



HAL
open science

Effet du ver de terre *Aporrectodea caliginosa* sur la croissance des plantes, leur développement et leur résistance aux pathogènes : réponse physiologique et moléculaire de la plante à l'émission de molécules-signal

Ruben Puga Freitas

► To cite this version:

Ruben Puga Freitas. Effet du ver de terre *Aporrectodea caliginosa* sur la croissance des plantes, leur développement et leur résistance aux pathogènes : réponse physiologique et moléculaire de la plante à l'émission de molécules-signal. Sciences de la Terre. Université Paris-Est, 2012. Français. NNT : 2012PEST1158 . tel-00804633

HAL Id: tel-00804633

<https://theses.hal.science/tel-00804633>

Submitted on 26 Mar 2013

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.

UNIVERSITE PARIS EST-CRETEIL VAL DE MARNE

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

THESE

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Paris-Est

Spécialité : Sciences de l'Univers et de l'Environnement

Présentée par :

Ruben PUGA FREITAS

Effet du ver de terre *Aporrectodea caliginosa* sur la croissance des plantes, leur développement et leur résistance aux pathogènes

Direction de thèse et encadrement: Evelyne Garnier-Zarli, Professeur.

Co-encadrement : Manuel Blouin, Maître de conférences

Université Paris Est-Créteil, Equipe IBIOS-BIOEMCO, UMR 7618

Soutenue le 03 décembre 2012, devant le jury composé de :

Michael Bonkowski	Pr., Université de Cologne	Rapporteur
Denis Faure	DR, CNRS	Rapporteur
Fabienne Cartieaux,	CR, IRD	Examineur
Stéphanie Robert	CR, Umea Plant Research Center	Examineur
Evelyne Garnier-Zarli	Pr., Université Paris-Est Créteil	Directrice de thèse
Manuel Blouin	MC, Université Paris-Est Créteil	Co-directeur de thèse

**Effet du ver de terre *Aporrectodea caliginosa* sur la croissance des plantes,
leur développement et leur résistance aux pathogènes**

Remerciements

Ce travail achevé, je tiens à remercier tous ceux qui d'une façon ou d'une autre ont contribué à sa réalisation :

Pour m'avoir guidé et encadré dans mon travail de recherche, je tiens à remercier tout particulièrement Evelyne Garnier-Zarli et Manuel Blouin. Je les remercie de leur confiance, leur patience, leurs conseils et le partage de leurs connaissances, indispensables à ma maturation scientifique.

Je remercie Luc Abbadie pour m'avoir accueilli dans l'UMR 7618, Biogéochimie des milieux continentaux. Je suis particulièrement reconnaissant auprès de Philippe Mora pour son accueil dans l'équipe IBIOS. Sans cela, je n'aurais pu mener à bien mon travail de thèse.

Merci à Marie-Claire Gazeau et Denis Duhamel, directeurs de l'école doctorale SIE, pour avoir suivi avec attention le déroulement de ma thèse et à Brigitte David pour sa disponibilité, sa bonne humeur, sa patience et pour avoir toujours su répondre à mes nombreuses questions.

Mes remerciements vont également aux membres de mon jury. Merci à Denis Faure et Michael Bonkowski pour avoir accepté la lourde tâche d'être mes rapporteurs. Merci à Fabienne Cartieaux et Stéphanie Robert qui ont accepté le rôle d'examineurs. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance.

L'aboutissement de ce travail ayant impliqué plusieurs collaborations, je souhaiterais également exprimer toute ma gratitude à Sébastien Barot pour toute l'aide et conseils qu'il m'a fourni pendant cette thèse mais aussi à Lamia Belkacem, Jean Roger-Estrade et Michel Bertrand sans qui je n'aurais pas eu l'opportunité de travailler sur la maladie du piétin échaudage. Je tiens également à remercier Jean-Pierre Renou et Ludivine Taconnat, du laboratoire de l'URGV, pour m'avoir accueilli si chaleureusement afin de m'initier aux analyses transcriptomiques et pour leur aide dans l'analyse des résultats. Je tiens également à remercier l'équipe du laboratoire PartnerChip, en particulier Sylvain Baulande, pour la réalisation de l'analyse transcriptomique du blé et pour son aide dans l'analyse des résultats.

Un grand merci aux personnes d'IBIOS, pour leur aide, conseils et pour m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions qu'il soit: à Yasmine Zuily-Fodil et Anne Repellin pour m'avoir permis d'avoir accès à leur plateforme de sciences du végétal ainsi que pour leurs précieux conseils, à Daniel Laffray pour nos longues discussions, sa passion pour la science et pour m'avoir encadré pendant mon monitorat, à Chantal Passaquet pour son optimisme et sa précieuse aide en biologie moléculaire, à Matthieu Bagard pour son soutien, ses précieux conseils et sa disponibilité, à Luis Leitao pour son aide et rigueur scientifique, à Samir Abbad pour ces précieux conseils, à Fryni Grekis pour sa bonne humeur au quotidien et pour m'avoir orienté et aidé dans tous les processus administratifs que requièrent une thèse. Je tiens également à remercier toutes les autres personnes d'IBIOS qui se reconnaîtront dans ce travail.

Je remercie chaleureusement mes collègues doctorants avec qui j'ai partagé ces années de thèse et qui m'ont montré que l'entraide et le soutien venait bien souvent à bout des difficultés. Pour tout ce qu'ils m'ont apporté je tiens donc à remercier : Marien, pour avoir toujours été d'un grand soutien moral, sa disponibilité, sa rigueur scientifique et de m'avoir permis de décompresser et relativiser quand cela était nécessaire ; Biet, Rafiq, Ahmed, Judicaëlle, Georges, Ulrike et Deborah pour leur aide et leur bonne humeur au quotidien; Elodie, Charlène et Gaël pour nos nombreuses discussions que ce soit en colloque ou autour d'un café à l'UPEC où à l'IRD, merci à Gaël pour ces nombreux conseils pour l'élevage de vers de terre, son aide pour les analyses statistiques et pour sa passion pour la science.

Figures

Synthèse bibliographique

Figure 1 : Schéma des composantes externes (galeries, agrégats, turricules) et internes (en contact avec le corps du vers de terre) de la drilosphère et de leur interaction avec d'autres domaines fonctionnels du sol	8
Figure 2 : Représentation de l'interaction de la drilosphère avec les autres sphères de régulation présentes dans le sol	9
Figure 3 : Schématisation de la relation tripartite entre les vers de terre, les plantes et les microorganismes du sol.....	11
Figure 4 : Schéma de la multiplicité des interactions et rétroactions entre les cinq composantes influençant la formation et la stabilisation des agrégats dans les sols.....	14
Figure 5 : Mécanismes putatifs d'interaction entre la plante et les micro-organismes du sol	17
Figure 6 : Réseau des cascades signalétiques impliquées dans l'augmentation de la croissance végétale par les rhizobactéries. Les lignes épaisses roses indique les sécrétions ou composés bioactifs émis par les rhizobactéries.....	20
Figure 7 : Voie de biosynthèse de l'auxine par les plantes et les bactéries.....	21
Figure 8 : Voie de signalisation de la résistance systémique acquise (SAR) et induite (ISR) et de leur interaction.....	24

Résultats et discussions

Chapitre 1 :

Figure 1 : Effect of earthworm casts on plant growth in <i>in vitro</i> experiments	36
Figure 2 : Effects of <i>Apporectodea caliginosa</i> on the growth of <i>Arabidopsis thaliana</i> cv. <i>Columbia</i> and <i>aux1-7;axr4-2</i> mutant	38

Figure 3 : Validation of the results obtained in transcriptomic analysis by real-time polymerase chain reaction (qPCR)..... 39

Figure 4 : Functions of the 59 *Arabidopsis thaliana* genes differentially expressed in the presence of earthworms..... 42

Figure 5 : Comparison between genes modulated in the presence of earthworms with other transcriptomic studies..... 43

Figure 6 : Model explaining contrasting effects of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* on *Arabidopsis thaliana* 44

Chapitre 2 :

Figure 1 : Average IAA concentration at 24, 48 and 72 h by cultivable soil bacteria..... 58

Figure 2 : Relationship between IAA concentration and plant above-ground biomass..... 60

Chapitre 3 :

Figure 1 : Ordination of the different growth parameters of *A. thaliana* according to the inoculation dose of *Micrococcus luteus* in absence or presence of the earthworm *A. caliginosa* in the plane defined by the axis 1 and 2 of the PCA 71

Figure 2 : Relationship between the inoculation dose of *Micrococcus luteus* on *Arabidopsis thaliana* in absence or presence of earthworm..... 73

Figure 3 : Effect of *Aporrectodea caliginosa* presence on the rosette diameter of *Arabidopsis thaliana*, irrespectively of the dose of *Micrococcus luteus* inoculated 74

Figure 4 : Effect of the dose of *Micrococcus luteus* inoculated on *Arabidopsis thaliana* floral stem height 74

