RECHERCHE DES MEILLEURS COUPLES POIS-RHIZOBIA PREMIERS RESULTATS ET PERSPECTIVES

Virginie BOURION[1], Xavier PINOCHET[2] et Frédéric DEBELLE[3]

[1]UMR Agroécologie – INRA 21065 Dijon
[2]Terres Inovia, 78850 Thiverval-Grignon
[3]LIPM – INRA 31326 Castanet Tolosan cedex
virginie.bourion@inra.fr

RÉSUMÉ

La culture de légumineuses, et en particulier du pois, présente le double intérêt de permettre une production de graines à haute valeur nutritionnelle sans nécessité d'un apport d'engrais azoté. Cependant, la nutrition azotée du pois, et en particulier la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique, peut être insuffisante dans certains environnements et limiter ainsi le rendement de la culture. L'établissement de la symbiose entre pois et rhizobium nécessite une reconnaissance mutuelle spécifique entre les deux partenaires, et une coordination de l'expression de nombreux gènes, indispensable à la mise en place des importantes modifications racinaires permettant la formation des organes symbiotiques appelés nodosités. Dans les conditions de plein champ, les plantes de pois sont en interaction avec des populations de souches de rhizobium indigènes, variables à la fois pour leur efficacité à fixer l'azote atmosphérique et à noduler les plantes ainsi que pour leur capacité à rivaliser avec les autres souches présentes dans les sols. Différentes expérimentations ont mis en évidence des associations préférentielles entre génotypes de pois et souches bactériennes. Cependant, les gènes impliqués dans les étapes précoces de la nodulation sont très peu connus chez le pois et rien n'est encore connu sur le déterminisme génétique du choix entre les deux partenaires symbiotiques. Une meilleure connaissance de ces déterminismes génétiques est l'enjeu de programmes de recherche en cours, avec comme perspectives, la création de variétés de pois pouvant être nodulées au champ, par des souches de rhizobium compétitives et efficientes.

Mots-clés : pois, rhizobium, fixation symbiotique, compétitivité, diversité génétique.

1 - INTRODUCTION

Le contexte mondial nécessite à la fois un accroissement de la production agricole pour faire face à la très forte augmentation de la population, et des systèmes de production agro-écologiques c'est-à-dire plus respectueux de l'environnement et de sa biodiversité. Face à ces enjeux, la culture de légumineuses présente le double intérêt de permettre une production de graines ou de fourrages à haute teneur en protéines, sans nécessité d'un apport d'engrais azoté. La nutrition azotée des légumineuses dépend en effet majoritairement de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique réalisée par des bactéries du sol, les rhizobia, au sein des nodosités, et dans une moindre mesure, de l'absorption de l'azote minéral du sol par les racines. Les rhizobia convertissent le N_2 atmosphérique en ammonium directement assimilable par la plante. Les quantités d'azote symbiotique fixé par les cultures de légumineuses ont été estimées à 60 Mt par an, auxquels s'ajoutent 58 Mt fixés par les forêts et prairies naturelles et 140 Mt par les océans (Fowler *et al.*, 2013). D'autres estimations ont évalué les parts fixées par les différents types de cultures de légumineuses : 21 Mt par an par les

légumineuses à graines, dont 3 Mt pour les légumineuses riches en protéines (pois chiche, haricot, pois, féverole, lentille) et respectivement 16 Mt et 2 Mt pour les deux légumineuses à graines riches en huile, le soja et l'arachide ; enfin entre 12 et 25 Mt d'azote fixé par les légumineuses fourragères (Herridge *et al.*, 2008).

La culture du pois permet de réduire l'utilisation des engrais azotés et donc leurs impacts négatifs sur l'environnement (Jensen *et al.*, 2012). La fabrication et l'épandage de ces engrais sont en effet fortement consommateurs d'énergie fossile, et induisent un accroissement de la teneur en nitrate des sols ou des eaux de drainage ainsi que des émissions de gaz à effet de serre (Fowler *et al.*, 2013). Lors d'une culture de pois, l'azote (N) fixé profite non seulement à la légumineuse en place, qui n'a donc pas besoin d'engrais azoté, mais également aux plantes associées ou aux cultures suivantes. Ainsi, les reliquats après une culture de pois contiennent 20 à 60 kg N/ha de plus qu'après une culture de céréales, ce qui permet de réduire d'autant les apports d'engrais azotés nécessaires à la culture suivante (Munier-Jolain et Carrouee, 2003). Enfin, au-delà de l'apport en azote et de la limitation des émissions des gaz à effet de serre, les légumineuses présentent d'autres atouts environnementaux. L'introduction des légumineuses dans les systèmes de culture, dans les rotations ou en association, crée en effet une diversification des cultures et permet, dans certains cas, de réduire la taille des populations de bioagresseurs et donc l'usage des produits phytosanitaires (Munier-Jolain et Carrouee, 2003).

