (1962). Studies on biology of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, 52(2), 150.
- Shew, H. D., Shoemaker, P. B., & others. (1993). Effects of host resistance and soil fumigation on *Thielaviopsis basicola* and development of black root rot on burley tobacco. *Plant Disease*, 77(10), 1035–1039.
- Silva, P. P. da, Freitas, R. A. de, & Nascimento, W. M. (2013). Pea seed treatment for *Rhizoctonia solani* control. *Journal of Seed Science*, 35(1), 17–20.
- Skovgaard, K., Bodker, L., & Rosendahl, S. (2002). Population structure and pathogenicity of members of the *Fusarium oxysporum* complex isolated from soil and root necrosis of pea (*Pisum sativum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 42(3), 367–374.
- 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.
- Slezack, S., Negrel, J., Bestel-Corre, G., Dumas-Gaudot, E., & Gianinazzi, S. (2001). Purification and partial amino acid sequencing of a mycorrhiza-related chitinase isoform from *Glomus mosseae*-inoculated roots of *Pisum sativum* L. *Planta*, 213(5), 781–787.
- Smith, B. J., & Kirkegaard, J. A. (2002). In vitro inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant Pathology*, 51(5), 585–593.
- 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.
- Smolinska, U., Morra, M. J., Knudsen, G. R., & James, R. L. (2003). Isothiocyanates produced by *Brassicaceae* species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease*, 87(4), 407–412.
- Smykal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., ... others. (2015). Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 43–104.
- Soon, Y. K., & Clayton, G. W. (2002). Eight years of crop rotation and tillage effects on crop production and N fertilizer use. *Canadian Journal of Soil Science*, 82(2), 165–172.
- Soon, Y. K., Klein-Gebbinck, H. W., & Arshad, M. A. (2005). Residue management and crop sequence effects on the yield and brown girdling root rot of canola. *Canadian Journal of Plant Science*, 85(1), 67–72.
- Soylu, S., & Dervis, S. (2011). Determination of prevalence and incidence of fungal disease agents of pea (*Pisum sativum* L.) plants growing in Amik plain of Turkey. *Research on Crops*, 12(2), 588–592.
- Srivastava, M., Pandey, S., Shahid, M., Kumar, V., Singh, A., Trivedi, S., ... Srivastava, Y. (2015). Biocontrol mechanisms evolved by *Trichoderma* sp. against phytopathogens: a review.
- Stanghellini, M. E., & Hancock, J. G. (1971). The sporangium of *Pythium ultimum* as a survival structure in soil. *Phytopathology*, 61(15), 7–164.
- Steinberg, C., Edel-Hermann, V., Janvier, C., Friberg, H., & Alabouvette, C. (2007). Interest of cultural practices to manage soilborne diseases. *Bulletin OILB/SROP*, 30(6(2)), 337–342.
- Suwannarach, N., Kumla, J., Bussaban, B., & Lumyong, S. (2012). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* AG-2, the causal agent of damping-off by *Muscador cinnamomi* CMU-Cib 461. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28(11), 3171–3177.
- Taheri, A. E., Hamel, C., Gan, Y., & Vujanovic, V. (2011). First report of *Fusarium redolens* from Saskatchewan and its comparative pathogenicity. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie*, 33(4), 559–564.



- Teasdale, J. R. (1979). Suppression of root rot disease of peas (*Pisum sativum*) by dinitroaniline herbicides. *Dissertation Abstracts International, B*, 40(3), 1017.
- Temporini, E. D., & VanEtten, H. D. (2002). Distribution of the pea pathogenicity ( PEP) genes in the fungus *Nectria haematococca* mating population VI. *Current Genetics*, 41(2), 107–114.
- Temporini, E. D., & VanEtten, H. D. (2004). An analysis of the phylogenetic distribution of the pea pathogenicity genes of *Nectria haematococca* MPVI supports the hypothesis of their origin by horizontal transfer and uncovers a potentially new pathogen of garden pea: *Neocosmospora boniensis*. *Current Genetics*, 46(1), 29–36.
- Termorshuizen, A. J., Rijn, E. van, Gaag, D. J. van der, Alabouvette, C., Chen, Y., Lagerlof, J., ... Zmora-Nahum, S. (2006). Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: variability in pathogen response. *Soil Biology & Biochemistry*, 38(8), 2461–2477.
- Thygesen, K., Larsen, J., & Bodker, 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(4), 411–419.
- Tu, J. C. (1987a). Etiology and control of *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum*) and root rot (*Fusarium solani*) of green pea (*Pisum sativum*). *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent*, 52(3a), 815–823.
- Tu, J. C. (1987b). Integrated control of the pea root rot disease complex in Ontario. *Plant Disease*, 71(1), 9–13.
- Tu, J. C. (1991). Etiology, biology and control of a soilborne root rot complex of green peas. *Plant Protection Bulletin (Taipei)*, 33(1), 17–35.
- Tu, J. C. (1994). Effects of soil compaction, temperature, and moisture on the development of the *Fusarium* root rot complex of pea in southwestern Ontario. *Phytoprotection*, 75(3), 125–131.
- UNILET. (2016). Culture par culture > Pois. Retrieved April 5, 2016, from <http://www.unilet.fr/cultures/pois/pois.php>
- Uzuhashi, S., Tojo, M., & Kakishima, M. (2010). Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience*, 51(5), 337–365.
- Vandemark, G., & Porter, L. D. (2011). *Aphanomyces* root rot of lentil. (W. Chen, H. C. Sharma, & F. J. Muehlbauer, Eds.). St. Paul, USA: *American Phytopathological Society (APS Press)*.
- Van der Schalie, W. (1983). *The acute and chronic toxicity of 3, 5-dinitroaniline, 1, 3-dinitrobenzene, and 1, 3, 5-trinitrobenzene to freshwater aquatic organisms*.
- Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), 85–97.
- Vigier, B., & Raghavan, G. S. V. (1980). Soil compaction effect in clay soils on common root rot in canning peas. *Canadian Plant Disease Survey*, 60(4), 43–45.
- 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.
- Wang, H., Hwang, S. F., Chang, K. F., Turnbull, G. D., & Howard, R. J. (2003). Suppression of important pea diseases by bacterial antagonists. *BioControl*, 48(4), 447–460.
- Watson, A., Browne, S. L., Snudden, M. G., & Mudford, E. M. (2013). *Aphanomyces* root rot of beans and control options. *Australasian Plant Pathology*, 42(3), 321–327.
- Weeden, N. F., & Porter, L. (2007). The genetic basis of *Fusarium* root rot tolerance in the Afghanistan pea. *Pisum Genet*, 39, 35–36.
- Wicker, E., Hullé, M., & Rouxel, F. (2001). Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology*, 50(4), 433–442.
- Wiesel, L., Newton, A. C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E. M., Birch, P. R. J., & Hein, I. (2014). Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 5, 655.
- Wojciechowski, M. F., Lavin, M., & Sanderson, M. J. (2004). A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analyses of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, 91(11), 1846–1862.
- Xi, K., Stephens, J. H. G., & Hwang, S. F. (1995). Dynamics of pea seed infection by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani*: effects of inoculum density and temperature on seed rot and pre-emergence damping-off. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 17(1), 19–24.
- Xue, A. G. (2003a). Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology*, 93(3), 329–335.
- Xue, A. G. (2003b). Efficacy of *Clonostachys rosea* strain ACM941 and fungicide seed treatments for controlling the root rot complex of field pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 83(3), 519–524.
- Xu, L., Ravnkov, S., Larsen, J., & Nicolaisen, M. (2012). Linking fungal communities in roots, rhizosphere, and soil to the health status of *Pisum sativum*. *Fems Microbiology Ecology*, 82(3), 736–745.
- Xu, L., Ravnkov, S., Larsen, J., Nilsson, R. H., & Nicolaisen, M. (2012). Soil fungal community structure along a soil health gradient in pea fields examined using deep amplicon sequencing. *Soil Biology & Biochemistry*, 46, 26–32.
- Yu, L., Nicolaisen, M., Larsen, J., & Ravnkov, S. (2012a). Molecular characterization of root-associated fungal communities in relation to health status of *Pisum sativum* using barcoded pyrosequencing. *Plant and Soil*, 357(1/2), 395–405.
- Yu, L., Nicolaisen, M., Larsen, J., & Ravnkov, S. (2012b). 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.
- Yu, L., Nicolaisen, M., Larsen, J., & Ravnkov, S. (2013). Organic fertilization alters the community composition of root associated fungi in *Pisum sativum*. *Soil Biology & Biochemistry*, 58, 36–41.
- Zhang, H., & Franken, P. (2014). Comparison of systemic and local interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae* and the root pathogen *Aphanomyces euteiches* in *Medicago truncatula*. *Mycorrhiza*, 24(6), 419–430.
- Zohary, D. (1999). Monophyletic vs. polyphyletic origin of the crops on which agriculture was founded in the Near East. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46(2), 133–142.



## **Annexe 2 : Supplementary data – Chapitre III**

Identification, pathogenicity, and community dynamics of fungi and oomycetes associated with pea root rot in the North of France.