Figure 5 : Relationship between the inoculation dose of *Micrococcus luteus* on *Arabidopsis thaliana* leaf area in absence or presence of *Aporrectodea caliginosa* 75

Figure 6 : Effect of *Aporrectodea caliginosa* on the root morphology of *Arabidopsis thaliana* in absence or presence of earthworms, for different doses of *Micrococcus luteus*..... 78

Figure 7 : Relationship between the inoculation dose of *Micrococcus luteus* on IAA production by cultivable soil micro-organisms in absence or presence of *Aporrectodea caliginosa* and the effect of *Aporrectodea caliginosa* on IAA production by cultivable soil micro-organisms..... 77

Chapitre 4 :

Figure 1 : Effect of *Aporrectodea caliginosa* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on the height and biomass of *Triticum aestivum* during the experiment (63 days)..... 92

Figure 2 : Effect of *Aporrectodea caliginosa* on the severity of the symptoms caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on *Triticum aestivum* 92

Figure 3 : Effect of *Aporrectodea caliginosa* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on the above-ground and below-ground morphology of *Triticum aestivum*..... 93

Figure 4 : Effect of *Aporrectodea caliginosa* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on soil nitrate content and ammonium : nitrate ratio 94

Figure 5 : Functions of the *Triticum aestivum* genes differentially expressed in the presence of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* 97

Figure 6 : Pathway involved in the recognition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Triticum aestivum* 98

Discussion générale

Figure 9 : Synthèse des résultats de l'effet du vers de terre *A. caliginosa* sur la croissance et physiologie des plantes..... 31

Figure 10 : Synthèse des résultats de l'effet du vers de terre *A. caliginosa* sur la production d'auxine par les bactéries cultivables du sol 53

Figure 11 : Synthèse des résultats de l'effet du ver de terre <i>A. caliginosa</i> et de la bactérie <i>M. luteus</i> sur la croissance et le développement d' <i>A. thaliana</i>	64
Figure 12 : Synthèse des résultats de l'effet du vers de terre <i>A. caliginosa</i> sur l'incidence de la maladie du piétin échaudage chez le blé (<i>Triticum aestivum</i>).....	84
Figure 13 : Modèle représentant les modes d'action des vers de terre sur les interactions entre la plante et les organismes de la rhizosphère	105
Figure 14 : Voie de signalisation impliquée dans la reconnaissance du champignon <i>Gaeumannomyces graminis</i> var <i>tritici</i> (Ggt) par <i>Triticum aestivum</i>	115
Figure 15 : Voie de signalisations via l'acide jasmonique modulée par la présence du champignon <i>Gaeumannomyces graminis</i> var <i>tritici</i> (Ggt) chez <i>Triticum aestivum</i>	118
Figure 16 : Voie de signalisations des gibbérellines modulée par la présence du champignon <i>Gaeumannomyces graminis</i> var <i>tritici</i> (Ggt) chez <i>Triticum aestivum</i>	119
Figure 17 : Voie de signalisations de l'auxine modulée par la présence du champignon <i>Gaeumannomyces graminis</i> var <i>tritici</i> (Ggt) chez <i>Triticum aestivum</i>	119
Figure 18 : Voie de signalisations de l'acide abscissique modulée par la présence du champignon <i>Gaeumannomyces graminis</i> var <i>tritici</i> (Ggt) chez <i>Triticum aestivum</i>	120

Tableaux

Résultats et discussions

Chapitre 1:

Tableau 1 : Impact of the factor “earthworm” and “genotype” on biomass and morphological parameters of *Arabidopsis thaliana*, estimated in a two-ways ANOVA 39

Tableau 2 : Table 2. List of the genes of *Arabidopsis thaliana* differentially expressed in the presence/absence of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* in two replicated experiments . 40

Chapitre 2 :

Tableau 1 : Impact of the factors “plant”, “earthworm” and their interaction on IAA production by cultivable microorganisms 58

Chapitre 4 :

Tableau 1 : Effect of *Aporrectodea caliginosa* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on soil chemical properties 95

Tableau 2 : Comparison of the number of differentially expressed genes between the treatments 96

Tables des matières

Synthèse bibliographique	1
1. Contexte socio-économique.....	2
2. La qualité des sols	3
2.1. Le rôle des invertébrés dans la qualité du sol	5
2.2. Les vers de terre au fil des âges	5
2.3 Taxinomie des vers de terre	6
2.4. Ecologie des vers de terre	6
2.5. La drilosphère	9
2.6. Impact des vers de terre sur les bactéries du sol	9
3. Effets des vers de terre sur les plantes.....	10
3.1 Effet des vers de terre sur la croissance des plantes	10
3.2. Mécanismes à l'origine de l'effet des vers de terre sur la croissance des plantes	11
4. Effet des microorganismes sur les plantes	19
4.1. Production de molécules phytoestimulantes.....	19
4.2. Optimisation du prélèvement des nutriments par la plante.....	23
4.3. Effet sur les mécanismes de défense de la plante	23
5. Problématique	26
Résultats et discussions	28
Chapitre 1 : Etude de la réponse morphologique et physiologique d' <i>Arabidopsis thaliana</i> à la présence du ver de terre <i>Aporrectodea caliginosa</i>	29
Chapitre 2 : Impact du vers de terre <i>Aporrectodea caliginosa</i> et de la plante <i>Arabidopsis thaliana</i> sur la production de l'hormone végétale acide indole acétique par les bactéries cultivables.....	51

Chapitre 3 : Impact du vers de terre *Aporrectodea caliginosa* et de la bactérie productrice d'acide indole acétique *Micrococcus luteus* sur la croissance et le développement d'*Arabidopsis thaliana*..... 62

Chapitre 4 : Impact du vers de terre *Aporrectodea caliginosa* sur la pathogénicité du piétin échaudage du blé..... 82

***Discussion générale*..... 102**

1. L'interaction des plantes avec les organismes du sol : un réseau signalétique complexe 103

 1.1 Les molécules signal dans la communication entre bactéries de la rhizosphère 103

 1.2 Les molécules signal dans la communication entre bactéries et plantes..... 105

 1.3 L'impact des vers de terre sur ces échanges de signaux 107

2. Les molécules signal dans le développement des plantes 108

 2.1 L'importance des hormones végétales dans l'effet des vers de terre..... 108

 2.2 La balance hormonale : un mécanisme fin de régulation de la croissance des plantes 109

 2.3. La balance hormonale : une petite perturbation pour de grandes conséquences 111

3. Impact des vers de terre sur les mécanismes de résistance des plantes : implication des molécules signal..... 113

 3.1. Les mécanismes de défense basale chez les plantes 113

 3.2. Les molécules signal dans la reconnaissance de *Gaeumannomyces graminis* 114

 3.3. La balance hormonale dans les mécanismes de résistance des plantes..... 117

 3.4. L'induction de mécanismes de défense systémique par les vers de terre 121

***Perspectives*..... 124**

1. Etude des modifications de la composition des communautés microbiennes du sol. 125

2. Etude des voies métaboliques impliquées dans la réponse des plantes aux organismes du sol..... 128

3. Dosage des molécules signal dans les sols.....	129
4. Etude du lien coévolutif entre les plantes, les vers de terre et les microorganismes de la rhizosphère.....	130
<i>Références</i>	132
<i>Annexes</i>	158
Annexe 1 : Tableau supplémentaire 1 de la publication du Chapitre 4 :.....	159
Annexe 2 : Article publié dans Functional Plant Biology :.....	174

Synthèse bibliographique

1. Contexte socio-économique

Un des défis des prochaines décennies va être de nourrir une population mondiale estimée à 9.2 milliards d'individus d'ici 2050 (FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/>). Ce défi va nécessiter de doubler la production de nourriture dans les pays en voie de développement et de l'augmenter de 70% à l'échelle mondiale.

Pour atteindre cet objectif il n'y a pas d'autre solution que celle d'une intensification de l'agriculture, hormis la stabilisation voire la réduction de la population humaine. La politique actuelle d'intensification du système agricole dans les pays en développement, appelé révolution verte, fût initié au Mexique par la collaboration du gouvernement mexicain et de la fondation Rockefeller après la seconde guerre mondiale. C'est dans les années 1960 que la révolution verte a atteint une dimension internationale en étant d'abord appliquée en Inde, puis très vite étendue aux autres pays émergents de l'Asie mais aussi au Brésil (Perkins, 1997). Cette intensification repose sur une forte utilisation d'intrants (pesticides et fertilisants minéraux), le développement de l'irrigation ainsi que sur le développement de variétés de plantes à hauts rendements, notamment pour des plantes céréalières tel que le blé, le riz ou encore le maïs.

La révolution verte a ainsi permis de nourrir une population mondiale ayant doublé au cours des 40 dernières années. L'augmentation de la production agricole ayant accompagné la croissance de la population a évité de ce fait une catastrophe malthusienne dans de nombreux pays en voie de développement. La production mondiale de céréales est ainsi passée de 876 millions de tonnes à 2.45 milliards de tonnes au cours des 40 dernières années (FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/>). On estime que la révolution verte a ainsi sauvé un milliard de personnes de la famine.