La culture du pois, reste cependant limitée en France et plus généralement en Europe ; les surfaces cultivées actuellement ne dépassent pas 200 000 ha en France et 1 million d'ha en Europe. Ceci principalement en raison du faible niveau moyen de rendement de la culture (36 q/ha de graines) et de son instabilité (25 à 50 q/ha selon les années ; Pinochet, 2018). En outre, l'instabilité de la teneur en protéines des graines récoltées freine leur utilisation en agroalimentaire. L'amélioration de la nutrition azotée, et en particulier de la fixation symbiotique, est une des voies d'amélioration du rendement et de la teneur en protéines des graines. En effet, il a été montré, par des expérimentations en plein champ, qu'il existe une forte corrélation entre le rendement en graines et le niveau de nutrition azotée, lui-même très fortement lié à au niveau de fixation symbiotique (Doré *et al.*, 1998). D'autres expérimentations au champ ont en outre mis en évidence une forte corrélation ($r = 0.91$) entre la teneur en protéines des graines à maturité et la biomasse de nodosités mesurée au stade de début de remplissage des graines (Bourion *et al.*, 2007). Or, la fixation symbiotique dépend de l'efficacité symbiotique du partenaire bactérien ; celle-ci pouvant aussi varier selon le génotype de pois avec lequel il interagit (Laguerre *et al.*, 2007).

2 - UNE INTERACTION SPECIFIQUE ENTRE LES DEUX PARTENAIRES SYMBIOTIQUES

L'établissement de la symbiose entre une légumineuse et son partenaire symbiotique fixateur d'azote nécessite une reconnaissance mutuelle spécifique des deux partenaires, induisant par la suite le développement sur les racines, d'organes symbiotiques appelés nodosités. Une coordination de l'expression de nombreux gènes chez les deux partenaires, régulée par l'échange de signaux moléculaires, est nécessaire pour induire les importantes modifications racinaires relatives à la nodulation des légumineuses (Janczarek *et al.*, 2015). Les plus connus des premiers signaux moléculaires émis par les plantes sont les flavonoïdes ; ils sont spécifiquement reconnus par les rhizobia, chez lesquels ils activent les protéines NodD. Ces protéines ont une certaine spécificité d'interaction avec les flavonoïdes produits par les plantes hôtes, ce qui permet un premier contrôle du spectre d'hôte des rhizobia. Les protéines NodD sont des facteurs de transcription qui activent l'expression des différents gènes bactériens *nod*, qui eux-mêmes induisent la synthèse de facteurs Nod. Ces facteurs sont des signaux lipochito-oligosaccharides indispensables à la formation des nodosités fixatrices d'azote.

Parmi les gènes *nod*, les gènes communs *nod*ABC sont responsables de la synthèse du squelette lipochito-oligosaccharide des facteurs Nod (Denarié *et al.*, 1996 ; Perret *et al.*, 2000). Il existe des variations de longueur du squelette produit selon les rhizobia (Figure 1). Les autres gènes *nod* ne sont pas présents chez tous les rhizobia. Ils sont très variés et responsables de la diversité des facteurs Nod ; ceci permet des interactions spécifiques entre certaines souches et certaines espèces végétales ou même variétés d'une même espèce. A titre d'exemple, dans le cas de la symbiose entre le pois et son partenaire symbiotique *Rhizobium leguminosarum* sv *viciae* (Rlv), les souches Rlv porteuses du gène *nodX* sont les seules capables de noduler les pois de type « Cv Afghanistan » (Davis *et al.*, 1988).

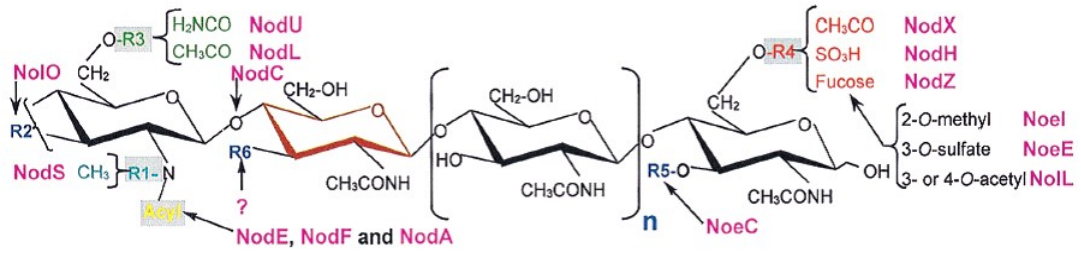

Figure 1. Structure des facteurs Nod produits par différentes espèces de rhizobium. Les diverses substitutions (R1 à R6) du squelette chitooligosaccharidique sont indiquées ainsi que, en rose, les gènes impliqués (communs ou spécifiques). La longueur du squelette chitooligosaccharidique est variable (n varie de 0 à 2). D'après Perret *et al.*, 2000.