---



**Supplementary data 1.** Field soil textures and main physico-chemical parameters.

Field	Texture			Physico-chemistry							
	Type	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	pH	C (g · Kg <sup>-1</sup> )	N (g · kg <sup>-1</sup> )	C/N	OM (g · Kg <sup>-1</sup> )	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg · Kg <sup>-1</sup> )	CaCO <sub>3</sub> (g · Kg <sup>-1</sup> )
F1	Silt loam	23.7	67.3	9	7.34	18.4	1.96	9.4	31.4	272	2
F2	Silt loam	18.1	73.2	8.7	6.89	11.5	1.31	8.8	19.9	163	1
F3	Silt loam	21.9	69.3	8.8	6.52	15.8	1.84	8.6	27.4	225	1
F4	Loam	19.8	48.9	31.3	8.15	9.83	1.1	8.9	16.2	112	4
F5	Silt loam	17.6	56.5	25.9	8.08	11.5	1.14	10.1	18.4	136	7
F6	Silt loam	13.9	72.2	13.9	7.11	11.7	1.28	9.1	20.2	126	1
F7	Silt loam	11.4	75.8	12.8	7.78	8.9	1.01	8.8	15	176	2
F8	Silt loam	13.3	68	18.7	7.19	8.91	1	8.9	15	115	2
F9	Silt loam	16.1	67.2	16.7	6.93	8.52	0.961	8.9	14.7	49	1
F10	Silt loam	18.8	68.2	13	8.09	11	1.16	9.5	17.7	69	6
F11	Silt loam	12.3	54.5	33.2	8.1	10	1.04	9.6	15.7	81	8
F12	Silt loam	17.3	70.7	12	8.03	14	1.34	10.4	22.3	79	9
F13	Silty clay loam	27.6	55.5	16.9	8.17	49.7	1.92	25.9	28.2	146	278
F14	Silt loam	18.8	71	10.2	8.16	17.7	1.33	13.3	22.6	99	39
F15	Silt loam	16.8	73.9	9.3	7.98	11.5	1.19	9.7	19.1	97	4
F16	Silt loam	12.5	72.4	15.1	8.16	11.4	1.06	10.8	17.1	82	13
F17	Silt loam	16.1	74.8	9.1	6.83	9.32	1.09	8.6	16.1	148	1
F18	Silt loam	15.6	73.1	11.3	8.02	9.71	1.11	8.7	16	186	4
F19	Silt loam	19.1	56.1	24.8	6.04	18.6	2.01	9.3	32.1	149	1
F20	Silt loam	18.3	69.2	12.5	6.93	17.8	1.87	9.5	30.8	108	1
F21	Silt loam	16.9	72.3	10.8	8.17	14.5	1.37	10.6	22.2	67	14
F22	Silt loam	17.5	72.9	9.6	8.06	11.4	1.13	10.1	18.8	82	5

**Supplementary data 2.** Origin of fungal and oomycete isolates collected from symptomatic roots of pea in 2017 and 2018 and markers used for their molecular identification

Taxon	Isolate		Origin		Sampling time <sup>b</sup>	Marker <sup>c</sup>	Primers	Sequence length (pb)	GenBank accession number
	MIAE accession number <sup>a</sup>	Original code	Field	Year					
<i>Fusarium oxysporum</i>		6a	F1	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	564	
<i>Fusarium solani</i>		6b	F1	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	578	
<i>Fusarium oxysporum</i>		8b	F1	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	588	
<i>Fusarium solani</i>	MIAE07700	8c	F1	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	480	
					/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	591	<a href="#">MW694299.1</a>
<i>Peniophora cinerea</i>		9e	F1	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	544	
<i>Fusarium oxysporum</i>		16a	F2	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	520	
<i>Phanerochaetaceae</i> sp.		16b	F2	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	XXX	
					/	LSU_D1D2	LR5/LROR	859	
					/	ITS	ITS5/ITS4	576	
<i>Clonostachys rhizophaga</i>		17b	F2	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	474	
					/	<i>TEF1</i>	EF1-728F/EF2	376	
<i>Fusarium solani</i>		18a	F2	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	577	
<i>Mortierella alpina</i>		20d	F2	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	606	
<i>Fusarium solani</i>		20e	F2	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	583	
<i>Stereum</i> sp.		20f	F2	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	545	
<i>Fusarium solani</i>		26a	F3	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	581	
<i>Fusarium oxysporum</i>		26b	F3	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	581	
<i>Fusarium solani</i>		27b	F3	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	618	
<i>Fusarium oxysporum</i>		29a	F3	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	573	
<i>Fusarium solani</i>		29b	F3	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	591	
<i>Fusarium solani</i>		29e	F3	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	596	
<i>Fusarium oxysporum</i>		36a	F4	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	537	
<i>Absidia glauca</i>		36b	F4	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	525	
<i>Fusarium oxysporum</i>		38a	F4	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	616	
<i>Absidia glauca</i>		38e	F4	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	544	
<i>Heterobasidion annosum</i>		38f	F4	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	554	
<i>Fusarium solani</i>		39e	F4	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	583	
<i>Fusarium solani</i>		40b	F4	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	593	
<i>Fusarium solani</i>		40f	F4	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	644	
<i>Fusarium oxysporum</i>		46a	F5	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	560	
<i>Fusarium solani</i>		46b	F5	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	593	
<i>Stereum hirsutum</i>		47d	F5	2017	/	ITS	ITS6/ITS4	535	
<i>Penicillium</i> sp.		48b	F5	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	479	
<i>Agaricomycetes</i> sp.		48d	F5	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	564	
					/	LSU_D1D2	LR5/LROR	879	
					/	<i>TEF1</i>	983F/1567R	527	
<i>Nectriaceae</i> sp.		49b	F5	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	466	
					/	LSU_D1D2	LR5/LROR	820	
					/	<i>TEF1</i>	983F/1567R	416	
<i>Baltazaria galactina</i>		49e	F5	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	610	
<i>Fusarium oxysporum</i>		50e	F5	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	621	
<i>Trametes</i> sp.		50g	F5	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	557	
<i>Fusarium redolens</i>		56a	F6	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	584	
<i>Fusarium solani</i>		56b	F6	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	592	
<i>Fusarium solani</i>		57c	F6	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	602	
<i>Fusarium solani</i>		58a	F6	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	602	
<i>Fusarium redolens</i>		58b	F6	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	595	
<i>Absidia coerulea</i>		59b	F6	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	592	
<i>Amyloporia xantha</i>		59e	F6	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	662	

## Annexe 2 : Supplementary data - Chapitre III

<i>Clonostachys</i> sp.		60b	F6	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	487	
<i>Fusarium redolens</i>		66a	F7	2017	/	TEF1	EF1/EF2	584	
<i>Fusarium redolens</i>		66b	F7	2017	/	TEF1	EF1/EF2	584	
<i>Fusarium solani</i>		67a	F7	2017	/	TEF1	EF1/EF2	603	
<i>Fusarium redolens</i>	MIAE07696	67c	F7	2017	/	TEF1	EF1/EF2	578	<a href="#">MW694295.1</a>
<i>Penicillium</i> sp.		68a	F7	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	491	
<i>Fusarium solani</i>		69a	F7	2017	/	TEF1	EF1/EF2	602	
<i>Fusarium solani</i>		70a	F7	2017	/	TEF1	EF1/EF2	602	
<i>Peniophora cinerea</i>		70c	F7	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	542	
<i>Fusarium avenaceum</i>	MIAE07688	75b	F8	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	481	
					/	TEF1	Fa/Ra	481	<a href="#">MW694287.1</a>
<i>Fusarium solani</i>		76a	F8	2017	/	TEF1	EF1/EF2	592	
<i>Fusarium oxysporum</i>		76b	F8	2017	/	TEF1	EF1/EF2	580	
<i>Fusarium solani</i>		76c	F8	2017	/	TEF1	EF1/EF2	593	
<i>Fusarium solani</i>	MIAE07701	77d	F8	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	397	-
					/	TEF1	EF1/EF2	565	<a href="#">MW694300.1</a>
<i>Baltazaria galactina</i>		77g	F8	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	588	
<i>Fusarium oxysporum</i>		79b	F8	2017	/	TEF1	EF1/EF2	568	
<i>Fusarium solani</i>		79e	F8	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	467	
					/	TEF1	EF1/EF2	587	
<i>Fusarium oxysporum</i>		79f	F8	2017	/	TEF1	EF1/EF2	565	
<i>Fusarium oxysporum</i>		80a	F8	2017	/	TEF1	EF1/EF2	564	
<i>Fusarium solani</i>		80b	F8	2017	/	TEF1	EF1/EF2	628	
<i>Fusarium solani</i>		86a	F9	2017	/	TEF1	EF1/EF2	600	
<i>Fusarium oxysporum</i>		86b	F9	2017	/	TEF1	EF1/EF2	610	
<i>Fusarium oxysporum</i>		86c	F9	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	454	
					/	TEF1	EF1/EF2	520	
<i>Peniophora cinerea</i>		89c	F9	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	544	
<i>Phanerochaete</i> sp.		90b	F9	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	552	
<i>Fusarium oxysporum</i>		96a	F10	2017	/	TEF1	EF1/EF2	580	
<i>Fusarium solani</i>		96e	F10	2017	/	TEF1	EF1/EF2	605	
<i>Fusarium solani</i>		97a	F10	2017	/	TEF1	EF1/EF2	617	
<i>Fusarium redolens</i>		97b	F10	2017	/	TEF1	EF1/EF2	592	
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>		97f	F10	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	478	
					/	LSU_D1D2	LR5/LROR	829	
					/	TEF1	983F/1567R	407	
<i>Absidia glauca</i>		98c	F10	2017	/	ITS	ITS1F	122	
					/	ITS	1389F	210	
<i>Adustoporia sinuosa</i>		98e	F10	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	564	
<i>Fusarium redolens</i>	MIAE07697	99b	F10	2017	/	TEF1	EF1/EF2	606	<a href="#">MW694296.1</a>
<i>Stereum</i> sp.		99e	F10	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	552	
<i>Fusarium avenaceum</i>	MIAE07690	104a	F11	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	491	
					/	TEF1	Fa/Ra	478	<a href="#">MW694289.1</a>
<i>Fusarium solani</i>		106a	F11	2017	/	TEF1	EF1/EF2	603	
<i>Fusarium oxysporum</i>		106b	F11	2017	/	TEF1	EF1/EF2	561	
<i>Meruliaceae</i> sp.		106c	F11	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	545	
<i>Fusarium redolens</i>		108c	F11	2017	/	TEF1	EF1/EF2	584	
<i>Fusarium oxysporum</i>		110b	F11	2017	/	TEF1	EF1/EF2	558	
<i>Fusarium solani</i>		116a	F12	2017	/	TEF1	EF1/EF2	602	
<i>Fusarium oxysporum</i>		117e	F12	2017	/	TEF1	EF1/EF2	497	
<i>Fusarium solani</i>		118a	F12	2017	/	TEF1	EF1/EF2	588	
<i>Fusarium oxysporum</i>	MIAE07693	119b	F12	2017	/	TEF1	EF1/EF2	609	<a href="#">MW694292.1</a>
<i>Fusarium solani</i>		126a	F13	2017	/	TEF1	EF1/EF2	597	
<i>Fusarium solani</i>		126b	F13	2017	/	TEF1	EF1/EF2	593	
<i>Fusarium solani</i>		127a	F13	2017	/	TEF1	EF1/EF2	592	
<i>Fusarium oxysporum</i>		127d	F13	2017	/	TEF1	EF1/EF2	573	
<i>Fusarium poae</i>		128a	F13	2017	/	TEF1	EF1/EF2	546	
<i>Fusarium solani</i>		129f	F13	2017	/	TEF1	EF1/EF2	571	
<i>Fusarium solani</i>		136a	F14	2017	/	TEF1	EF1/EF2	584	
<i>Fusarium oxysporum</i>		136b	F14	2017	/	TEF1	EF1/EF2	572	