Cependant, il est désormais admis que cette révolution verte s'est accompagnée de nombreux effets négatifs pouvant compromettre la pérennité du système de production agricole actuel. Ces effets négatifs de l'intensification incluent la contamination des nappes phréatiques, les rejets de gaz à effet de serre, l'eutrophisation de nombreux écosystèmes aquatiques, la déforestation, la dégradation du sol, la salinisation de zones irriguées et l'induction et le développement de résistances chez des organismes phytopathogènes. De plus, il est apparu que le système de production actuel présente déjà des limites, avec une

population sous-alimentée estimée à 13% de la population mondiale, soit près de 910 millions de personnes.

Un des grands défis des prochaines années va être de répondre à la future demande de la population mondiale croissante. Cependant, les techniques actuelles d'agriculture intensive ne peuvent répondre à ce défi, « Pour croître, l'agriculture doit apprendre à économiser » (FAO, « Save and grow », 2011). C'est dans cette optique que la FAO a lancé une initiative mondiale « Produire plus avec moins » rapporté sous la forme d'un ouvrage visant à proposer un nouveau modèle d'agriculture. Les recommandations proposées reposent sur une intensification de l'agriculture certes, mais une intensification qui soit raisonnée et durable. Ce modèle est défini comme : « une agriculture productive qui permet de conserver et d'améliorer les ressources naturelles. Elle utilise une approche écosystémique qui met à profit la contribution de la nature à la croissance des plantes – matières organiques du sol, régulation des débits d'eau, pollinisation et prédation naturelle des ravageurs – et applique des intrants externes appropriés au bon moment et en quantité voulue ». Un des principes-clé pour atteindre cet objectif est le maintien de la qualité et de la santé des sols.

2. La qualité des sols

Différentes tentatives pour définir un sol ainsi que sa qualité se sont succédées et sont souvent le reflet d'une école de pensée. Elles sont adaptées à un objectif ou s'adressant à des utilisateurs différents (Gobat *et al.*, 2010). La définition d'un sol est préalable à la définition de sa qualité. La complexité de l'objet qu'est le sol rend difficile la définition d'une qualité générique. Dans notre problématique d'étude, nous allons adopter, en partie, la définition proposée par Lavelle et Spain (2001) formulée à partir du rapport de la Société Américaine de Science du Sol (Karlen *et al.*, 1997). Le sol peut-être défini comme un assemblage organo-minéral et comme tel, il est fortement dépendant et influencé par les processus biologiques. Il est composé par un assemblage stable mais non consolidé de trois composantes : (1) de la matière organique, (2) de la matière minérale et (3) de la matière organo-minérale et inclu un ensemble d'organismes vivants qui lui est spécifique.

Au sein d'un sol, la matière organique est représentée par la biomasse et les produits issus du métabolisme des organismes vivants (végétaux, animaux ainsi que des

microorganismes) et de la biomasse morte, issue de la décomposition de ces organismes. La matière organique issue de la décomposition des organismes du sol, est composée de : (1) la matière organique fraîche représentée par la litière et (2) la matière organique humifiée représentée par des macromolécules synthétisées dans le sol à la suite de processus chimiques et biochimiques complexes constituant l'humification (Gobat *et al.*, 2010).

La matière minérale résulte de la dégradation physique et chimique de la roche mère. Elle est composée de trois fractions identifiées selon leur granulométrie : les sables (50 – 2000 μm), les limons (2 – 50 μm) et les argiles (< 2 μm). La proportion de chaque fraction déterminera la texture minérale du sol. Parmi la fraction minérale, les argiles, qui sont des colloïdes minéraux, vont jouer un rôle central dans le sol. Ces particules colloïdales vont influencer la structure, la porosité et la capacité d'échange ionique du sol. Ces processus sont la résultante de trois capacités que possèdent les argiles : elles sont (1) électronégatives, (2) hydrophiles et (3) capable de se disperser ou de flocculer (Gobat *et al.*, 2010).

La matière organo-minérale (communément appelée humus) est constituée de complexes argilo-humiques. Ces complexes sont issus de l'assemblage via des liaisons chimiques, généralement au travers d'un cation (calcium ou fer), entre des argiles et des polymères organiques. Ces complexes argilo-humiques vont conférer de nombreuses propriétés au sol et influenceront sur sa qualité. Ils vont ainsi : (1) modifier l'aération du sol et le stockage de l'eau, (2) ralentir la minéralisation de la matière organique, (3) empêcher la dispersion des argiles, évitant le colmatage du sol et la compaction, (4) augmenter la capacité du sol à retenir les bioéléments indispensables aux plantes (Gobat *et al.*, 2010).

La qualité du sol quant à elle, peut-être définie comme « étant la capacité d'un sol à maintenir la production biologique, la qualité de l'environnement et de promouvoir la santé des plantes, des animaux et de l'homme » (Doran *et al.*, 1996) ou encore comme étant : « La capacité du sol à fonctionner comme un système vivant. Les sols en bonne santé maintiennent en leur sein une diversité d'organismes qui contribuent à combattre les maladies des plantes, les insectes et les adventices, s'associent de façon bénéfique et symbiotique aux racines, recyclent les nutriments essentiels, améliorent la structure du sol et, partant, la rétention des eaux et des nutriments, le tout contribuant à améliorer la production végétale » (FAO, « Save and grow », 2011).

2.1. Le rôle des invertébrés dans la qualité du sol

Le sol est de moins en moins considéré comme une simple « boîte noire » dont l'utilité se limite à l'apport de nutriments nécessaires à la croissance des plantes (Lavelle & Spain, 2001). En effet, le sol contient un des assemblages les plus complexes d'organismes vivants, qui interagissent avec les composantes organiques et inorganiques d'un sol.

Parmi la composante biotique de ce système, les invertébrés du sol sont des acteurs important dans ces interactions. De ce fait, ils ont un impact majeur au niveau des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques du sol, assurant le maintien de la capacité du sol à délivrer des services écosystémiques (Lavelle, 2002; Lavelle *et al.*, 2006). Ces services écosystémiques concernent l'approvisionnement en eau, le cycle des nutriments, la formation des sols, la régulation du climat ou encore le contrôle de l'érosion. Parmi les invertébrés du sol, les vers de terre sont probablement les acteurs les plus importants dans la formation des sols, dans le maintien de la structure et de la fertilité des sols. Ils représentent la biomasse animale la plus importante des sols dans la plupart des écosystèmes terrestres. Des ouvrages comme « *The formation of vegetable mould through the action of worms* » écrit par Charles Darwin en 1881, ont très tôt rapporté l'importance des vers de terre en termes de fragmentation de la matière végétale et animale morte, du remaniement et de la stabilisation de la structure du sol, de l'aération, du drainage et de la fertilité.

2.2. Les vers de terre au fil des âges

Comme rapporté dans la synthèse de Minnich (1977), de tout temps les vers de terre ont attiré l'attention des hommes. Leurs effet bénéfiques sur la fertilité des sols était déjà connu dans l'Égypte antique allant même jusqu'à être déclarés sacrés par la reine Cléopâtre (69 - 30 av J.-C.), rendant passible de la peine de mort toute extraction du sol. De grands philosophes grecs tels Aristote (384 – 322 av. J.-C.) reconnurent aussi leur vertu en les qualifiant « d'intestins de la terre ». Cependant, du 17^{ème} siècle au 20^{ème} siècle ils furent considérés comme nuisibles, nécessitant d'être éradiqués des sols. Ils seront par la suite réhabilités au travers d'ouvrages de grands naturalistes tels que Darwin (1881). Depuis le début du 20^{ème} siècle jusqu'à aujourd'hui, le nombre d'expériences visant à étudier l'effet des

vers de terre sur la structure et fertilité des sols, mais aussi sur les différents paramètres agissant sur la croissance des plantes n'ont eu de cesse d'augmenter et ont fait à ce jour, l'objet de nombreux travaux (Bouché, 1971; Sims *et al.*, 1985; Edwards & Bohlen, 1995; Lavelle & Spain, 2001; Edwards, 2004).

2.3 Taxinomie des vers de terre

Les vers de terre appartiennent au sous ordre des lombrics (*Lumbricina*), sous division de la sous-classe des Oligochètes (*Oligochaeta*) appartenant à l'embranchement des annélides (*Annelidae*). Les vers de terre représentent plus de la moitié des 6000 espèces décrites chez les oligochètes et regroupent un ensemble de vers terrestres, arboricoles et aquatiques. Très répandus, ils se retrouvent dans la plupart des régions du monde, à l'exception des milieux climatiques extrêmes à l'image des déserts ou encore des régions constamment enneigées ou recouvertes de glace. La diversité des espèces de vers de terre rend difficile les généralisations sur leur impact sur le sol. Cependant, dans son ouvrage référençant les vers de terre en France, Bouché (1971) a distingué 3 classes écologiques distinctes de vers de terre, suivant des paramètres morphologiques et comportementaux (physiologiques) reflétant leurs mode de vie et activité dans le sol: (1) les épigés, (2) les anéciques et (3) les endogés.