Des études réalisées chez les légumineuses modèles *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* ont mis en évidence qu'il existe, chez les plantes hôtes, des récepteurs, les LysM-RLK, indispensables à la perception des facteurs Nod et à la nodulation. Ce sont des receptor-like kinases (RLK) constituées d'un domaine kinase intracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine extracellulaire comportant plusieurs motifs lysine (LysM) connus pour se lier à des oligomères de N-acetylglucosamine tels que les chito-oligosaccharides. Les LysM-RLKs ne sont connues que chez les plantes et sont codées par une famille multigénique ; leurs nombres et leurs fonctions variant selon les espèces de légumineuses (Gough *et al.*, 2018). Les ressources génomiques maintenant disponibles chez le pois (Alves-Carvalho *et al.*, 2015 ; Madoui *et al.*, 2016) ont permis d'identifier chez cette espèce les gènes LysM-RLK présentant des homologies avec ceux identifiés chez les espèces modèles et leur caractérisation est en cours.

La reconnaissance par la plante de ses rhizobia spécifiques, médiée par les facteurs Nod, induit la courbure en « crosse de berger » des poils absorbants racinaires sur lesquels elles ont adhéré (Perret *et al.*, 2000). Cette courbure piège les bactéries qui forment alors une micro-colonie. Elles pénètrent ensuite, via des cordons d'infection, dans des primordia nodulaires qui se forment au niveau du cortex. Elles s'y multiplient, puis se différencient en bactéroïdes. Au sein des nodosités matures, les bactéroïdes ont un environnement favorable à la fixation de l'azote. En règle générale, chaque nodosité est constituée d'une colonie formée à partir d'une seule bactérie (et donc une seule souche). Dans le cas d'une inoculation avec un mélange de plusieurs souches, ou plus généralement dans des situations de culture en plein champ, chaque nodosité contient l'une ou l'autre des souches inoculées ou une des souches indigènes présentes dans le sol ; les cas de nodosités contenant plusieurs souches sont rares (Denison, 2000 ; Laguerre *et al.*, 2003).

3 - UNE GRANDE DIVERSITE DES SOUCHES DE RHIZOBIUM DANS LES SOLS

Les populations naturelles de *Rhizobium leguminosarum* sv *viciae* (Rlv) peuvent être en faible quantité dans certains sols. C'est le cas dans les régions où les cultures de pois, de féveroles ou de

lentilles n'existaient pas, ou dans les sols où les conditions de pH ou de températures extrêmes ne sont pas favorables au maintien de populations de rhizobia. Au Canada, où les cultures de pois et lentilles sont assez récentes et où les hivers sont très longs, des inoculations sont pratiquées systématiquement au moment des semis (Chemining'wa et Vessey, 2006). En Europe, les populations naturelles de Rlv sont généralement présentes en quantité suffisante, mais il a été observé que leurs compositions génétiques varient selon les sols et les pratiques agricoles (Depret *et al.*, 2004 ; Laguerre *et al.*, 2003). D'une façon générale, il existe une grande diversité génétique dans les populations indigènes ; elle se traduit par une diversité fonctionnelle au niveau des plantes, à la fois en compétitivité et en efficience.

La compétitivité d'une souche représente sa capacité à noduler les plantes, estimée par le pourcentage de nodosités formées, lorsqu'elle est inoculée en mélange avec d'autres souches (Laguerre *et al.*, 2003). L'efficience symbiotique d'une souche, quant à elle, est évaluée par la quantité de biomasse produite par une plante lors de l'inoculation avec cette souche. Il a été montré que ces deux caractéristiques de l'interaction ne sont pas corrélées (Bourion *et al.*, 2018). Ainsi, en conditions de plein champ, les pois peuvent être nodulés par des rhizobia compétitifs mais ayant une faible efficacité symbiotique (Triplett et Sadowsky, 1992). Enfin, lorsque des semences de pois sont inoculées avec une souche choisie pour son efficience, celle-ci peut être supplantée avec les souches Rlv indigènes présentes dans les sols avec lesquelles elle se trouve en situation de compétition (Laguerre *et al.*, 2003).