## Annexe 2 : Supplementary data - Chapitre III

<i>Fusarium oxysporum</i>		136e	F14	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	581	
<i>Trametes hirsuta</i>		139d	F14	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	543	
<i>Fusarium solani</i>		140e	F14	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	618	
<i>Fusarium oxysporum</i>		146a	F15	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	581	
<i>Fusarium solani</i>		146c	F15	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	601	
<i>Clonostachys rhizophaga</i>		146e	F15	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	425	
					/	<i>TEF1</i>	EF1-728F/EF2	380	
<i>Didymellaceae</i> sp.		148b	F15	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	461	
					/	<i>TEF1</i>	983F/1567R	415	
<i>Epicoccum nigrum</i>		148d	F15	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	460	
<i>Fusarium culmorum</i>		150c	F15	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	435	
					/	<i>TEF1</i>	Fa/Ra	XXX	
<i>Fusarium solani</i>		156a	F16	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	602	
<i>Fusarium oxysporum</i>		156b	F16	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	557	
<i>Fusarium solani</i>		156d	F16	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	567	
<i>Agaricomycetes</i> sp.		157f	F16	2017	/	ITS	ITS6/ITS4	592	
					/	LSU_D1D2	LR5/LROR	851	
					/	<i>TEF1</i>	983F/1567R	554	
<i>Fusarium oxysporum</i>		158a	F16	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	554	
<i>Epicoccum nigrum</i>		160b	F16	2017	/	ITS	ITS6/ITS4	440	
<i>Fusarium oxysporum</i>		166a	F17	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	569	
<i>Fusarium solani</i>		166b	F17	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	609	
<i>Fusarium avenaceum</i>	MIAE07689	166c	F17	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	459	
					/	<i>TEF1</i>	Fa/Ra	479	<a href="#">MW694288.1</a>
<i>Clonostachys rosea</i>		168b	F17	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	457	
					/	<i>TEF1</i>	EF1-728F/EF2	387	
<i>Fusarium solani</i>		170a	F17	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	578	
<i>Trichoderma luteocrystallinum</i>		170b	F17	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	516	
<i>Phanerochaete</i> sp.		170c	F17	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	551	
<i>Fusarium solani</i>		176a	F18	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	592	
<i>Mortierella alpina</i>		176b	F18	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	576	
<i>Fusarium solani</i>		176c	F18	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	561	
<i>Peniophora cinerea</i>		176d	F18	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	545	
<i>Phlebia</i> sp.		176f	F18	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	551	
					/	<i>TEF1</i>	983F/1567R	509	
<i>Fusarium oxysporum</i>		178c	F18	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	557	
<i>Agaricomycetes</i> sp.		180e	F18	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	550	
					/	LSU_D1D2	LR5/LROR	871	
					/	<i>TEF1</i>	983F/1567R	514	
<i>Fusarium oxysporum</i>		186a	F19	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	599	
<i>Fusarium oxysporum</i>		186b	F19	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	461	
					/	<i>TEF1</i>	Fa/Ra	475	
<i>Fusarium solani</i>		186c	F19	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	605	
<i>Fusarium oxysporum</i>		186g	F19	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	551	
<i>Stereum</i> sp.		186h	F19	2017	/	ITS	ITS5/ITS4	578	
<i>Peniophora laeta</i>		187e	F19	2017	/	LSU_D1D2	LR5/LROR	820	
<i>Peniophora cinerea</i>		188e	F19	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	544	
<i>Fusarium oxysporum</i>	MIAE07692	196a	F20	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	443	
					/	EF	EF1/EF2	520	<a href="#">MW694291.1</a>
<i>Fusarium oxysporum</i>		197c	F20	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	441	
					/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	519	
<i>Fusarium solani</i>		199a	F20	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	593	
<i>Fusarium solani</i>		199d	F20	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	617	
<i>Fusarium redolens</i>		206a	F21	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	584	
<i>Fusarium solani</i>		206b	F21	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	603	
					/	ITS	ITS1F/ITS4	473	
<i>Stereum</i> sp.		206c	F21	2017	/	ITS	ITS5/ITS4	565	
<i>Clonostachys rosea</i>		206d	F21	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	501	
					/	<i>TEF1</i>	EF1-728F/EF2	382	
<i>Fusarium solani</i>		209a	F21	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	603	



## Annexe 2 : Supplementary data - Chapitre III

<i>Fusarium redolens</i>	216b	F22	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	584		
<i>Phanerochaete</i> sp.	216e	F22	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	552		
				/	<i>TEF1</i>	983F/1567R	522		
<i>Fusarium solani</i>	217b	F22	2017	/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	583		
<i>Fusarium oxysporum</i>	218d	F22	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	475		
				/	<i>TEF1</i>	Fa/Ra	453		
<i>Fusarium solani</i>	220d	F22	2017	/	ITS	ITS1F/ITS4	437		
				/	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	591		
<i>Trichoderma velutinum</i>	W11a	Woestyne	2018	T1	ITS	1389F/ITS4ngsUni	537		
<i>Pseudeurotium</i> sp.	W11b	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	496		
				-	LSU_D1D2	LR5/LROR	515		
<i>Pseudeurotium</i> sp.	W11c	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	426		
					LSU_D1D2	LR5/LROR	875		
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	W11d	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	426		
<i>Pseudeurotium</i> sp.	W11e	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	475		
					LSU_D1D2	LR5/LROR	907		
<i>Fusarium tricinctum</i>	W11f	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	475		
					<i>TEF1</i>	Fa/Ra	483		
<i>Mortierella alpina</i>	W11g	Woestyne	2018	T1	ITS	1389F/ITS4ngsUni	679		
<i>Fusarium tricinctum</i>	W11h	Woestyne	2018	T1	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	567		
<i>Fusarium oxysporum</i>	W12a	Woestyne	2018	T1	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	583		
<i>Mortierella elongata</i>	W12b	Woestyne	2018	T1	ITS	1389F/ITS4ngsUni	668		
<i>Pleosporales</i> sp.	W12c	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	451		
					LSU_D1D2	LR5/LROR	906		
<i>Penicillium brasilianum</i>	W12d	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	480		
<i>Plectosphaerella plurivora</i>	W12e	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	477		
					LSU_D1D2	LR5/LROR	898		
					<i>TEF1</i>	983F/1567R	421		
<i>Chaetomium</i> sp.	W13a	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	501		
<i>Chaetomium</i> sp.	W13b	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	524		
<i>Mortierella elongata</i>	W13c	Woestyne	2018	T1	ITS	1389F/ITS4ngsUni	661		
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	W13d	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	474		
<i>Trichoderma velutinum</i>	W15a	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	518		
<i>Fusarium oxysporum</i>	W15b	Woestyne	2018	T1	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	568		
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	W15c	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	489		
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	W15d	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	488		
<i>Mucor circinelloides</i>	W15e	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	514		
<i>Alternaria</i> sp.	W15h	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	483		
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	W16b	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	495		
<i>Acremonium sclerotigenum</i>	W16c	Woestyne	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	518		
					LSU_D1D2	LR5/LROR	861		
<i>Mucor hiemalis</i>	W16d	Woestyne	2018	T1	ITS	1389F/ITS4ngsUni	593		
<i>Fusarium oxysporum</i>	W21a	Woestyne	2018	T2	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	627		
<i>Fusarium avenaceum</i>	W21c	Woestyne	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	429		
					<i>TEF1</i>	Fa/Ra	479		
<i>Fusarium redolens</i>	W21d	Woestyne	2018	T2	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	617		
<i>Trichoderma velutinum</i>	W21e	Woestyne	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	547		
<i>Pythium</i> Cluster B2a species complex	W21f	Woestyne	2018	T2	ITS	1389F/ITS4ngsUni	946		
					COX1	Fm85/Levup	667		
<i>Clonostachys rosea</i>	W21h	Woestyne	2018	T2	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	549		
					ITS	ITS1F/ITS4	453		
<i>Trichoderma velutinum</i>	W22a	Woestyne	2018	T2	ITS	1389F/ITS4ngsUni	698		
<i>Fusarium redolens</i>	MIAE07698	W22b	Woestyne	2018	T2	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	623	<a href="#">MW694297.1</a>
<i>Fusarium oxysporum</i>	W22d	Woestyne	2018	T2	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	607		
<i>Fusarium solani</i>	MIAE07702	W22e	Woestyne	2018	T2	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	634	<a href="#">MW694301.1</a>
<i>Fusarium culmorum</i>	W22f	Woestyne	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	473		
					<i>TEF1</i>	Fa/Ra	472		
<i>Clonostachys rosea</i>	W22g	Woestyne	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	496		
					<i>TEF1</i>	EF1/EF2	XXX		