2.4. Ecologie des vers de terre

La classe des épigés, décrite par Bouché (1971), concerne les vers de terre vivant à la surface du sol (Figure 1), dans la litière (en dehors de la phase minérale du sol). Ces vers de terre, généralement de petite taille et fortement mobiles, possèdent une forte pigmentation qui leur confèrent une coloration rouge foncé qui leur permet de se dissimuler dans la litière de feuilles mortes et les déjections animales dans lesquelles ils vivent. Ces vers de terre, de part leur régime alimentaire, vont être responsables de la décomposition et de la fragmentation de la matière végétale morte (feuille, tige, tronc) et de toute autre matière organique résiduelle à la surface du sol.

La classe des anéciques (Figure 1), regroupe les vers de terre vivant dans le sol et créant des galeries verticales. Ces vers de terre à pigmentation brune, parfois irisée (mimétisme crépusculaire) possèdent une taille beaucoup plus importante que les vers de terre

épigés. Ils sont caractérisés par une forte activité dans le sol, observable par le réseau complexe de galeries et les nombreux turricules (déjections) qu'ils déposent à la surface du sol. Ces vers de terre sortent généralement la nuit, afin de limiter la prédation. Ils vont prélever la litière superficielle, qu'ils tirent dans leurs galeries. Ils réutilisent les mêmes galeries pendant un certains temps, à la différence des endogés.

La classe des endogés (Figure 1) regroupe les vers de terre, de taille petite à intermédiaire qui sont souvent caractérisés par un manque de pigmentation. Cette caractéristique est répandue dans la faune édaphique de profondeur. Vivant en permanence dans le sol, dans des galeries horizontales, ils se nourrissent de la phase organo-minérale du sol (géophagie), de fragments de racines mortes (rhizophagie), mais aussi de la microflore et mésofaune qui sont ingérées avec le sol. Cependant, leurs habitudes alimentaires sont hétérogènes et dépendent fortement de leur préférence pour le type de matière organique (Curry & Schmidt, 2007). Les turricules résultant de leur activité métabolique sont déposés dans les galeries souterraines, qui sont donc peu réutilisées.

Dans la plupart des écosystèmes, les vers de terre sont des facteurs clé dans la fragmentation de la matière organique (Lavelle & Spain, 2001). On estime ainsi qu'ils sont capables de consommer la quasi-totalité de la litière annuelle (Brown *et al.*, 2004). L'activité conjointe de ces 3 classes écologiques de vers de terre permet la dégradation fine de la matière organique ainsi que son enfouissement dans le sol selon la chronologie suivante : dans un premier temps, la litière à la surface du sol va être fragmentée par les vers de terre épigés. On estime que, cette litière fragmentée, sera à son tour consommée par les vers de terre anéciques, la dégradant encore plus et permettant son enfouissement dans le sol. Cette matière organique fortement dégradée va poursuivre son cycle en étant ingérée par les vers de terre endogés et subissant un nouveau processus de dégradation et de dissolution. L'activité conjointe des vers de terre contribue ainsi à l'entrée du carbone dans les sols et va permettre tous les processus physiques, chimiques et biologiques qui vont être décrits ci-après.

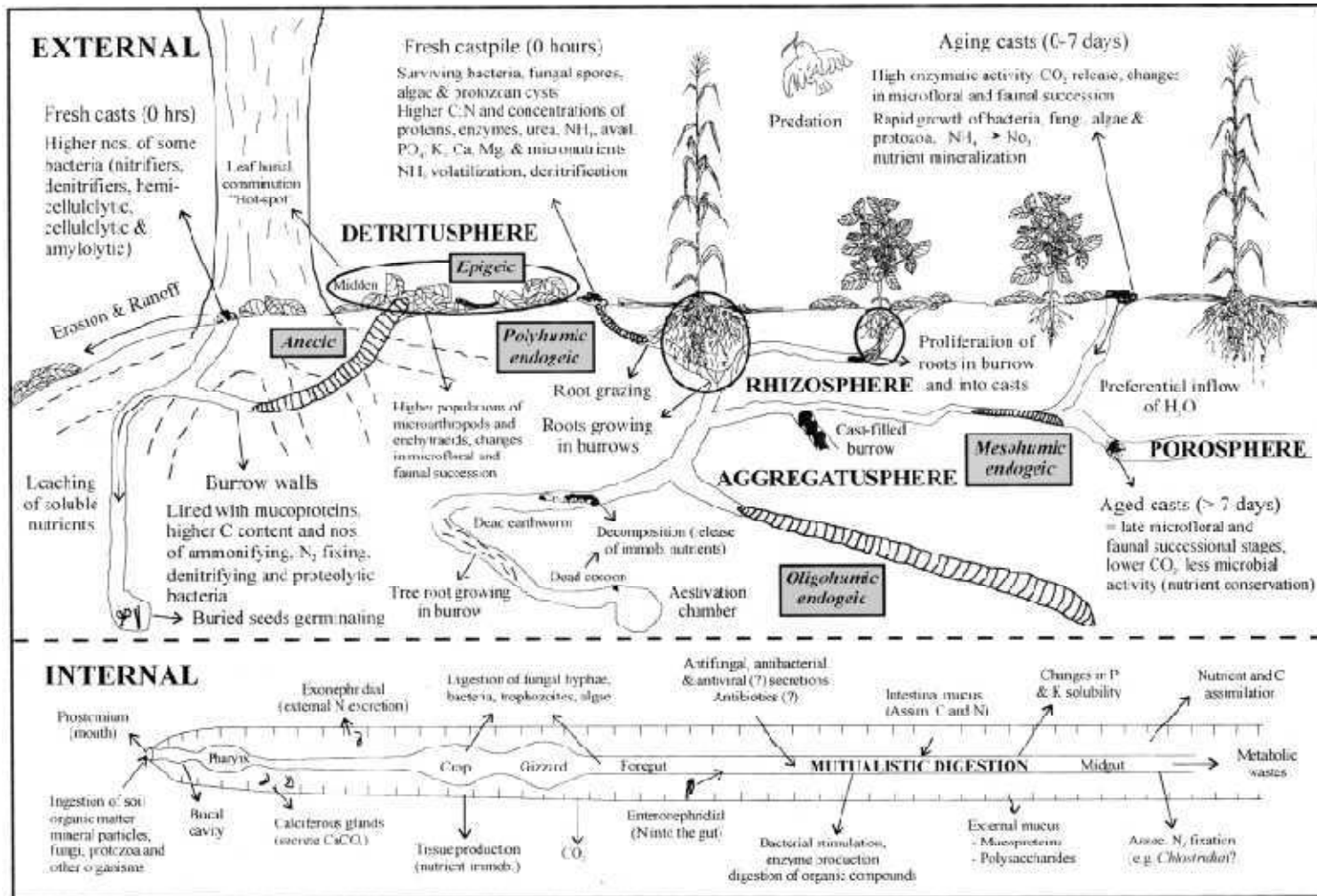


Figure 1 : Schéma des composantes externes (galeries, agrégats, turricules) et internes (en contact avec le corps du vers de terre) de la drilosphère et de leur interaction avec d'autres domaines fonctionnels du sol. Cette interaction va affecter la dynamique de la matière organique ainsi que l'activité microbienne (d'après Brown, 2000).

2.5. La drilosphère

Le concept de « drilosphère », introduit par Bouché (1975) désigne le volume de sol qui est sous influence des vers de terre, délimitant ainsi leurs domaines fonctionnels. Cette zone, concerne toute région de sol ayant été en contact avec des composés excrétés par les vers ou en contact direct avec le vers de terre, que ce soit à sa surface, ayant été ingéré (entrant en contact avec l'appareil digestif) ou encore, toutes les structures laissées par le vers de terre après son passage (turricules et galeries). La drilosphère va pouvoir interagir avec d'autres domaines fonctionnels (Figure 1 et 2) du sol (Brown *et al.*, 2000; Lavelle, 2002). De cette interaction va résulter un effet significatif sur : (1) le volume de la litière, (2) l'agrégation et la porosité du sol et enfin (3) la croissance de la plante en interagissant via sa rhizosphère qui représente la région de sol influencée par les racines et les microorganismes associés. Tous ces changements physiques, chimiques et biochimiques relèvent également de l'activité bactérienne à l'intérieur de la drilosphère, elle-même stimulée par la présence de vers de terre.