Les génotypes de pois bénéficient de manière différente (qualitativement et quantitativement) de l'interaction avec cette diversité de souches Rlv. Les effets des différentes souches, sur les développements aérien, racinaire et nodulaire, varient selon les génotypes de pois avec lesquelles elles sont en interaction (Laguerre *et al.*, 2007 ; Bourion *et al.*, 2018). En outre, la nodulation induit un coût en carbone important pour la plante, généralement au détriment des parties aériennes et des racines (Voisin *et al.*, 2003), et l'intensité de cet impact varie selon la souche de rhizobium et le génotype végétal. Ainsi, des situations extrêmes de diminution du développement racinaire ont été observées chez des pois « hypernodulants » porteurs d'une mutation pour un gène d'autorégulation négative de la nodulation (Bourion *et al.*, 2007). Pour ne pas investir trop de ressources dans la formation et l'entretien de nodosités, ces mécanismes sont mis en place par la plante, notamment lors d'apport en N suffisant (Ferguson *et al.*, 2010). Ces plantes mutantes ont une efficience de fixation d'azote diminuée et finalement un rendement plus faible que les plantes non hypernodulantes, en raison du surcoût en carbone que représentent la formation et l'entretien des nodosités surnuméraires (Voisin *et al.*, 2007). De la même façon, il a été observé que des souches Rlv induisant la formation de très grosses nodosités (BNO pour Big Nodules) ont un impact négatif sur le développement racinaire, la croissance et l'accumulation d'N dans les parties aériennes (Laguerre *et al.*, 2007).

4- DES ASSOCATIONS PREFERENTIELLES ENTRE GENOTYPES VEGETAUX ET BACTERIENS

Des expérimentations réalisées en condition de plein champ ou en conditions contrôlées ont mis en évidence des différences entre les génotypes de pois pour leurs choix de partenaires bactériens. Lors de l'expérimentation réalisée au champ, il a été observé des différences entre les cinq génotypes de pois pour leurs profils de choix parmi les souches Rlv indigènes. Ainsi notamment, les souches indigènes avec un gène *nodD* de type a (on identifie 5 types de gène *nodD* : a, b, c, r et s) ont été trouvées en faible proportion chez la variété Frisson et ses mutants hypernodulants à développement racinaire plus réduit, et en forte proportion (50 à 60%) chez les deux variétés de pois à fort développement racinaire, Athos et Austin (Figure 2 ; Bourion *et al.*, 2007). L'expérimentation en serre a, quant à elle, porté sur une collection de 104 accessions de pois d'origines géographiques diverses, et regroupant des pois sauvages, des populations de pays et des variétés cultivées anciennes et récentes représentatives des pois de printemps et des pois d'hiver. Chaque accession a été inoculée

par un mélange de cinq souches, supposées avoir des niveaux de compétitivité différents et, elles aussi, de différentes origines géographiques (Bourion *et al.*, 2018). Les pourcentages de nodosités formées avec chacune des cinq souches ont été estimés à partir d'un prélèvement représentatif de 60 nodosités sur chacune des 104 accessions. Une des cinq souches (SA ; d'origine française) s'est révélée être en moyenne la plus compétitive (Figure 3). Néanmoins, des différences de profil de choix de souches ont été observées entre les 104 accessions ; toutes n'ont pas choisi préférentiellement la souche SA et des cas de spécificité existent entre des pois, notamment afghans et la souche SF porteuse du gène *nodX*.

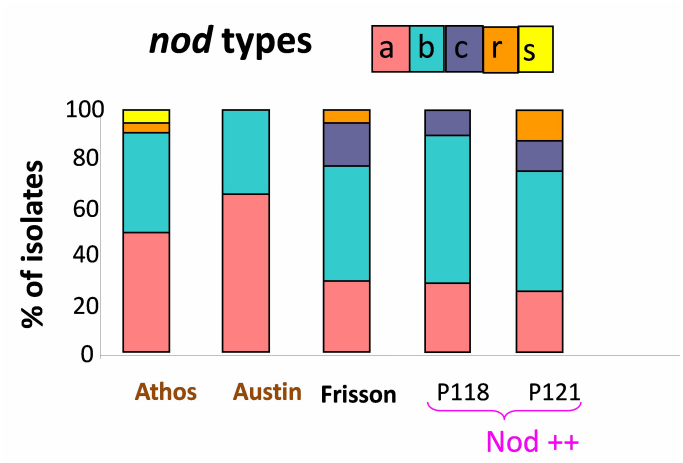

Figure 2. Dans une expérimentation au champ sur 5 génotypes de pois (3 cultivars Athos, Austin et Frisson, et 2 mutants hypernodulants de Frisson), pourcentage d'occupation des nodosités par les souches indigènes caractérisées par leur type de gène *nodD* (a, b, c, r et s). Le prélèvement des nodosités et la description des systèmes racinaires ont été réalisés sur les plantes à début floraison. Athos et Austin ont pour caractéristique d'avoir un fort développement racinaire, comparativement aux 3 autres génotypes. D'après Bourion *et al.*, 2007.