## Annexe 2 : Supplementary data - Chapitre III

<i>Mortierella minutissima</i>	W22i	Woestyne	2018	T2	ITS	1389F/ITS4ngsUni	638
<i>Fusarium avenaceum</i>	W22j	Woestyne	2018	T2	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	560
<i>Trichoderma tomentosum</i>	W23a	Woestyne	2018	T2	ITS	1389F/ITS4ngsUni	678
<i>Fusarium oxysporum</i>	W23b	Woestyne	2018	T2	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	607
				0	ITS	ITS1F/ITS4	453
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	W23c	Woestyne	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	465
<i>Fusarium solani</i> species complex	W23d1	Woestyne	2018	T2	LSU_D1D2	LR5/LROR	824
					ITS	ITS5/ITS4	501
<i>Fusarium redolens</i>	W23d2	Woestyne	2018	T2	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	604
<i>Trichoderma tomentosum</i>	W24a	Woestyne	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	535
<i>Mucor hiemalis</i>	W24b	Woestyne	2018	T2	ITS	1389F/ITS4ngsUni	656
<i>Fusarium oxysporum</i>	W24d	Woestyne	2018	T2	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	586
<i>Clonostachys rosea</i>	W24e	Woestyne	2018	T2	ITS	1389F/ITS4ngsUni	507
					<i>TEF1</i>	EF1/EF2	602
<i>Fusarium solani</i>	W24f	Woestyne	2018	T2	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	639
<i>Fusarium avenaceum</i>	W24h	Woestyne	2018	T2	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	567
					ITS	ITS1F/ITS4	462
<i>Trichoderma tomentosum</i>	W25a	Woestyne	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	549
<i>Mucor hiemalis</i>	W25b	Woestyne	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	507
<i>Fusarium oxysporum</i>	W25e	Woestyne	2018	T2	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	575
<i>Fusarium oxysporum</i>	W25f	Woestyne	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	458
					EF	Fa/Ra	480
<i>Clonostachys</i> sp.	W25g	Woestyne	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	497
					<i>TEF1</i>	EF1-728F/EF2	383
<i>Pythium terrestris</i>	W31a	Woestyne	2018	T3	ITS	1389F/ITS4ngsUni	833
					<i>COX1</i>	Fm85/Levup	548
<i>Clonostachys rosea</i>	W31c	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	492
					<i>TEF1</i>	EF1-728F/EF2	376
<i>Fusarium solani</i>	W31d	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	636
<i>Fusarium solani</i>	W31e	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	636
<i>Fusarium oxysporum</i>	W31f	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	584
<i>Clonostachys rosea</i>	W31g	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	477
					<i>TEF1</i>	EF1-728F/EF2	388
<i>Fusarium tricinctum</i>	W31h	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	608
<i>Mortierella elongata</i>	W31i	Woestyne	2018	T3	ITS	1389F/ITS4ngsUni	684
<i>Fusarium oxysporum</i>	W31j	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	583
<i>Fusarium oxysporum</i>	W31k	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	591
<i>Alternaria</i> sp.	W31l	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	491
<i>Mortierella</i> sp.	W32a	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	526
<i>Fusarium solani</i>	W32b	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	631
<i>Fusarium oxysporum</i>	W32d	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	584
<i>Fusarium solani</i>	W32e	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	474
					<i>TEF1</i>	EF1/EF2	628

## Annexe 2 : Supplementary data - Chapitre III

<i>Fusarium solani</i>		W32f	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	641	
<i>Fusarium oxysporum</i>		W33a	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	572	
<i>Alternaria</i> sp.		W33b	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	517	
<i>Fusarium oxysporum</i>		W33c	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	459	
						<i>TEF1</i>	Fa/Ra	496	
<i>Alternaria infectoria</i>		W33d	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	554	
<i>Pythium heterothallicum</i> or <i>P. glomeratum</i>		W33e	Woestyne	2018	T3	ITS	1389F/ITS4ngsUni	919	
<i>Fusarium solani</i>		W33f	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	635	
<i>Clonostachys rosea</i>		W33g	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	469	
						<i>TEF1</i>	EF1-728F/EF2	368	
<i>Fusarium solani</i>		W33h	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	638	
<i>Fusarium oxysporum</i>		W33i	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	584	
<i>Fusarium solani</i>		W33k	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	442	
						<i>TEF1</i>	Fa/Ra	498	
<i>Fusarium solani</i>		W34b	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	624	
<i>Fusarium solani</i>		W34c	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	648	
<i>Fusarium solani</i>		W34d	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	644	
<i>Trichoderma velutinum</i>		W34e	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	537	
<i>Corynespora</i> sp.		W34f	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	457	
<i>Pythium terrestris</i>		W35a	Woestyne	2018	T3	ITS	1389F/ITS4ngsUni	994	
						<i>COX1</i>	Levup	717	
<i>Pythium intermedium</i>		W35b	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS6/ITS4	856	
						<i>COX1</i>	Fm85/Levup	676	
<i>Fusarium oxysporum</i>		W35d	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	617	
<i>Fusarium oxysporum</i>		W35e	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	604	
<i>Fusarium oxysporum</i>		W35f	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	571	
<i>Fusarium oxysporum</i>		W35g	Woestyne	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	485	
						<i>TEF1</i>	EF1/EF2	610	
<i>Fusarium oxysporum</i>	MIAE07694	W35h	Woestyne	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	604	<a href="#">MW694293.1</a>
<i>Fusarium solani</i>		O11a	Ormelets	2018	T1	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	644	
<i>Mortierella alpina</i>		O11b	Ormelets	2018	T1	ITS	1389F/ITS4ngsUni	649	
<i>Mortierella alpina</i>		O11c	Ormelets	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	563	
<i>Fusarium redolens</i>		O12a	Ormelets	2018	T1	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	639	
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>		O12b	Ormelets	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	490	
<i>Clonostachys rosea</i>		O12c	Ormelets	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	458	
						<i>TEF1</i>	EF1/EF2	565	
<i>Fusarium solani</i>		O12d	Ormelets	2018	T1	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	632	
<i>Mortierella alpina</i>		O12e	Ormelets	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	589	
<i>Fusarium oxysporum</i>		O12f	Ormelets	2018	T1	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	619	

## Annexe 2 : Supplementary data - Chapitre III

<i>Mortierella alpina</i>	O12g	Ormelets	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	630		
<i>Fusarium solani</i>	O13a	Ormelets	2018	T1	TEF1	EF1/EF2	626		
<i>Fusarium solani</i>	O13b	Ormelets	2018	T1	TEF1	EF1/EF2	629		
<i>Fusarium solani</i>	O13d	Ormelets	2018	T1	TEF1	EF1/EF2	613		
<i>Clonostachys rosea</i>	O13e	Ormelets	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	496		
					TEF1	EF1-728F/EF2	379		
<i>Fusarium oxysporum</i>	O13f	Ormelets	2018	T1	TEF1	EF1/EF2	592		
<i>Fusarium solani</i>	O14a	Ormelets	2018	T1	TEF1	EF1/EF2	638		
<i>Fusarium redolens</i>	O14b	Ormelets	2018	T1	TEF1	EF1/EF2	634		
<i>Mortierella alpina</i>	O14c	Ormelets	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	527		
<i>Mortierella alpina</i>	O14d	Ormelets	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	456		
<i>Fusarium oxysporum</i>	O15a	Ormelets	2018	T1	TEF1	EF1/EF2	606		
<i>Fusarium solani</i>	O15b	Ormelets	2018	T1	TEF1	EF1/EF2	572		
<i>Mortierella alpina</i>	O15c	Ormelets	2018	T1	ITS	1389F/ITS4ngsUni	716		
<i>Chaetomiaceae</i> sp.	O15d	Ormelets	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	532		
<i>Mortierella alpina</i>	O15e	Ormelets	2018	T1	ITS	ITS1F/ITS4	573		
<i>Fusarium oxysporum</i>	O21a	Ormelets	2018	T2	TEF1	EF1/EF2	557		
<i>Pythium</i> sp.	O21b	Ormelets	2018	T2	ITS	ITS6/ITS4	816		
					COX1	Fm85/Levup	427		
					COX1	Levup	723		
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	O21d	Ormelets	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	462		
<i>Fusarium redolens</i>	O21e	Ormelets	2018	T2	TEF1	EF1/EF2	622		
<i>Fusarium solani</i>	MIAE07703	O22a	Ormelets	2018	T2	TEF1	EF1/EF2	620	<a href="#">MW694302.1</a>
<i>Clonostachys rhizophaga</i>	O22b	Ormelets	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	474		
					TEF1	EF1-728F/EF2	379		
<i>Clonostachys rosea</i>	O22c	Ormelets	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	493		
					TEF1	EF1/EF2	605		
<i>Fusarium oxysporum</i>	O22d	Ormelets	2018	T2	TEF1	EF1/EF2	621		
<i>Pythium amasculinum</i> or <i>P. hydnosporum</i>	O22e	Ormelets	2018	T2	ITS	1389F/ITS4ngsUni	896		
					COX1	Fm85/Levup	653		
<i>Fusarium solani</i>	O23a	Ormelets	2018	T2	TEF1	EF1/EF2	620		
<i>Fusarium oxysporum</i>	MIAE07695	O23b	Ormelets	2018	T2	TEF1	EF1/EF2	619	<a href="#">MW694294.1</a>
<i>Pythium</i> sp.	O23c	Ormelets	2018	T2	ITS	ITS6/ITS4	889		
					COX1	Fm85/Levup	650		
<i>Clonostachys rhizophaga</i>	O23d	Ormelets	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	466		
					TEF1	EF1/EF2	575		
<i>Fusarium solani</i>	O24a	Ormelets	2018	T2	TEF1	EF1/EF2	636		
<i>Fusarium solani</i>	O24b	Ormelets	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	482		
					TEF1	EF1-728F/EF2	436		
<i>Fusarium oxysporum</i>	O24c	Ormelets	2018	T2	TEF1	EF1/EF2	608		
<i>Mucor hiemalis</i>	O24d	Ormelets	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	520		
<i>Mortierella elongata</i>	O24e	Ormelets	2018	T2	ITS	1389F/ITS4ngsUni	653		
					ITS	ITS1F/ITS4	417		
<i>Clonostachys rhizophaga</i>	O25a	Ormelets	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	500		
					TEF1	EF1-728F/EF2	374		
<i>Fusarium oxysporum</i>	O25b	Ormelets	2018	T2	TEF1	EF1/EF2	617		
<i>Fusarium oxysporum</i>	O25c	Ormelets	2018	T2	TEF1	EF1/EF2	603		
<i>Mortierella elongata</i>	O25d	Ormelets	2018	T2	ITS	ITS1F/ITS4	491		
<i>Pythium oligandrum</i>	O31a	Ormelets	2018	T3	ITS	1389F/ITS4ngsUni	868		
					COX1	Fm85/Levup	673		
<i>Clonostachys rhizophaga</i>	O31b	Ormelets	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	452		
					TEF1	EF1-728F/EF2	402		
<i>Fusarium solani</i>	O31c	Ormelets	2018	T3	TEF1	EF1/EF2	613		
<i>Fusarium oxysporum</i>	O31d	Ormelets	2018	T3	TEF1	EF1/EF2	616		
<i>Fusarium solani</i>	O31e	Ormelets	2018	T3	TEF1	EF1/EF2	626		
<i>Fusarium redolens</i>	O31f	Ormelets	2018	T3	TEF1	EF1/EF2	630		
<i>Fusarium oxysporum</i>	O31g	Ormelets	2018	T3	TEF1	EF1/EF2	621		
<i>Pythium amasculinum</i> or <i>P. hydnosporum</i>	O32a	Ormelets	2018	T3	ITS	1389F/ITS4ngsUni	873		
					COX1	Fm85/Levup	672		
<i>Mortierella alpina</i>	O32b	Ormelets	2018	T3	ITS	1389F/ITS4ngsUni	671		