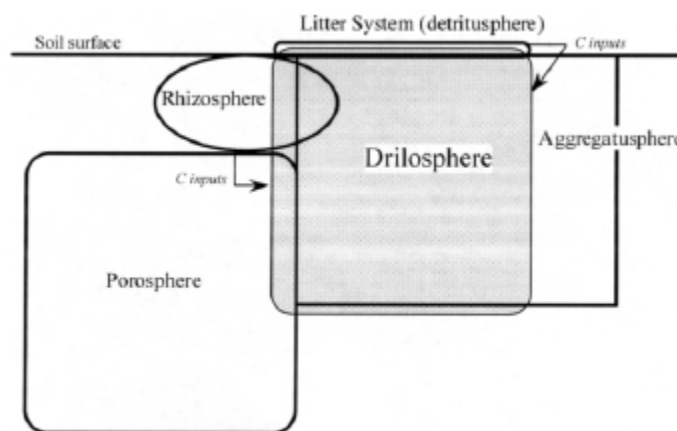


Figure 2 : Représentation de l'interaction de la drilosphère avec les autres sphères de régulation présentes dans le sol (d'après Brown, 2000)

2.6. Impact des vers de terre sur les bactéries du sol

L'impact des vers de terre sur l'activité microbienne peut être expliquée par la métaphore de « la belle au bois dormant » (Lavelle *et al.*, 1995). Les vers de terre sont capables de produire un ensemble de métabolites et autres substances actives, qui vont être bénéfiques à l'activité des microorganismes, lors de leur passage dans le tube digestif du vers

de terre (Lavelle *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2000; Edwards, 2004). Au cours de ce processus, du mucus intestinal chargé en eau et en carbone soluble (le baiser) est produit par le vers de terre (le prince) et va permettre le réveil de certaines bactéries (les belles au bois dormant). Ainsi, pendant et après le passage dans le tube digestif des vers de terre, les bactéries seront fortement actives (Bernard *et al.*, 2012). La forte activité des bactéries va permettre la décomposition des formes stables de matière organique du sol pour lesquelles les vers de terre ne possèdent pas les enzymes adéquates (Lavelle *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2000). Pendant ce processus, la population d'autres organismes (protozoaires, nématodes, champignons) va diminuer. Toutefois, aucun lien direct entre la digestion de ces organismes et l'alimentation des vers de terre n'a été clairement démontré (Curry & Schmidt, 2007).

A la fin du processus de digestion, les populations bactériennes restent encore un temps actives dans les turricules laissés par les vers de terre. Ceci va avoir comme effet d'augmenter la minéralisation et la disponibilité des nutriments. Avec l'âge, l'activité à l'intérieur de ces turricules va décroître jusqu'à retourner à son niveau initial, voir inférieur à celui d'un sol non ingéré, ce qui serait responsable d'une protection de la matière organique.

3. Effets des vers de terre sur les plantes

3.1 Effet des vers de terre sur la croissance des plantes

Jusqu'à aujourd'hui, le nombre d'expériences visant à étudier l'effet des vers de terre sur la croissance des plantes n'a eu de cesse d'augmenter et a fait à ce jour, l'objet de deux revues de synthèse (Scheu, 2003; Brown *et al.*, 2004), référencant respectivement 67 études en milieu tempéré et 246 expériences en milieu tropical. Les questions récurrentes posées par les études référencées portent sur : (1) quantifier l'effet (négatif ou positif) des vers sur la biomasse des plantes, (2) quelles espèces de plantes sont les plus affectées et (3) quelle espèce de vers de terre est la plus efficace dans la promotion de la croissance des plantes (Scheu, 2003; Brown *et al.*, 2004). Ces études mettent en évidence un effet positif des vers de terre sur la croissance des plantes avec un effet positif sur la biomasse aérienne dans 75% des cas pour les vers de terres tropicaux et 79% des cas pour les vers de terre tempérés. Ces études se sont intéressées tout particulièrement à l'effet des vers de terre sur des espèces de plantes d'intérêt agronomique.

Les auteurs de ces deux revues soulignent que les études référencées soulèvent rarement la question du mécanisme via lequel les vers de terre agissent sur la croissance des plantes et sur la fertilité des sols. Dès que le sol rentre en contact avec le tube digestif du vers de terre, il va subir de profonds changements physico-chimiques et biologiques qui affectent l'ensemble du profil du sol. Ces changements sont les facteurs déterminants pour expliquer l'effet des vers de terre sur les plantes et sont fortement dépendants de la classe écologique du vers de terre étudié. De l'interaction entre les vers de terre, les microorganismes du sol et la plante va résulter des bénéfices mutualistes pour chacun des organismes (Figure 3). De cette relation tripartite découle de nombreux services et modifications de l'environnement pouvant influencer la croissance des plantes. Ces modifications étant tant d'ordre physique (modification de la porosité et de l'agrégation), chimique (enrichissement en minéraux et matière organique) que biochimique (via la synthèse de molécules agissant directement sur la physiologie de la plante).

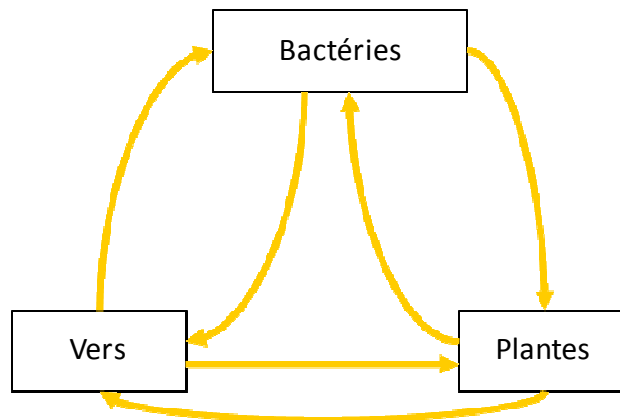


Figure 3 : Schématisation de la relation tripartite entre les vers de terre, les plantes et les microorganismes du sol.

3.2. Mécanismes à l'origine de l'effet des vers de terre sur la croissance des plantes

3.2.1. Modification de l'environnement physique

La relation significative entre l'activité des vers de terre, la fertilité du sol, la structure du sol et la dynamique de la matière organique est depuis longtemps reconnue (Darwin, 1881; Edwards & Bohlen, 1995; Edwards, 2004). Lors de leurs déplacements, les vers de terre

consomment du sol et des résidus organiques qui vont être mixés pendant le passage dans leur tube digestif, pour être finalement excrétés sous forme de turricules. Ce processus va fortement affecter la dynamique de la matière organique, la porosité ainsi que la formation et la stabilité des agrégats de sol par la formation de complexes argilo-humiques.

3.2.1.1. Impact sur la porosité des sols

La création de galeries dans le sol, par les vers de terre, va fortement influencer la porosité de ce dernier. La porosité est le résultat de l'agencement entre les espaces vides et des agrégats de sol de tailles différentes. Cette modification de la porosité va avoir une influence au niveau de la croissance des plante en modifiant les échanges gazeux, la résistance à la pénétration racinaire, la composition biotique de la rhizosphère mais surtout l'infiltration et la rétention de l'eau (Shipitalo & Le Bayon, 2004). Les pores ainsi formés seront remplis avec de l'eau ou de l'air et vont servir d'habitat à de nombreux organismes tel que des bactéries, des protozoaires ou encore des nématodes dans la phase aqueuse et des champignons, racines et microarthropodes dans la phase gazeuse (Brown *et al.*, 2000). En plus d'influencer les habitats de ces organismes, la porosité du sol va également influencer la capacité de rétention de l'eau par le sol. La capacité de rétention de l'eau d'un sol résulte essentiellement des forces de tension superficielles exercées sur les molécules d'eau due aux effets de liaison autour des particules de sol et aux effets de capillarités dans les pores (Gobat *et al.*, 2010). En modifiant la porosité du sol, par la création de galeries, mais aussi en compactant ou décompactant le sol (Blanchart *et al.*, 1997; Blanchart *et al.*, 1999), les vers de terre vont influencer sur l'espacement entre les particules de sol et donc sur la capacité de rétention de l'eau par le sol. Enfin, la modification de la porosité va également influencer sur les processus métaboliques, en changeant notamment les concentrations en O₂ favorisant plus ou moins les processus métaboliques anaérobiques (Brown *et al.*, 2000; Lavelle & Spain, 2001).

L'activité des vers de terre au niveau de la porosité du sol est très dépendante de la catégorie écologique du vers de terre. Une série d'expérience, montre que les galeries créées par des vers de terre anéciques ou endogés ont une bonne conductivité hydraulique. Cependant, l'activité principale des vers de terre endogés ayant principalement lieu sous la surface du sol, il en résulte la création de galeries horizontales souvent obstruées par des turricules. Par conséquent, ils n'influencent probablement pas directement le transport de

l'eau dans le sol (Shipitalo & Le Bayon, 2004). C'est pour cette raison que la plus plupart des recherches se sont centrées autour des vers de terre anéciques tel que *Lumbricus terrestris*, ayant probablement la plus grande action au niveau de la conductivité hydraulique dans le sol, dû à la création de galeries verticales, partant de la surface et allant vers les profondeurs du sol.