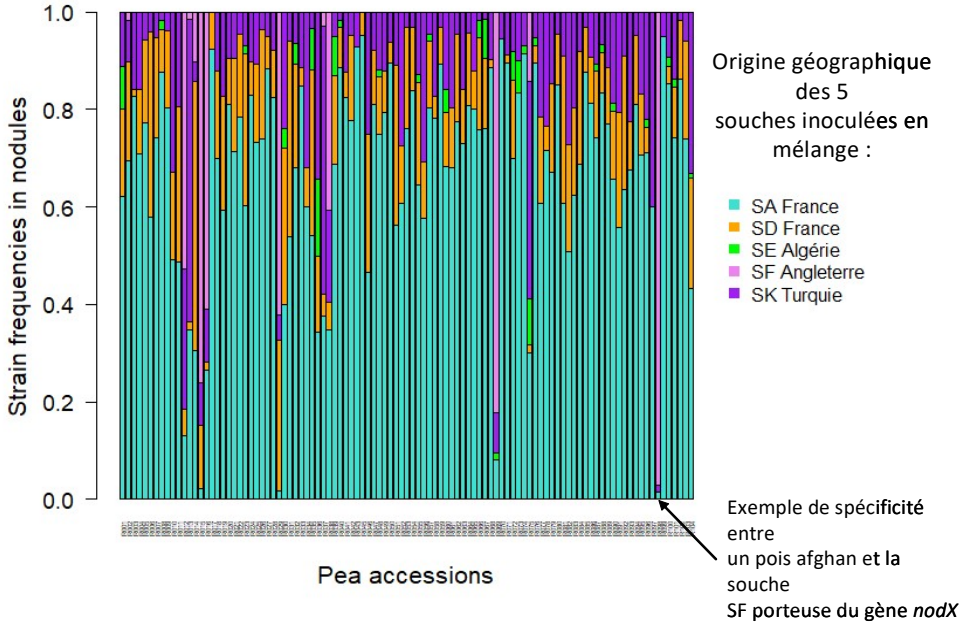

Figure 3. Dans une expérimentation en serre sur 104 accessions de pois, pourcentage d'occupation des nodosités par les 5 souches inoculées en mélange au moment du semis. Le prélèvement des nodosités a été réalisé sur des plantes 4 semaines après l'inoculation. D'après Bourion *et al.*, 2018.

Une structuration génétique de la collection de pois a été réalisée à partir des données de génotypage SNP disponibles pour les 104 accessions (puce GenoPea13K SNP ; Tayeh *et al.*, 2015). Cette structuration a permis de subdiviser la collection en trois groupes distincts : i) le groupe des pois « sauvages » comprenant les espèces sauvages et les populations de pays originaires du Moyen-Orient, d'Abyssinie (Ethiopie, Soudan) et d'Asie ; ii) le groupe des pois de printemps, potager, fourrager et protéagineux, d'origines géographiques variées ; iii) le groupe des pois d'hiver, fourrager et protéagineux (Bourion *et al.*, 2018). Il a été observé une plus grande diversité de choix chez les pois « sauvages » que chez les pois cultivés (Figure 4). Les profils de choix de souches sont très semblables pour les pois de printemps et d'hiver : en moyenne, la souche française SA est présente dans 70% des nodosités, les souches SD et SK entre 10 et 15%, la souche SE à moins de 3% et la souche SF est absente. Par comparaison, chez les pois « sauvages », la souche SA n'est présente en moyenne qu'à 50%, la moyenne atteinte par la souche SF est de 20%, et surtout il existe une très forte variabilité autour des moyennes obtenues pour chacune des cinq souches, exceptée SE. Ces différences de profil entre pois sauvages et pois cultivés posent la question de l'impact de la domestication sur les choix de souches.