## Annexe 2 : Supplementary data - Chapitre III

<i>Fusarium oxysporum</i>		O32d	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	616	
<i>Absidia glauca</i>		O32e	Ormelets	2018	T3	LSU_D1D2	LR5/LROR	954	
						ITS	ITS5/ITS4	565	
<i>Fusarium oxysporum</i>		O32f	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	618	
<i>Pythium</i> sp.		O33a	Ormelets	2018	T3	ITS	ITS6/ITS4	913	
						<i>COX1</i>	Fm85/Levup	683	
<i>Clonostachys rhizophaga</i>		O33b	Ormelets	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	526	
						<i>TEF1</i>	EF1-728F/EF2	375	
<i>Fusarium redolens</i>		O33c	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	635	
<i>Fusarium redolens</i>	MIAE07699	O33d	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	640	<a href="#">MW694298.1</a>
<i>Fusarium redolens</i>		O33e	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	632	
<i>Fusarium oxysporum</i>		O33f	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	628	
<i>Trichoderma velutinum</i>		O33g	Ormelets	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	562	
<i>Fusarium redolens</i>		O34b	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	634	
<i>Fusarium solani</i>		O34c	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	644	
<i>Fusarium oxysporum</i>		O34d	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	617	
<i>Fusarium redolens</i>		O34e	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	639	
<i>Fusarium oxysporum</i>		O34f	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	619	
<i>Clonostachys rhizophaga</i>		O34g	Ormelets	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	531	
						<i>TEF1</i>	EF1-728F/EF2	425	
<i>Fusarium redolens</i>		O34h	Ormelets	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	486	
						<i>TEF1</i>	Fa/Ra	497	
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>		O35b	Ormelets	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	516	
<i>Clonostachys rhizophaga</i>		O35c	Ormelets	2018	T3	ITS	ITS1F/ITS4	536	
						<i>TEF1</i>	EF1-728F/EF2	376	
<i>Clonostachys rhizophaga</i>		O35d	Ormelets	2018	T3	LSU_D1D2	LR5/LROR	817	
						ITS	ITS5/ITS4	513	
						<i>TEF1</i>	EF1-728F/EF2	432	
<i>Fusarium redolens</i>		O35e	Ormelets	2018	T3	LSU_D1D2	LR5/LROR	824	
						ITS	ITS5/ITS4	494	
						<i>TEF1</i>	Fa/Ra	506	
<i>Fusarium oxysporum</i>		O35f	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	624	
<i>Fusarium solani</i>		O35g	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	646	
<i>Fusarium oxysporum</i>		O35h	Ormelets	2018	T3	<i>TEF1</i>	EF1/EF2	623	

<sup>a</sup> MIAE: microorganisms of interest for agriculture and environment, INRAE, Dijon

<sup>c</sup> /: not applicable

<sup>b</sup> *TEF1*: translation elongation factor 1- $\alpha$  gene; ITS: internal transcribed spacer; LSU\_D1D2: D1-D2 region of the large subunit (LSU) ribosomal gene; *COX1*: cytochrome c oxidase subunit I gene

**Supplementary data 3.** Dry biomass of the hosts plants for each inoculated isolate obtained in the in vitro pathogenicity tests and comparison with the negative control inoculated with water (Dunnett post hoc test, ns: non-significant, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Isolate	Plant dry biomass (mg)	Dunnett t test		
	Mean $\pm$ sd	stat.	p. values	Signif.
<i>Absidia coerulea</i> 59b	54.3 $\pm$ 11.5	-0.85	0.997	ns
<i>Absidia glauca</i> 36b	39.4 $\pm$ 14.2	-4.44	0	***
<i>Absidia glauca</i> 38e	71.1 $\pm$ 9.6	1.07	0.952	ns
<i>Absidia glauca</i> 98c	55.1 $\pm$ 6.9	-1.04	0.996	ns
<i>Absidia glauca</i> O32e	43.4 $\pm$ 5.3	-0.35	1	ns
<i>Alternaria infectoria</i> W33d	43.3 $\pm$ 11.7	-0.35	1	ns
<i>Acremonium sclerotigenum</i> W16c	46.5 $\pm$ 11	-0.88	0.953	ns
<i>Adustoporia sinuosa</i> 98e	44.2 $\pm$ 8.4	-1.18	0.919	ns
<i>Amyloporia xantha</i> 59e	58.9 $\pm$ 18.1	-0.22	1	ns
<i>Agaricomycetes</i> sp. 157f	47 $\pm$ 9.4	-2.79	0.092	ns
<i>Agaricomycetes</i> sp. 180e	53.9 $\pm$ 11.1	-1.98	0.372	ns
<i>Agaricomycetes</i> sp. 48d	60 $\pm$ 8	0.45	1	ns
<i>Alternaria</i> sp. W15h	48.5 $\pm$ 7	-0.37	1	ns
<i>Alternaria</i> sp. W31l	41.3 $\pm$ 7.9	-2.02	0.422	ns
<i>Alternaria</i> sp. W33b	43.9 $\pm$ 8.8	-0.22	1	ns
<i>Baltazaria. galactina</i> 49e	47 $\pm$ 7.8	-2.51	0.136	ns
<i>Baltazaria. galactina</i> 77g	47.7 $\pm$ 9.9	-2.64	0.133	ns
<i>Clonostachys rhizophaga</i> 146e	32.3 $\pm$ 5.9	-4.01	0.001	**
<i>Clonostachys rhizophaga</i> 17b	53.2 $\pm$ 4.4	-2.15	0.271	ns
<i>Clonostachys rhizophaga</i> O22b	36.5 $\pm$ 3.6	-3.39	0.015	*
<i>Clonostachys rhizophaga</i> O23d	35.6 $\pm$ 7.1	-3.61	0.007	**
<i>Clonostachys rhizophaga</i> O25a	26.7 $\pm$ 7	-5.85	0	***
<i>Clonostachys rhizophaga</i> O31b	18.5 $\pm$ 12.8	-5.43	0	***
<i>Clonostachys rhizophaga</i> O33b	22.1 $\pm$ 9.4	-4.87	0	***
<i>Clonostachys rhizophaga</i> O34g	16.6 $\pm$ 8.6	-5.4	0	***
<i>Clonostachys rhizophaga</i> O35c	16.5 $\pm$ 10.9	-5.42	0	***
<i>Clonostachys rhizophaga</i> O35d	19.2 $\pm$ 12.2	-4.83	0	***
<i>Clonostachys rosea</i> 168b	50.1 $\pm$ 6.7	0.21	1	ns
<i>Clonostachys rosea</i> 206d	40.4 $\pm$ 6.5	-2.09	0.302	ns
<i>Clonostachys rosea</i> O12c	38 $\pm$ 7.9	-3	0.046	*
<i>Clonostachys rosea</i> O13e	44.8 $\pm$ 7.3	-1.28	0.926	ns
<i>Clonostachys rosea</i> O22c	33 $\pm$ 15.1	-2.6	0.096	ns
<i>Clonostachys rosea</i> W21h	44.8 $\pm$ 14.6	-0.38	1	ns
<i>Clonostachys rosea</i> W22g	41.1 $\pm$ 8	-1.13	0.989	ns
<i>Clonostachys rosea</i> W24e	45.2 $\pm$ 8.7	-1.29	0.953	ns
<i>Clonostachys rosea</i> W31c	52.6 $\pm$ 9.3	1.29	0.955	ns
<i>Clonostachys rosea</i> W31g	49.8 $\pm$ 4.3	0.66	1	ns
<i>Clonostachys rosea</i> W33g	44 $\pm$ 8.2	-0.56	1	ns

<i>Chaetomiaceae</i> sp. O15d	22.5 ± 6.2	-4.8	0	***
<i>Chaetomium</i> sp. W13a	35.2 ± 6.5	-0.1	1	ns
<i>Chaetomium</i> sp. W13b	40.5 ± 8.9	1.11	0.931	ns
<i>Clonostachys</i> sp. 60b	52.1 ± 4.9	-2.41	0.162	ns
<i>Clonostachys</i> sp. W25g	46.6 ± 3.2	-0.82	1	ns
<i>Corynespora</i> sp. W34f	40.8 ± 7.2	-2.15	0.336	ns
<i>Didymellaceae</i> sp. 148b	30.2 ± 14.6	-5.57	0	***
<i>Epicoccum nigrum</i> 148d	49.7 ± 6.4	-4.8	0	***
<i>Epicoccum nigrum</i> 160b	55.4 ± 6.8	-3.23	0.019	*
<i>Fusarium avenaceum</i> 104a	23.6 ± 9.5	-2.75	0.067	ns
<i>Fusarium avenaceum</i> 166c	18.2 ± 7.1	-8.26	0	***
<i>Fusarium avenaceum</i> 75b	35.2 ± 7.1	-6.5	0	***
<i>Fusarium avenaceum</i> W21c	38 ± 12.6	-2.78	0.087	ns
<i>Fusarium avenaceum</i> W22j	42 ± 9.9	-0.98	0.998	ns
<i>Fusarium avenaceum</i> W24h	38.9 ± 9.9	-2.49	0.172	ns
<i>Fusarium culmorum</i> 150c	50.7 ± 10.3	-2.93	0.049	*
<i>Fusarium culmorum</i> W22f	28.6 ± 5.8	-4.95	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 106b	36.9 ± 8.2	-4.99	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 110b	35.8 ± 14.3	-4.18	0.001	**
<i>Fusarium oxysporum</i> 117e	39.4 ± 7.3	-4.1	0.001	**
<i>Fusarium oxysporum</i> 119b	32 ± 8.3	-7.23	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 127d	19.9 ± 8.2	-8.16	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 136b	30.5 ± 12.6	-4.44	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 136e	37.2 ± 10.1	0.36	1	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> 146a	51.4 ± 9.5	-2.57	0.113	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> 156b	31.5 ± 8.2	-6.14	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 158a	23.8 ± 10.8	-7.8	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 166a	43 ± 6	-3.67	0.007	**
<i>Fusarium oxysporum</i> 16a	34.1 ± 6.1	-9.05	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 178c	43.4 ± 12.8	-1.47	0.81	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> 186a	25.7 ± 9.7	-6.24	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 186b	32.3 ± 11.3	-5.04	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 186g	34.3 ± 9	-4.55	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 196a	21.6 ± 7.3	-7.73	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 197c	39 ± 10.1	-3.36	0.018	*
<i>Fusarium oxysporum</i> 218d	20.5 ± 5.7	-8.02	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 26b	40.4 ± 6.1	-5.31	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 29a	44.6 ± 6.9	-3.05	0.035	*
<i>Fusarium oxysporum</i> 36a	50.7 ± 10.1	-1.67	0.622	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> 38a	41.9 ± 5.8	-6.92	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 46a	43.7 ± 5.1	-3.39	0.017	*
<i>Fusarium oxysporum</i> 50e	46 ± 8.7	-4.01	0.002	**
<i>Fusarium oxysporum</i> 6a	52.1 ± 4	-2.39	0.168	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> 76b	37.3 ± 10	-8.19	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 79b	59.9 ± 6.7	-0.59	1	ns