3.2.1.2 L'agrégation du sol par les vers de terre

Les vers de terre sont responsables de la majeure partie des agrégats à la surface des sols. Certains auteurs ont établi que 50% des agrégats à la surface des sols tempérés seraient constitués de ces turricules, représentant 40 à 50 t ha⁻¹ an⁻¹ en surface et d'autant plus en profondeur (Six *et al.*, 2004). Il existe deux mécanismes via lesquels les vers de terre vont influencer cette agrégation : (1) la création de galeries et (2) la formation de turricules (Brown *et al.*, 2000).

Lors de leurs déplacements, les vers de terre vont exercer une pression sur le sol environnant et du mucus, essentiellement constitué de polysaccharides et de macro-protéines, va être excrété et déposé sur la paroi des galeries nouvellement formées, stabilisant ainsi leur structure (Edwards & Bohlen, 1995).

Le processus de formation des agrégats dans les turricules est quant à lui différent et influencé par de nombreux facteurs comme l'âge, la qualité de la matière organique ingérée, ainsi que de l'activité des vers de terre elle-même influencée par la disponibilité en nourriture (Six *et al.*, 2004). Une fois de plus, ce processus est fortement dépendant de la catégorie écologique du vers de terre considéré. Toutefois, un processus général exhaustif peut-être proposé quant à la formation de ces agrégats.

Le processus d'agrégation au sein d'un sol est soumis à plusieurs facteurs (Figure 4): (1) la faune du sol, (2) les microorganismes du sol, (3) les systèmes racinaires des plantes, (4) des liants inorganiques et (5) des facteurs environnementaux. Tous ces acteurs interagissent pour conduire à la formation de (1) micro-agrégats (50 - 250 µm), (2) macro-agrégats (> 250 µm) et (3) de micro-agrégats dans les macro-agrégats. La formation de ces 3 composantes est illustrée par la théorie de l'agrégation hiérarchique et est fortement dépendante des facteurs biotiques du milieu (système racinaire des plantes, mycéliums et bactéries) (Oades, 1984; Six

et al., 2004). Parmi la faune du sol, les vers de terre sont les organismes les plus étudiés en relation avec l'agrégation du sol (Six *et al.*, 2004).

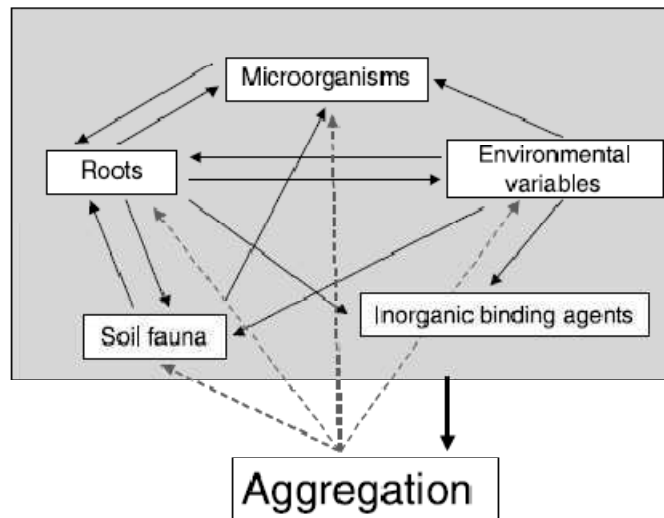


Figure 4 : Schéma de la multiplicité des interactions et rétroactions entre les cinq composantes influençant la formation et la stabilisation des agrégats dans les sols (d'après Six, 2004).

Pendant le transit intestinal, le sol ingéré est entièrement déstructuré jusqu'à l'échelle des micro-agrégats (Shipitalo & Protz, 1988; Barois *et al.*, 1993; Bossuyt *et al.*, 2005). De nouveaux macro-agrégats vont être formés grâce à des agents de liaison (liants) produits par les vers de terre, sous la forme de mucus ou encore de carbonate de calcium (CaCO_3), à l'intérieur de leur tube digestif (Oades, 1984; Shipitalo & Protz, 1989; Edwards & Bohlen, 1995; Shipitalo & Le Bayon, 2004; Six *et al.*, 2004). Les vers de terre ont également un effet à l'échelle des micro-agrégats. À l'intérieur de leur tube digestif, les débris organiques ingérés vont servir de noyau à la formation de nouveaux micro-agrégats (Shipitalo & Protz, 1989; Barois *et al.*, 1993).

Le processus de formation de micro-agrégats est fortement lié à l'activité microbienne au travers du recouvrement de particules de matière organique en décomposition avec une association de particules d'argile et de substances mucilagineuses (Six *et al.*, 2004; Pulleman *et al.*, 2005; Caesar-TonThat *et al.*, 2007). Ces substances mucilagineuses sont principalement composées de polysaccharides, mais peuvent aussi contenir des acides polyuroniques et divers composés aminés (Caesar-TonThat *et al.*, 2007). Ce processus va se poursuivre dans les turricules excrétés par les vers de terre avec la formation rapide (< 20 jours) de micro-agrégats dans les macro-agrégats. Ce processus va d'autant plus stabiliser la matière organique

contenue dans les turricules, en la protégeant physiquement des bactéries (Bossuyt *et al.*, 2005). L'activité des microorganismes va par la suite décliner à l'intérieur du turricule due à une réduction de la disponibilité des ressources en carbone et azote labile (Lavelle *et al.*, 1989). Ces micro-agrégats ayant incorporé de la matière organique fraîche, seront par la suite rendus disponibles au fur et à mesure de la désintégration des macro-agrégats. Ces micro-agrégats, plus stables que les macro-agrégats vont ainsi contribuer à la protection à long terme du carbone du sol et contribuer au cycle de l'azote et du carbone (Brown *et al.*, 2000).

3.2.2. Modification de l'environnement chimique

La disponibilité en nutriments dans l'environnement est indispensable à la croissance des plantes. Souvent, la limitation en nutriments concerne l'azote, le phosphore et le potassium. La disponibilité de ces nutriments essentiels a déjà été montrée comme étant accrue dans les structures produites par de nombreuses espèces de vers de terre. Les turricules de ces vers de terre présentent une teneur en nutriments élevée pour NH_4^+ , NO_3^- , Mg^{2+} , K^+ et HPO_4^{2-} en comparaison avec un sol non ingéré (Syers *et al.*, 1979; Mackay *et al.*, 1983; Tiwari *et al.*, 1989; James, 1991). Les vers de terre sont des acteurs majeurs au niveau de la circulation des nutriments dans le sol de part la consommation, la fragmentation et le mixage de cette matière organique avec les particules minérales de sol, afin de former des agrégats. L'action des vers de terre au niveau de la concentration des nutriments dans le sol peut être réalisée, par un effet direct via (1) les produits issus de leur propre métabolisme (déchets azotés et mucus), (2) l'ingestion et le brassage de résidus de matière organique avec la microflore dans leur tractus digestif ou (3) via un effet indirect au travers de changements dans leur environnement. Ces changements au niveau de l'environnement peuvent correspondre à une modification de la structure des communautés microbiennes du sol ou au déplacement de résidus de matière organique. Il a ainsi été estimé que les vers de terre au travers d'excrétion, de la production de mucus, ainsi que du passage du sol dans leur tractus digestif, contribuaient fortement à l'apport en nutriments dans les écosystèmes tropicaux comme tempérés, avec un apport en azote estimé de 30 à 50 kg ha⁻¹ an⁻¹ (Curry & Byrne, 1992; Edwards, 2004).

3.2.2.1. Digestion

La digestion de la matière organique par le vers de terre est réalisée dans leur tube digestif au travers d'un ensemble d'enzymes tel que des chitinases, des protéases, des phosphatases ainsi que diverses glucosidases (Brown *et al.*, 2000). Ces enzymes leur permettent de digérer des bactéries, protozoaires, champignons et une partie des débris végétaux. Cependant, la majorité des invertébrés ne possèdent pas les enzymes appropriés afin de digérer la cellulose, la lignine, les tanins ou encore des complexes humiques qui constituent une grande partie des ressources présentes dans le sol (Lavelle *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2000). Néanmoins, il a été observé que certains vers de terre étaient tout de même impliqués dans les processus de dégradation de ces composés (Lattaud *et al.*, 1998a; Lattaud *et al.*, 1998b). Le mécanisme à la base de la digestion de ces composés repose sur une association avec la microflore ingérée et certains microorganismes déjà présents dans le tube digestif, activés au travers de l'effet «belle au bois dormant» (Lavelle *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2000). Ces bactéries, par l'ensemble des enzymes qu'elles sont capables de synthétiser et que ne possèdent pas les vers de terre, vont permettre de réaliser une digestion mutualiste de la matière organique (Lattaud *et al.*, 1998a; Lattaud *et al.*, 1998b; Brown *et al.*, 2000). Durant le processus de digestion par les vers de terre, le ratio carbone/azote va chuter progressivement. La majeure partie de l'azote sera convertie sous forme de nitrate ou d'ammonium. En parallèle, le potassium et le phosphore seront eux aussi convertis en une forme qui les rend disponibles pour la plante (Edwards, 2004).