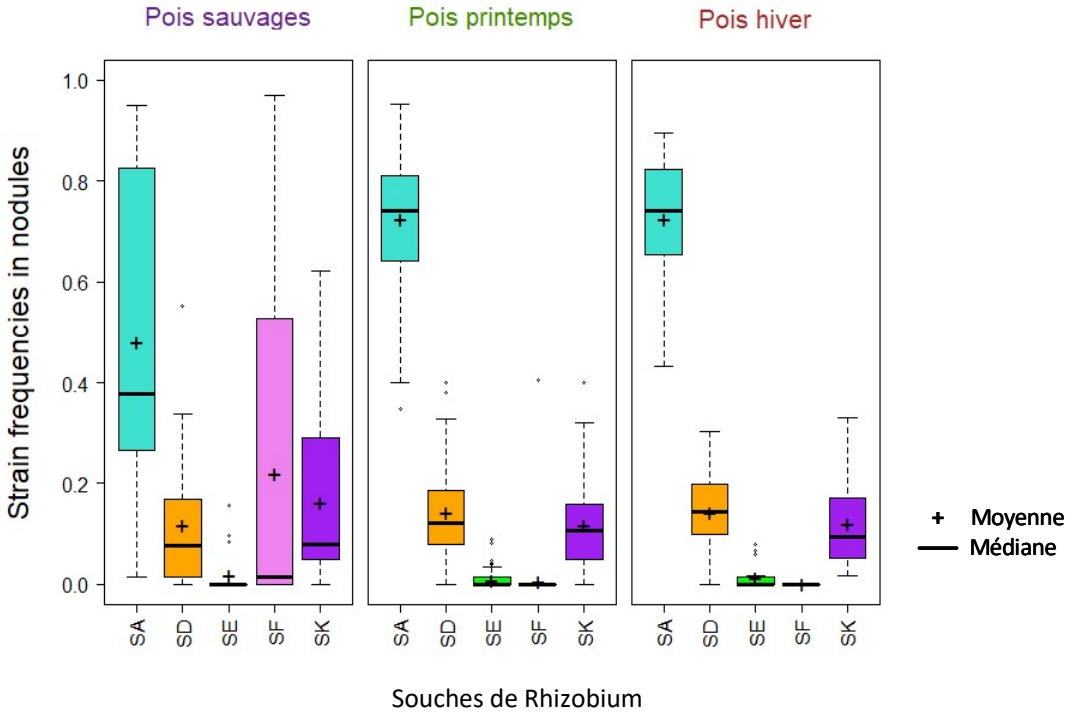

Figure 4. Variabilité des pourcentages d'occupation des nodosités pour chacune des 5 souches inoculées en mélange à l'intérieur de chacun des 3 groupes de structuration génétique de la collection des 104 accessions (Pois sauvages, Pois de printemps, Pois d'hiver). L'expérimentation a été réalisée en serre et le prélèvement des nodosités réalisé sur des plantes 4 semaines après l'inoculation. D'après Bourion *et al.*, 2018.

5 - PERSPECTIVES : CONNAITRE LE DETERMINISME GENETIQUE DU CHOIX ENTRE LES PARTENAIRES SYMBIOTIQUES

De nouvelles expérimentations sont en cours dans le cadre du projet ANR GRaSP (Genetics of Rhizobia Selection by Pea*). Ce projet associe les compétences multidisciplinaires de quatre laboratoires de recherche académique (UMR Agroécologie, LIPM Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes, LSTM Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IPS2 Institut of

Plant Sciences) et d'un institut technique (Terres Invovia) impliqué dans la promotion de la culture des Légumineuses en France. Elles ont pour double enjeu : i) l'identification des régions génomiques ou gènes de pois impliqués dans les étapes précoces de la nodulation et le choix du partenaire bactérien ; ii) l'identification des déterminants de la compétitivité des souches Rlv. Deux approches sont menées en parallèle et en interaction pour répondre à ces objectifs de connaissance et une troisième approche va être une approche de validation.

La première approche est basée sur une étude de génétique d'association réalisée sur une vaste collection de 336 accessions de pois génotypées avec un grand nombre de marqueurs SNPs et phénotypées pour leur choix de partenaires symbiotiques parmi un mélange de 28 souches de Rlv représentatif de la diversité du partenaire bactérien nodulant le pois. Les 336 accessions de pois incluent 97 des 104 accessions étudiées précédemment, et 239 accessions supplémentaires, dont 94 sauvages et 145 représentatives de l'évolution de la sélection végétale. Le génotypage a été réalisé par séquençage de captures à partir d'exome à la fois dans le cadre du projet GRaSP et du projet Investissement d'Avenir PeaMUST et a permis de détecter 3,8 Millions de SNP dans cette collection. Deux expérimentations successives de phénotypage ont été réalisées sur la plateforme de phénotypage haut-débit (4PMI) de l'INRA de Dijon, garantissant un contrôle précis des conditions de culture pour un très grand nombre de plantes. Dans chaque expérimentation, 3 à 6 plantes par accession ont été mises en culture dans un à deux RhizoTubes (Jeudy *et al.*, 2016) ; ce qui a permis des prises d'image journalières des systèmes racinaires et une évaluation précise de la nodulation. La quantification des souches pour chacune des 336 accessions a été réalisée par métabarcoding. La seconde approche est menée en parallèle et questionne le rôle dans le choix parmi différentes souches de Rlv de certains gènes de pois, notamment les LysM-RLK connus pour leur implication dans la reconnaissance par la plante de signaux symbiotiques produits par les rhizobia.