<i>Fusarium oxysporum</i> 79f	43.4 ± 4.3	-3.45	0.014	*
<i>Fusarium oxysporum</i> 80a	33 ± 12.7	-0.6	1	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> 86b	35.3 ± 6.7	-3.3	0.016	*
<i>Fusarium oxysporum</i> 86c	46.4 ± 7.8	-2.93	0.064	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> 8b	40.3 ± 4	-5.33	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> 96a	38.3 ± 14.2	-2.58	0.108	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> O12f	27.3 ± 5.1	-5.71	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> O13f	46.6 ± 9.9	-0.83	0.999	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> O15a	50.9 ± 8.5	0.27	1	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> O21a	48 ± 2.5	2.83	0.055	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> O22d	19.1 ± 4.5	-7.78	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> O23b	12.8 ± 4	-6.82	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> O24c	22.2 ± 6	-7	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> O25b	26.3 ± 6.4	-4.48	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> O25c	37.3 ± 11.1	-3.08	0.038	*
<i>Fusarium oxysporum</i> O31d	20.5 ± 9	-5.69	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> O31g	28.7 ± 9.3	-3.9	0.002	**
<i>Fusarium oxysporum</i> O32d	16.2 ± 5	-6.93	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> O32f	27.4 ± 9	-4.22	0.001	***
<i>Fusarium oxysporum</i> O33f	10.4 ± 5.6	-6.82	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> O34d	18.6 ± 8.5	-4.95	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> O34f	36.7 ± 6	-0.85	0.995	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> O35f	16.1 ± 10.3	-5.51	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> O35h	21.7 ± 6.1	-5.61	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> W12a	43 ± 8.1	-1.94	0.509	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> W15b	39.7 ± 7.6	-2.85	0.08	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> W21a	15.9 ± 4.7	-4.35	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> W22d	44.2 ± 12.2	-1.62	0.768	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> W23b	29.6 ± 9.7	-4.72	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> W24d	25.5 ± 9.9	-6.77	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> W25e	20.6 ± 4.7	-8.11	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> W25f	35.3 ± 11.7	-3.41	0.014	*
<i>Fusarium oxysporum</i> W31f	30.9 ± 9.5	-3.37	0.019	*
<i>Fusarium oxysporum</i> W31j	27.5 ± 5.6	-4.09	0.002	**
<i>Fusarium oxysporum</i> W31k	39.6 ± 14.9	-1.49	0.86	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> W32d	46.6 ± 13.3	0	1	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> W33a	26.7 ± 4.7	-3.95	0.003	**
<i>Fusarium oxysporum</i> W33c	27.4 ± 9.4	-4.1	0.001	**
<i>Fusarium oxysporum</i> W33i	40.6 ± 11.5	-1.29	0.955	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> W35d	25.1 ± 7.6	-4.61	0	***
<i>Fusarium oxysporum</i> W35e	30.7 ± 15.6	-3.4	0.017	*
<i>Fusarium oxysporum</i> W35f	50 ± 4.5	0.73	1	ns
<i>Fusarium oxysporum</i> W35g	34.7 ± 9.9	-3.55	0.009	**
<i>Fusarium oxysporum</i> W35h	24.3 ± 3.1	-5.94	0	***
<i>Fusarium poae</i> 128a	52 ± 4.9	-2.63	0.103	ns



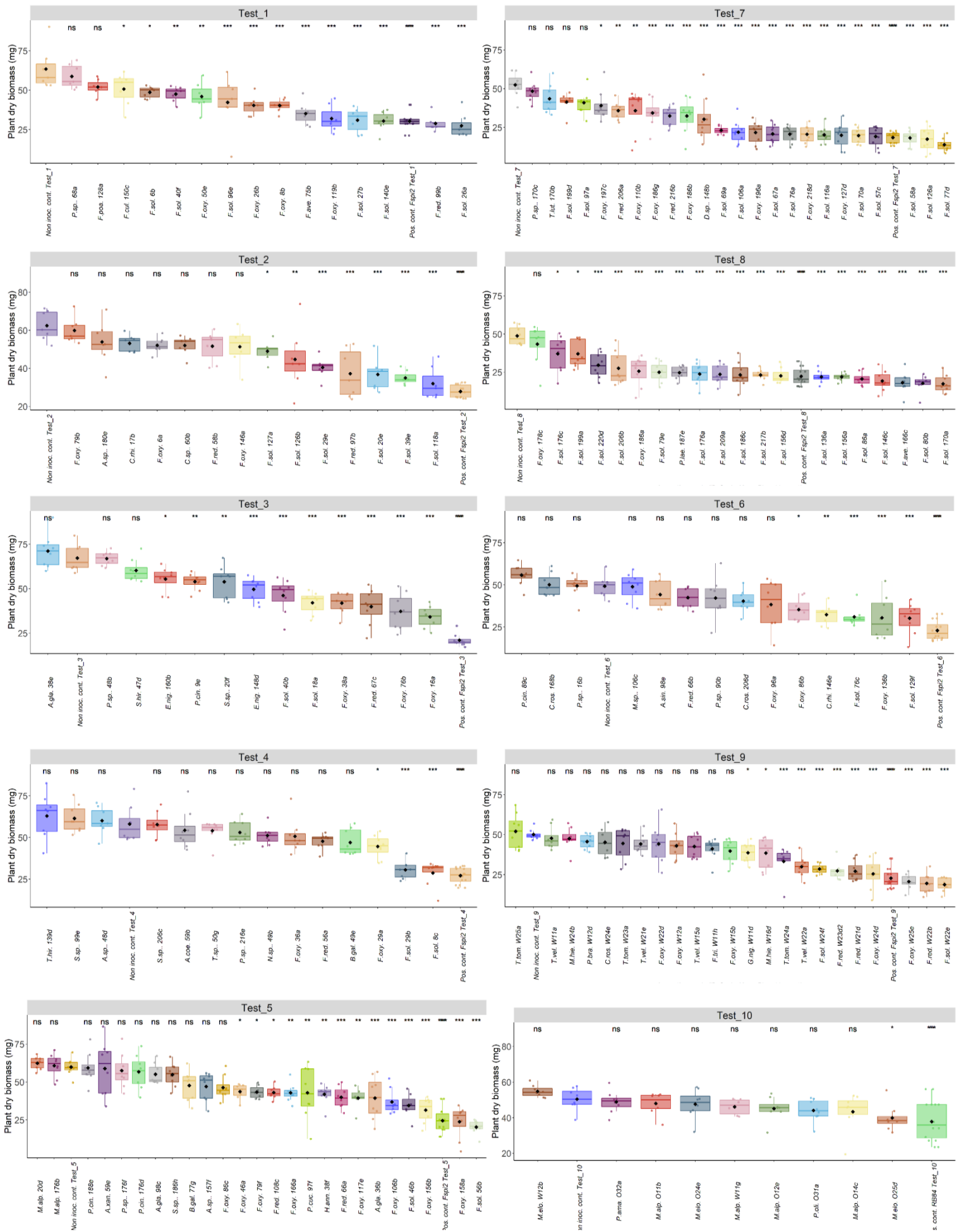
<i>Fusarium redolens</i> 108c	43.1 ± 4.3	-3.51	0.011	*
<i>Fusarium redolens</i> 206a	35.8 ± 5.7	-4.18	0.001	**
<i>Fusarium redolens</i> 216b	32.3 ± 6.2	-5.04	0	***
<i>Fusarium redolens</i> 56a	47.7 ± 4.5	-2.34	0.201	ns
<i>Fusarium redolens</i> 58b	51.7 ± 7.9	-2.5	0.133	ns
<i>Fusarium redolens</i> 66a	40 ± 7.1	-4.31	0.001	***
<i>Fusarium redolens</i> 66b	42.4 ± 5.7	-1.62	0.63	ns
<i>Fusarium redolens</i> 67c	39.9 ± 10	-7.46	0	***
<i>Fusarium redolens</i> 97b	37.2 ± 12.6	-5.85	0	***
<i>Fusarium redolens</i> 99b	28.8 ± 5	-7.96	0	***
<i>Fusarium redolens</i> O12a	16.1 ± 6.4	-8.55	0	***
<i>Fusarium redolens</i> O14b	21.5 ± 11.8	-5.01	0	***
<i>Fusarium redolens</i> O21e	18.7 ± 3.1	-7.89	0	***
<i>Fusarium redolens</i> O31f	35.1 ± 17	-3.6	0.008	**
<i>Fusarium redolens</i> O33c	13.5 ± 5.5	-7.6	0	***
<i>Fusarium redolens</i> O33d	40.4 ± 8.9	-1.07	0.959	ns
<i>Fusarium redolens</i> O33e	32.5 ± 8.9	-2.97	0.041	*
<i>Fusarium redolens</i> O34b	8.7 ± 4	-7.19	0	***
<i>Fusarium redolens</i> O34e	29.7 ± 14	-2.45	0.148	ns
<i>Fusarium redolens</i> O34h	16.1 ± 13.5	-5.53	0	***
<i>Fusarium redolens</i> O35e	23.9 ± 10	-3.74	0.004	**
<i>Fusarium redolens</i> W21d	27.1 ± 6.2	-6.31	0	***
<i>Fusarium redolens</i> W22b	19.5 ± 6.2	-8.42	0	***
<i>Fusarium redolens</i> W23d2	27.3 ± 5.5	-6.25	0	***
<i>Fusarium solani</i> 106a	21.9 ± 7.7	-7.66	0	***
<i>Fusarium solani</i> 116a	20.1 ± 5.5	-8.1	0	***
<i>Fusarium solani</i> 118a	32 ± 8.4	-7.06	0	***
<i>Fusarium solani</i> 126a	17.4 ± 8.4	-8.79	0	***
<i>Fusarium solani</i> 126b	44.8 ± 16.1	-4.1	0.001	**
<i>Fusarium solani</i> 127a	49 ± 5	-3.13	0.027	*
<i>Fusarium solani</i> 129f	30.2 ± 9.3	-4.5	0	***
<i>Fusarium solani</i> 136a	21.9 ± 4.1	-7.25	0	***
<i>Fusarium solani</i> 140e	30.4 ± 6.2	-7.6	0	***
<i>Fusarium solani</i> 146c	19.3 ± 6.6	-7.96	0	***
<i>Fusarium solani</i> 156a	21.9 ± 2.4	-7.25	0	***
<i>Fusarium solani</i> 156d	22.6 ± 5	-7.06	0	***
<i>Fusarium solani</i> 166b	31.7 ± 7.2	-0.89	0.986	ns
<i>Fusarium solani</i> 170a	17.4 ± 6.1	-8.48	0	***
<i>Fusarium solani</i> 176a	23.9 ± 7.5	-6.73	0	***
<i>Fusarium solani</i> 176c	37.1 ± 11.8	-3.16	0.029	*
<i>Fusarium solani</i> 186c	23.3 ± 8.5	-6.88	0	***
<i>Fusarium solani</i> 18a	42.1 ± 6.1	-6.88	0	***
<i>Fusarium solani</i> 199a	37.1 ± 8.8	-3.17	0.028	*
<i>Fusarium solani</i> 199d	41.3 ± 5.9	-2.79	0.091	ns
<i>Fusarium solani</i> 206b	27.6 ± 10.9	-5.73	0	***