3.2.2.2. Minéralisation dans les turricules

La digestion mutualiste initiée dans le tube digestif du vers de terre va se poursuivre à l'intérieur des turricules (Lavelle *et al.*, 2004). Les microorganismes du sol réalisent à eux seuls près de 90% des transformations de la matière organique dans les sols (Lavelle *et al.*, 2004). L'activité des microorganismes qui sont rejetés avec les turricules va être stimulée par priming effect et ces microorganismes vont poursuivre la digestion de la matière organique (Lavelle *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2000). Ainsi, les produits issus de cette digestion externe pourront être assimilés de nouveau par les vers de terre ou bien par les plantes.

Au niveau de l'implication des microorganismes dans le cycle de l'azote on peut bien sûr citer les bactéries symbiotiques ou non-symbiotiques capables de fixer le diazote atmosphérique et dont les effets ont déjà été largement étudiés (Hayat *et al.*, 2010). Cependant, aucune influence des vers de terre sur ces populations n'a été démontrée à ce jour. Toutefois, d'autres bactéries, au travers d'activités de nitrification et de dénitrification, sont capables elles aussi, d'intervenir dans le cycle de l'azote (Figure 5). L'activité et l'abondance de ces populations de bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes restent très élevées dans les turricules (Businelli *et al.*, 1984; Parkin & Berry, 1999; Wu *et al.*, 2012), ayant pour conséquence d'accroître les teneurs en NH_4^+ et NO_3^- . Les vers de terre vont également impacter les populations bactériennes intervenant dans la solubilisation et la minéralisation du phosphate inorganique (Rodríguez & Fraga, 1999; Wu *et al.*, 2012) ainsi que sur la solubilisation du potassium (Wu *et al.*, 2012).

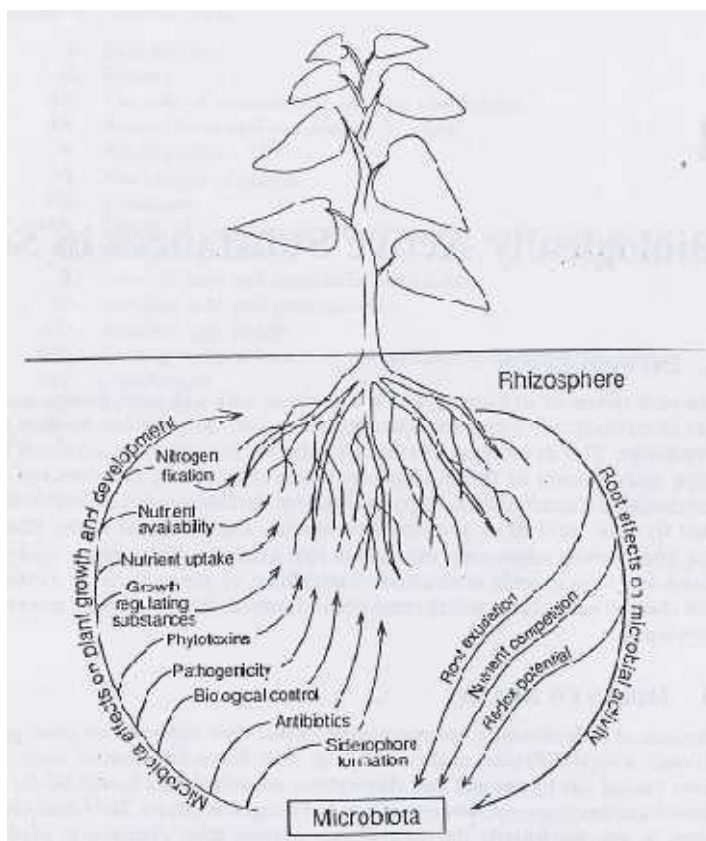


Figure 5 : Mécanismes putatifs d'interaction entre la plante et les micro-organismes du sol (d'après Frankenberger, 1995)

3.2.3. Modification de l'environnement biologique et biochimique

En modifiant le milieu biologique, notamment l'activité des microorganismes du sol, les vers de terre vont fortement modifier les processus biochimiques qui leur sont associés. L'implication d'une modification de l'environnement biochimique par les vers de terre est un facteur déterminant dans la compréhension de situations où des changements dans la structure du sol ou dans la disponibilité en nutriments ne permettent pas à eux seuls d'expliquer l'effet des vers de terre sur la physiologie et la croissance des plantes (Tomati *et al.*, 1988; Blouin *et al.*, 2005; Blouin *et al.*, 2006; Laossi *et al.*, 2010). L'hypothèse selon laquelle l'effet des vers de terre impliquerait des composés ayant un effet régulateur sur la croissance des plantes fût proposée par Gravilov (1963). Cette hypothèse fût appuyée par l'isolation, dans les tissus de vers de terre, de nombreuses molécules régulatrices de la croissance des plantes, essentiellement des molécules issues de la famille des indoles (Nielson, 1965). Par la suite, cet effet a été confirmé pour d'autres espèces de vers de terre (Nardi *et al.*, 1988; Tomati *et al.*, 1988). Ces études ont également montré que ces substances stimulaient la rizhogenèse et la croissance racinaire selon un processus proche de l'action de certaines phytohormones notamment de l'auxine, une des phytohormones majeures, contrôlant de nombreux processus de croissance chez la plante (Hooykaas *et al.*, 1999; Taiz & Zeiger, 2010). De plus, dans certaines de ces études, de l'Acide Indole Acétique, une des formes majoritaires de l'auxine endogène, a été isolée (Tomati *et al.*, 1988; Muscolo *et al.*, 1998; Canellas *et al.*, 2002). Concernant l'origine de ces composés, aucune de ces expériences n'excluent que ces composés proches des phytohormones soient produits par les microorganismes vivant dans le tube digestif du vers de terre ou restant dans les structures biogéniques laissées par ce dernier (Tomati *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 2004). D'autant plus qu'à ce jour, rien dans la littérature concernant les oligochètes ne suggère qu'ils soient capables de synthétiser ces composés.

La synthèse de ces composés par les microorganismes du sol a depuis longtemps été observée (Frankenberger & Arshad, 1995; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Ping & Boland, 2004; Hayat *et al.*, 2010). Toutefois, l'impact des vers de terre sur ces communautés de microorganismes a été peu étudié. On peut postuler que par les changements dans la diversité et la densité de ces communautés par les vers de terre, la production de ces composés et les processus biochimiques associés (Figure 5) vont être fortement modifiés.

4. Effet des microorganismes sur les plantes

La capacité des micro-organismes du sol à produire des molécules régulatrices (Figure 5 et 6) de la croissance des plantes est depuis longtemps reconnue et référencée (Frankenberger & Arshad, 1995; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Ping & Boland, 2004; Hayat *et al.*, 2010). Ces micro-organismes peuvent avoir des effets bénéfiques sur la croissance des plantes en interférant avec la rhizosphère (Figure 1 et 2). Elles promeuvent ainsi leur croissance, limitent l'attaque de pathogènes ou encore améliorent la qualité du sol. Ces effets sur les plantes ont amené les microbiologistes à les regrouper sous le nom de Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), terme introduit par Kloepper et Schroth (1978). Généralement, le mode d'action des PGPR suit 3 axes majeurs (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Hayat *et al.*, 2010) : (1) la synthèse de composés interagissant directement avec la physiologie des plantes, (2) en facilitant le prélèvement de certains nutriments du sol et (3) en diminuant ou en prévenant les maladies causées par des phytopathogènes.

4.1. Production de molécules phytostimulantes

Les bactéries du sol sont connues pour être capables de produire un large spectre de molécules actives sur la physiologie des plantes (Figure 6). Ces molécules vont agir notamment au niveau de la morphogénèse racinaire (production de poils absorbants et de racines latérales), pouvant conduire à une optimisation du prélèvement des nutriments et de la synthèse d'exsudats par la plante (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Spaepen *et al.*, 2007). Ces rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) synthétisent et excrètent des hormones végétales, qui sont des substances organiques interagissant avec la physiologie de la plante à des doses très faibles (Frankenberger & Arshad, 1995; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Hayat *et al.*, 2010). La production de phytohormones par les microorganismes est très connue notamment au niveau des mécanismes de morphogénèse pour l'établissement d'une relation symbiotique, c'est-à-dire avec un contact physique, entre la plante et un microorganisme (Spaepen *et al.*, 2007). La production de phytohormones a été étudiée par la suite chez d'autres organismes de la rhizosphère, non symbiotiques (Hayat *et al.*, 2010). Même si la production de certaines phytohormones, comme celles de la famille des gibbérellines ou encore des jasmonates ne semblent que faiblement produites par les bactéries

du sol, la capacité à produire des phytohormones de la famille des auxines, des cytokinines ou encore de l'éthylène, semble largement répandue au sein des microorganismes de la rhizosphère (Frankenberger & Arshad, 1995; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Hayat *et al.*, 2010).