La troisième approche est un test grandeur nature, sous la responsabilité de Terres Inovia, de combinaisons compétitives et efficientes entre pois et rhizobium. Les deux premières approches vont permettre l'identification de couples compétitifs « génotype de pois x souche Rlv ». Une expérimentation complémentaire en serre va permettre de sélectionner les couples les plus efficients. Les expérimentations qui vont être menées au champ dans différents lieux d'expérimentation ont pour objectif de vérifier : i) la compétitivité des souches inoculées dans des conditions où elles sont en interaction avec des souches indigènes ; ii) l'efficience de fixation symbiotique des couples « pois x souche » ; et *in fine* iii) le gain de rendement apporté par une inoculation par une souche choisie non seulement pour son efficience mais aussi pour sa compétitivité.

6 - CONCLUSION

L'amélioration de la nutrition azotée du pois, et en particulier de la fixation symbiotique, est une des voies d'amélioration du rendement de sa culture et de la teneur en protéines de ses graines. Or la fixation symbiotique dépend de l'efficience du partenaire bactérien, *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* (Rlv) et varie aussi selon le génotype de pois. Enfin, dans les conditions de plein champ, les plantes de pois sont en interaction avec des populations de souches Rlv indigènes, variables à la fois en efficience pour fixer l'azote atmosphérique et en compétitivité pour rivaliser avec les autres souches présentes dans leur capacité à noduler les plantes. L'établissement de la symbiose entre pois et Rlv nécessite une reconnaissance mutuelle spécifique entre les deux partenaires et une coordination de l'expression de nombreux gènes chez les deux partenaires, régie par l'échange de signaux moléculaires, est indispensable à la mise en place des importantes modifications racinaires permettant la nodulation. Les gènes impliqués dans ces étapes précoces de la nodulation et le choix de son partenaire symbiotique sont mal connus chez le pois. Une meilleure connaissance de ces déterminismes génétiques est l'enjeu du projet ANR GRaSP en cours, avec comme perspectives, à terme, la création de variétés de pois pouvant être nodulées, au champ, par des souches Rlv compétitives et efficientes.

Renforcer l'intégration des interactions biotiques bénéfiques dans les approches de sélection variétale, c'est-à-dire en sélectionnant des génotypes qui maximisent les bénéfices de la symbiose, constitue un enjeu économique important pour l'introduction des légumineuses dans les systèmes de culture à faible apport d'intrants.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les collègues des UMR Agroécologie, LIPM, LSTM, IPS2 et Terres Inovia ayant contribué aux travaux réalisés ou contribuant aux travaux en cours, et en particulier Marc Lepetit, Marion Dalmais et Véronique Biarnès pour leur implication dans le projet GRaSP. Un hommage spécial est rendu à Gisèle Laguerre pour son rôle déterminant dans le développement de recherches à l'INRA sur la diversité des rhizobia et l'importance de la prise en compte de leurs interactions avec les légumineuses cultivées. Les travaux réalisés au champ et en serre sur les interactions entre pois et rhizobium ont été financés respectivement par la Région Bourgogne et par le département BAP de l'INRA (SYMBIOPEA) et l'Agence Nationale de la Recherche (projet ANR GenoPea).

Journée Scientifique ASF du 7 février 2019
" Le système radiculaire et la rhizosphère en amélioration des plantes "

BIBLIOGRAPHIE

Alves-Carvalho S., Aubert G., Carrère S., Cruaud C., Brochot A.-L., Jacquin F., Klein A., Martin C., Boucherot K., J. Kreplak. – 2015 - Full-length de novo assembly of RNA-seq data in pea (*Pisum sativum* L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species. *The plant journal* 84:1-19.

Bourion V., Heulin-Gotty K., Aubert V., Tisseyre P., Chabert-Martinello M., Pervent M., Delaitre C., Vile D., Siol M., Duc G., Brunel B., Burstin J., Lepetit M. – 2018 - Co-inoculation of a pea core-collection with diverse rhizobial strains shows competitiveness for nodulation and efficiency of nitrogen fixation are distinct traits in the interaction. . *Frontiers in Plant Science* 8.

Bourion V., Laguerre G., Depret G., Voisin A.S., Salon C., Duc G. – 2007 - Genetic variability in nodulation and root growth affects nitrogen fixation and accumulation in pea. *Ann. Bot.* 100:589-598.

Chemining'wa G.N., Vessey J.K. - 2006 - The abundance and efficacy of Rhizobium leguminosarum bv. viciae in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biology and Biochemistry* 38:294-302.