<i>Fusarium solani</i> 209a	23.6 ± 6.3	-6.79	0	***
<i>Fusarium solani</i> 20e	36.8 ± 8.3	-5.94	0	***
<i>Fusarium solani</i> 217b	23.2 ± 3.6	-6.9	0	***
<i>Fusarium solani</i> 220d	29.6 ± 8.2	-5.17	0	***
<i>Fusarium solani</i> 26a	27.4 ± 7.6	-8.29	0	***
<i>Fusarium solani</i> 27b	30.9 ± 7.5	-7.48	0	***
<i>Fusarium solani</i> 29b	30.6 ± 5.4	-6.22	0	***
<i>Fusarium solani</i> 29e	40.5 ± 5.4	-5.1	0	***
<i>Fusarium solani</i> 39e	35 ± 3.7	-6.36	0	***
<i>Fusarium solani</i> 40b	46.2 ± 9.7	-5.76	0	***
<i>Fusarium solani</i> 40f	47.6 ± 4.8	-3.65	0.005	**
<i>Fusarium solani</i> 46b	34.5 ± 8	-5.31	0	***
<i>Fusarium solani</i> 56b	20.3 ± 4.6	-8.57	0	***
<i>Fusarium solani</i> 57c	19.1 ± 6.7	-8.36	0	***
<i>Fusarium solani</i> 58a	18.2 ± 5	-8.6	0	***
<i>Fusarium solani</i> 67a	20.8 ± 6.1	-7.94	0	***
<i>Fusarium solani</i> 69a	23 ± 2.4	-7.37	0	***
<i>Fusarium solani</i> 6b	48.7 ± 3.7	-3.39	0.013	*
<i>Fusarium solani</i> 70a	19.7 ± 5.2	-8.22	0	***
<i>Fusarium solani</i> 76a	20.6 ± 5.5	-7.99	0	***
<i>Fusarium solani</i> 76c	31 ± 5.6	-4.31	0	***
<i>Fusarium solani</i> 77d	13.7 ± 4.1	-9.7	0	***
<i>Fusarium solani</i> 79e	25 ± 6.6	-6.41	0	***
<i>Fusarium solani</i> 80b	17.7 ± 5.6	-8.39	0	***
<i>Fusarium solani</i> 86a	20.6 ± 4.3	-7.6	0	***
<i>Fusarium solani</i> 8c	28.7 ± 7.6	-6.65	0	***
<i>Fusarium solani</i> 96e	42.3 ± 17.2	-4.87	0	***
<i>Fusarium solani</i> 97a	40.9 ± 7.8	-2.89	0.071	Ns
<i>Fusarium solani</i> O11a	26.8 ± 12.3	-5.83	0	***
<i>Fusarium solani</i> O12d	21.8 ± 8.9	-7.1	0	***
<i>Fusarium solani</i> O13a	19.4 ± 4.1	-7.71	0	***
<i>Fusarium solani</i> O13b	19 ± 5.6	-5.53	0	***
<i>Fusarium solani</i> O13d	18 ± 5.6	-5.73	0	***
<i>Fusarium solani</i> O14a	15.5 ± 10.3	-6.25	0	***
<i>Fusarium solani</i> O15b	35.2 ± 6.6	-0.09	1	Ns
<i>Fusarium solani</i> O22a	12.7 ± 2.1	-6.83	0	***
<i>Fusarium solani</i> O23a	18 ± 3.8	-8.06	0	***
<i>Fusarium solani</i> O24a	21.5 ± 5.2	-7.18	0	***
<i>Fusarium solani</i> O24b	30.5 ± 14.3	-3.13	0.024	*
<i>Fusarium solani</i> O31c	14.4 ± 7.3	-6.48	0	***
<i>Fusarium solani</i> O31e	17.7 ± 9	-6.57	0	***
<i>Fusarium solani</i> O34c	14.8 ± 8.8	-5.81	0	***
<i>Fusarium solani</i> O35g	21.2 ± 3.6	-4.37	0	***
<i>Fusarium solani</i> W22e	18.8 ± 4.4	-8.61	0	***
<i>Fusarium solani</i> W24f	28.5 ± 3.1	-5.93	0	***