Davis E.O., Evans I.J., Johnston A.W.B. - 1988 - Identification of *nodX*, a gene that allows *Rhizohium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas. *Mol. Gen. Genet.* 212:531-535.

Denarie J., Debelle F., Prome J.C. - 1996 - Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65:503-535.

Denison R.F. - 2000 - Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *American Naturalist* 156:567-576.

Depret G., Houot S., Allard M.R., Breuil M.C., Nouaim R., Laguerre G. – 2004 - Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51:87-97.

Doré T., Meynard J.M., Sebillotte M. - 1998 - The role of grain number, nitrogen nutrition and stem number in limiting pea crop (*Pisum sativum*) yields under agricultural conditions. *European Journal of Agronomy* 8:29-37.

Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin M.H., Lin Y.H., Reid D.E., Gresshoff P.M. – 2010 - Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology* 52:61-76.

Fowler D., Coyle M., Skiba U., Sutton, M., Cape J., Reis S., Sheppard L., Jenkins A., Grizzetti B., Galloway J., Vitousek P., Leach A., Bouwman A., Butterbach-Bahl K., Dentener F., Stevenson D., Amann M., Voss M. – 2013 - The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368:20130164.

Gough C., Cottret L., Lefebvre B., Bono J.-J. - 2018 - Evolutionary History of Plant LysM Receptor Proteins Related to Root Endosymbiosis. *Frontiers in Plant Science* 9.

Herridge D.F., Peoples M.B., Boddey R.M. - 2008 - Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311:1-18.

Janczarek M., Rachwał K., Marzec A., Grządziel J., Palusińska-Szysz M. - 2015 - Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. *Applied Soil Ecology* 85:94-113.

Jensen E.S., Peoples M.B., Boddey R.M., Gresshoff P.M., Hauggaard-Nielsen H., Alves B.J.R., Morrison M.J. - 2012 - Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32:329-364.

Jeudy C., Adrian M., Baussard C., Bernard C., Bernaud E., Bourion V., Busset H., Cabrera-Bosquet L., Cointault F., Han S., Lamboeuf M., Moreau D., Pivato B., Prudent M., Trouvelot S., Truong H.N., Vernoud V., Voisin A.-S., Wipf D., Salon C. - 2016 - RhizoTubes as a new tool for high throughput imaging of plant root development and architecture: test, comparison with pot grown plants and validation. *Plant Methods* 12:1-18.

Laguerre G., Depret G., Bourion V., Duc G. - 2007 - *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* genotypes interact with pea plants in developmental responses of nodules, roots and shoots. *New Phytol.* 176:680-690.

Laguerre G., Louvrier P., Allard M.R., Amarger N. – 2003 - Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae for nodulation of host legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2276-2283.

Madoui M.A., Labadie K., Agata L., Aury J., Kreplak J., Gali K.K. - 2016 - Assembly of the pea genome by integration of high throughput sequencing (PacBio and Illumina) and whole genome profiling (WGP TM) data. PAG XXIV Conference.

Munier-Jolain N., Carrouee B. – 2003 - Considering pea in sustainable agriculture: agricultural and environmental arguments. *Cahiers Agricultures* 12:111-120.

Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. – 2000 - Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:180-201.

Pinochet X. - 2018 - Legume crops in France and Europe, present and future evolutions. Journées du réseau Agrosym, Dijon, 29-31 mai 2018.

Triplett E.W., Sadowsky M.J. – 1992 - Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:399-428.

Tayeh N., Aluome C., Falque M., Jacquin F., Klein A., Chauveau A., Berard A., Houtin H., Rond C., Kreplak J., Boucherot K., Martin C., Baranger A., Pilet-Nayel M.-L., Warkentin T.D., Brunel D., Marget P., Le Paslier M.-C., Aubert G., Burstin J. - 2015 - Development of two major resources for pea genomics: the GenoPea 13.2K SNP Array and a high-density, high-resolution consensus genetic map. *The Plant Journal* 84:1257-1273.

Voisin A.S., Bourion V., Duc G., Salon C. - 2007 - Using an ecophysiological analysis to dissect genetic variability and to propose an ideotype for nitrogen nutrition in pea. *Ann. Bot.* 100:1525-1536.

Voisin A.S., Salon C., Jeudy C., Warembourg F.R. – 2003 - Root and nodule growth in *Pisum sativum* L. in relation to photosynthesis: Analysis using ^{13}C-labelling. *Ann. Bot.* 92:557-563.

* GRaSP project :
http://www.agence-nationale-recherche.fr/projet-anr/?tx_lwmsuivibilan_pi2%5BCODE%5D=ANR-16-CE20-0021)