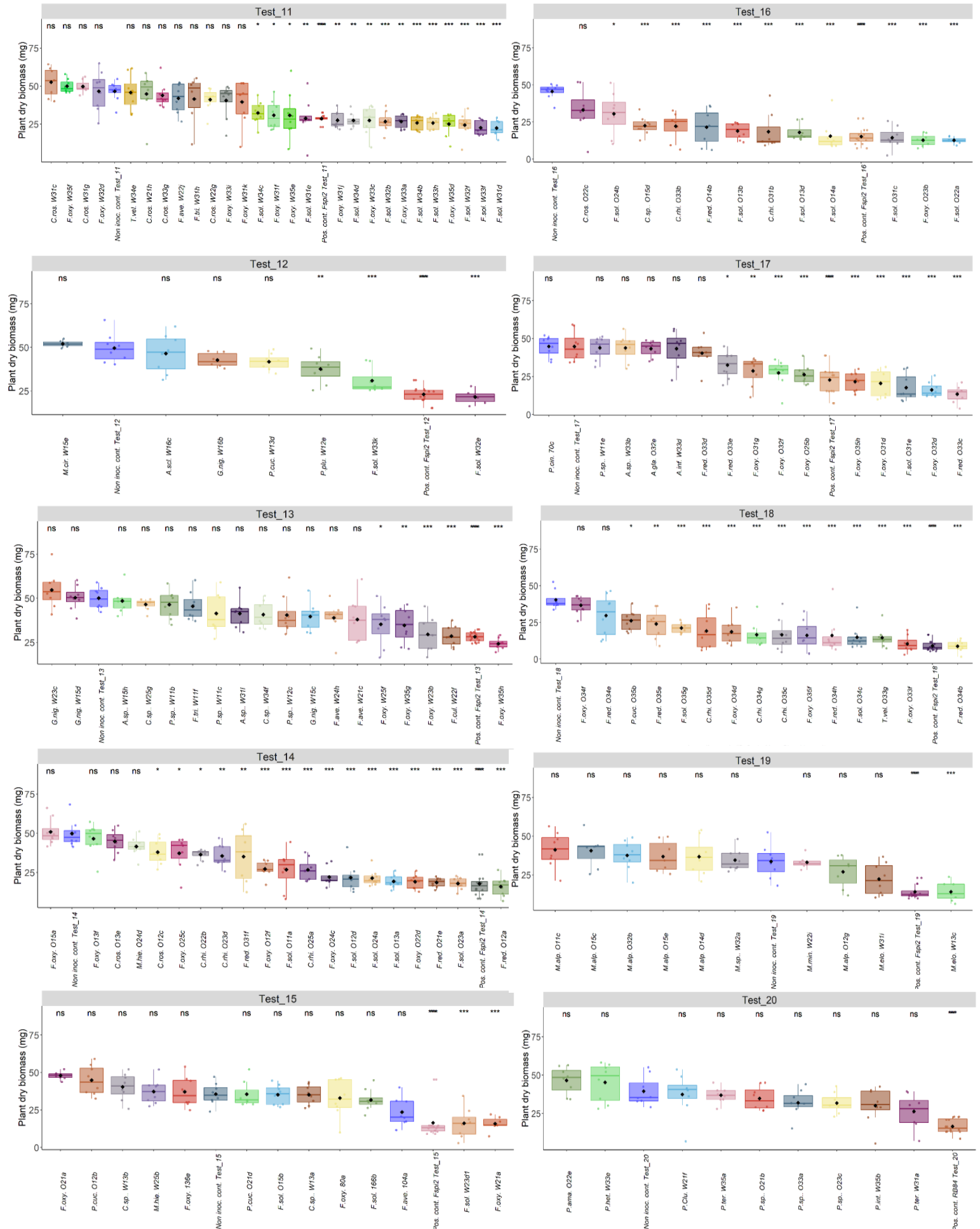
<i>Fusarium solani</i> W31d	22.4 ± 5.3	-5	0	***
<i>Fusarium solani</i> W31e	28.8 ± 13.2	-3.8	0.004	**
<i>Fusarium solani</i> W32b	26.7 ± 6.5	-4.26	0.001	***
<i>Fusarium solani</i> W32e	21.5 ± 4.1	-7.27	0	***
<i>Fusarium solani</i> W32f	24.4 ± 7.9	-4.75	0	***
<i>Fusarium solani</i> W33f	22.6 ± 4.8	-5.14	0	***
<i>Fusarium solani</i> W33h	25.7 ± 4.3	-4.47	0	***
<i>Fusarium solani</i> W33k	30.9 ± 7.3	-5.23	0	***
<i>Fusarium solani</i> W34b	25.8 ± 4.6	-4.45	0	***
<i>Fusarium solani</i> W34c	32.4 ± 7.7	-3.04	0.048	*
<i>Fusarium solani</i> W34d	27.4 ± 4.7	-4.1	0.001	**
<i>Fusarium solani</i> species complex W23d1	16.2 ± 10	-4.44	0	***
<i>Fusarium tricinctum</i> W11f	45.5 ± 8.2	-1.06	0.99	ns
<i>Fusarium tricinctum</i> W11h	41.1 ± 6.7	-2.46	0.199	ns
<i>Fusarium tricinctum</i> W31h	41.5 ± 16.7	-1	0.998	ns
<i>Gibullopsis nigrescens</i> W11d	38.6 ± 6.2	-3.15	0.035	*
<i>Gibullopsis nigrescens</i> W15c	39.7 ± 8	-2.4	0.205	ns
<i>Gibullopsis nigrescens</i> W15d	50.4 ± 6.9	0.06	1	ns
<i>Gibullopsis nigrescens</i> W16b	42.8 ± 4.2	-1.78	0.394	ns
<i>Gibullopsis nigrescens</i> W23c	54.7 ± 10.4	1.06	0.989	ns
<i>Heterobasidion annosum</i> 38f	42 ± 6.5	-3.88	0.003	**
<i>Mortierella alpina</i> 176b	60.8 ± 7.8	0.19	1	ns
<i>Mortierella alpina</i> 20d	62.4 ± 4.2	0.53	1	ns
<i>Mortierella alpina</i> O11b	48 ± 6	-0.66	0.995	ns
<i>Mortierella alpina</i> O11c	41.2 ± 11.6	1.67	0.545	ns
<i>Mortierella alpina</i> O12e	45.1 ± 6.6	-1.44	0.648	ns
<i>Mortierella alpina</i> O12g	27 ± 10.4	-1.43	0.731	ns
<i>Mortierella alpina</i> O14c	43.4 ± 10.5	-1.92	0.322	ns
<i>Mortierella alpina</i> O14d	36.8 ± 11.9	0.68	0.998	ns
<i>Mortierella alpina</i> O15c	40.7 ± 10.7	1.5	0.676	ns
<i>Mortierella alpina</i> O15e	36.9 ± 10.1	0.68	0.998	ns
<i>Mortierella alpina</i> O32b	37.6 ± 9.7	0.87	0.985	ns
<i>Mortierella alpina</i> W11g	46.1 ± 4.5	-1.08	0.887	ns
<i>Mucor circinelloides</i> W15e	52.1 ± 1.8	0.66	0.992	ns
<i>Mortierella elongata</i> O24e	47.6 ± 8.1	-0.77	0.985	ns
<i>Mortierella elongata</i> O25d	39.9 ± 7.3	-2.86	0.041	*
<i>Mortierella elongata</i> W12b	54.8 ± 3.3	1.18	0.831	ns
<i>Mortierella elongata</i> W13c	14.1 ± 6	-4.35	0	***
<i>Mortierella elongata</i> W31i	22.3 ± 10.3	-2.52	0.113	ns
<i>Mucor hiemalis</i> O24d	41.6 ± 6.1	-2.09	0.362	ns
<i>Mucor hiemalis</i> W16d	38.5 ± 9.7	-3.19	0.031	*
<i>Mucor hiemalis</i> W24b	47.5 ± 7	-0.69	1	ns
<i>Mucor hiemalis</i> W25b	37.3 ± 8.2	0.39	1	ns
<i>Mortierella minutissima</i> W22i	33.1 ± 4	-0.12	1	ns

<i>Meruliaceae</i> sp. 106c	48.9 ± 8.2	-0.07	1	ns
<i>Mortierella</i> sp. W32a	34.6 ± 7.1	0.19	1	ns
<i>Nectriaceae</i> sp. 49b	51.1 ± 5.5	-1.57	0.701	ns
<i>Pythium. amasculinum</i> or <i>Pythium hydnosporum</i> O22e	46.6 ± 8.8	1.48	0.663	ns
<i>Pythium. amasculinum</i> or <i>Pythium hydnosporum</i> O32a	48.9 ± 6.2	-0.43	1	ns
<i>Pythium brasilianum</i> W12d	45.7 ± 4.5	-1.21	0.974	ns
<i>Peniophora cinerea</i> 176d	56.8 ± 11.1	-0.68	1	ns
<i>Peniophora cinerea</i> 188e	59.3 ± 10.1	-0.13	1	ns
<i>Peniophora cinerea</i> 70c	44.8 ± 6.7	0.02	1	ns
<i>Peniophora cinerea</i> 89c	55.8 ± 6.3	1.57	0.671	ns
<i>Peniophora cinerea</i> 9e	53.9 ± 4.7	-3.63	0.005	**
<i>Pythium</i> Cluster B2a species complex W21f	37.4 ± 14.3	-0.45	1	ns
<i>Plectosphaerella cucumerina</i> 97f	42.9 ± 17.6	-3.68	0.006	**
<i>Plectosphaerella cucumerina</i> O12b	44.9 ± 9.9	2.12	0.27	ns
<i>Plectosphaerella cucumerina</i> O21d	35.6 ± 8.9	-0.01	1	ns
<i>Plectosphaerella cucumerina</i> O35b	26.2 ± 7.1	-3.24	0.019	*
<i>Plectosphaerella cucumerina</i> W13d	41.8 ± 4.6	-2.19	0.188	ns
<i>Pythium heterothallicum</i> or <i>Pythium glomeratum</i> W33e	45.2 ± 12.4	1.21	0.854	ns
<i>Pythium intermedium</i> W35b	30.1 ± 12	-1.98	0.318	ns
<i>Peniophora laeta</i> 187e	24.7 ± 4.4	-6.49	0	***
<i>Pythium oligandrum</i> O31a	44.1 ± 6.3	-1.72	0.445	ns
<i>Plectosphaerella plurivora</i> W12e	37.6 ± 8	-3.36	0.01	**
<i>Pythium terrestris</i> W31a	26.4 ± 11.1	-2.76	0.059	ns
<i>Pythium terrestris</i> W35a	36.9 ± 5.1	-0.55	1	ns
<i>Penicillium</i> sp. 48b	66.9 ± 3.8	-0.07	1	ns
<i>Penicillium</i> sp. 68a	58.7 ± 7.6	-1.08	0.962	ns
<i>Phanerochaetaceae</i> sp. 16b	49.4 ± 6.6	0.04	1	ns
<i>Phanerochaete</i> sp. 170c	48.4 ± 6.6	-1.02	0.996	ns
<i>Phanerochaete</i> sp. 216e	53 ± 6.8	-1.15	0.95	ns
<i>Phanerochaete</i> sp. 90b	42.2 ± 12.2	-1.66	0.6	ns
<i>Phlebia</i> sp. 176f	57.6 ± 11.4	-0.51	1	ns
<i>Pleosporales</i> sp. W12c	40.5 ± 10.7	-2.2	0.306	ns
<i>Pseudeurotium</i> sp. W11b	46.4 ± 8	-0.85	0.999	ns
<i>Pseudeurotium</i> sp. W11c	41.4 ± 11.2	-2	0.435	ns
<i>Pseudeurotium</i> sp. W11e	43.9 ± 7.3	-0.22	1	ns
<i>Pythium</i> sp. O21b	34.8 ± 7.7	-1	0.95	ns
<i>Pythium</i> sp. O23c	31.8 ± 6.6	-1.62	0.555	ns
<i>Pythium</i> sp. O33a	32 ± 8.6	-1.58	0.588	ns

<i>S. hirsutum</i> 47d	60.2 ± 6.3	-1.92	0.398	ns
<i>Stereum</i> sp. 186h	54.9 ± 7.8	-1.09	0.991	ns
<i>Stereum</i> sp. 206c	57.8 ± 7.5	-0.07	1	ns
<i>Stereum</i> sp. 20f	53.9 ± 9	-3.65	0.005	**
<i>Stereum</i> sp. 99e	61.4 ± 8.3	0.76	0.999	ns
<i>Trametes hirsuta</i> 139d	62.9 ± 13.2	1.09	0.967	ns
<i>Trichoderma luteocrystallinum</i> 170b	43.5 ± 9.2	-2.26	0.293	ns
<i>Trichoderma tomentosum</i> W23a	44.5 ± 10.1	-1.53	0.829	ns
<i>Trichoderma tomentosum</i> W24a	33.2 ± 9.4	-4.63	0	***
<i>Trichoderma tomentosum</i> W25a	52 ± 10.9	0.54	1	ns
<i>Trichoderma velutinum</i> O33g	14.6 ± 6.9	-5.86	0	***
<i>Trichoderma velutinum</i> W11a	47.7 ± 7	-0.64	1	ns
<i>Trichoderma velutinum</i> W15a	42.5 ± 7.4	-2.07	0.418	ns
<i>Trichoderma velutinum</i> W21e	44.2 ± 5.9	-1.61	0.774	ns
<i>Trichoderma velutinum</i> W22a	29.9 ± 6.5	-5.54	0	***
<i>Trichoderma velutinum</i> W34e	45.8 ± 11.5	-0.18	1	ns
<i>Trametes</i> sp. 50g	54 ± 6.3	-0.92	0.993	ns



**Supplementary data 4.** Boxplot representation of the dry biomass of plants obtained in the *in vitro* pathogenicity assay for each isolate tested, and comparison with the control plants inoculated with water. Significance of average values in black (Dunnett post hoc test; ns: non significant; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).



**Supplementary data 4** (continued). Boxplot representation of the dry biomass of plants obtained in the *in vitro* pathogenicity assay for each isolate tested, and comparison with the control plants inoculated with water. Significance of average values in black (Dunnett post hoc test; ns: non-significant; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).