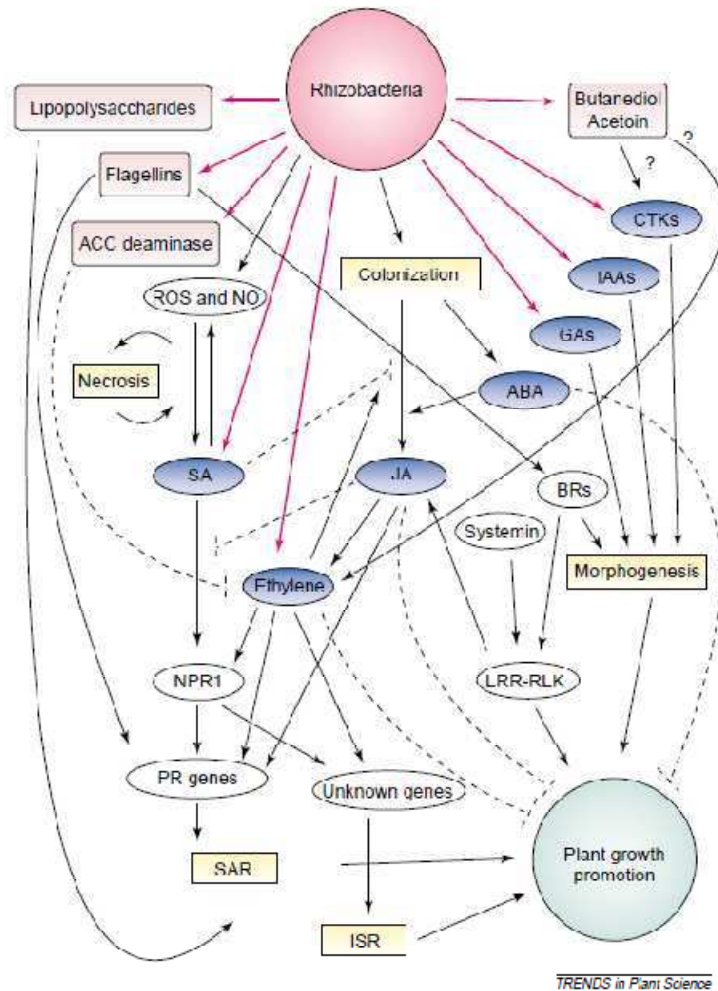


Figure 6 : Réseau des cascades signalétiques impliquées dans l'augmentation de la croissance végétale par les rhizobactéries. Les lignes épaisses roses indique les sécrétions ou composés bioactifs émis par les rhizobactéries. Certaines bactéries produisent des phytohormones (ovales bleus) tels que des cytokinines (CTKs), des acides indoles acétiques (IAAs) et des gibbérélines (GAs). L'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène accroissent l'immunité de la plante en activant des programmes de défense. Les rectangles rose clair représentent des éliciteurs de cascades signalétiques exsudés. Les flagellines élicitent les gènes PR via la voie des brassinostéroïdes (BRs) et en aval, via les kinases réceptrices de leucine (LRR-RLK). La 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase réduit la production d'éthylène réductrice de croissance. Le 2R,3R-butanediol et l'acétoïne agissent apparemment via la cytokinine et l'éthylène. Les flèches noires continues représentent des voies de signalisation active ; les lignes brisées indiquent des effets inhibiteurs. Abréviations: ABA, acide abscissique; ISR, résistance systémique induite; NO, oxide nitrique; NPR1, répresseur des gènes PR; PR, protéines relatives aux pathogènes; SAR, résistance systémique acquise; ROS, composés réactifs à l'oxygène (d'après Ping and Boland, 2004), Trends in Plant Science.

4.1.1. L'auxine

Au sein de ces phytohormones, l'auxine a reçu une attention toute particulière, notamment au niveau de sa forme endogène la plus active, l'acide indole acétique (IAA). L'auxine est connue pour stimuler des processus comme l'élongation cellulaire, la division et différenciation cellulaire ou encore des processus de défense chez la plante (Spaepen *et al.*, 2007). Les bactéries possèdent une voie de biosynthèse de l'auxine qui leur est propre (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Cependant, la biosynthèse se réalise généralement à partir du même précurseur que pour la biosynthèse chez la plante (Figure 7), c'est-à-dire le tryptophane (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). La gamme de concentration optimale de cette phytohormone est très étroite, conduisant à des effets tantôt stimulateurs ou tantôt négatif sur la croissance des plantes (Nehl *et al.*, 1996), comme démontré avec des souches surproduisant de l'auxine (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003) ou encore avec une taille d'inoculum trop importante (Persello-Cartieaux *et al.*, 2001).

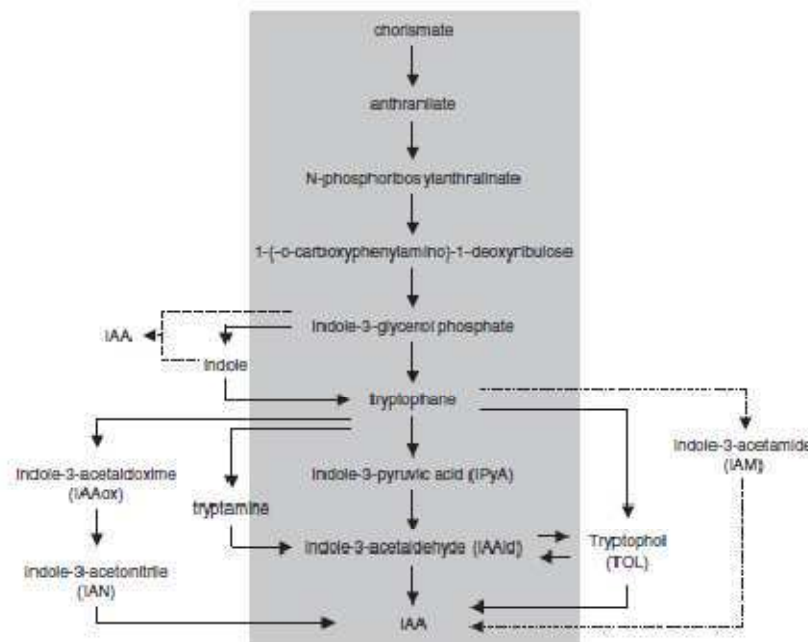


Figure 7 : Voie de biosynthèse de l'auxine par les plantes et les bactéries : à partir du tryptophane (.....); indépendamment du tryptophane (---). La voie de biosynthèse à partir du tryptophane (.....) dépendante de l'activité de l'enzyme Indole-3-acétamide est répandue au sein des microorganismes du sol (Pollmann *et al.*, 2009; Lehmann *et al.*, 2010). La voie de biosynthèse grisée représente la voie de biosynthèse majoritaire chez les plantes (d'après Persello-Cartieaux, 2003).

4.1.2. L'éthylène

Une autre phytohormone ayant été largement étudiée dans les interactions plantes-microorganismes est l'éthylène (Figure 6), plus précisément son précurseur, le 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). L'éthylène est une phytohormone qui intervient chez la plante dans des processus de croissance et de développement mais également dans des mécanismes de défense. L'éthylène peut-être produit directement par les bactéries du sol, mais cette production est souvent associée à des effets délétères (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Il semblerait que l'effet de l'éthylène sur la stimulation de la croissance des plantes passe par une modification de la production d'auxine par les bactéries du sol. La plante soumise à de l'auxine exogène, produite par ces bactéries, va alors synthétiser de l'ACC. Cet ACC va être hydrolysé en ammonium et α -ketobutyrate au travers de l'activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (ACC désaminase) de certaines enzymes bactériennes (Hontzeas *et al.*, 2004; Arshad *et al.*, 2008). Ceci va avoir pour conséquence une réduction de la quantité d'ACC dans le sol. Par la réduction de la quantité d'éthylène, les effets sur l'inhibition racinaire vont être levés.

La balance entre la biosynthèse d'auxine et d'éthylène va déterminer les effets sur la croissance des plantes, à savoir un effet délétère ou bien un effet stimulant. Cet effet collaboratif entre ces deux phytohormones se retrouve également à l'intérieur de la plante, où elles sont connues pour être synergiques dans les processus d'élongation et formation de poils absorbants et antagonistes dans les processus de formation de racines latérales et de l'élongation de l'hypocotyle (Muday *et al.*, 2012).

4.1.3. Autres phytohormones

D'autres phytohormones produites par les bactéries du sol et ayant un effet sur la morphogénèse ont été isolées. Cependant, ces composés se retrouvent en moins grande quantité et souvent leur isolation et quantification sont plus difficiles. Parmi ces composés, la famille des cytokinines joue avec les auxines un rôle important sur le développement de la plante notamment au niveau de processus de division cellulaire (Hooykaas *et al.*, 1999). Une autre classe de composés ayant un effet sur la morphogénèse des plantes est à distinguer des phytohormones. Ces molécules sont des composés organiques volatiles (VOC) qui ont été décrits à de multiples reprises comme ayant un impact direct sur la morphogénèse des plantes

(Ryu *et al.*, 2003; Ping & Boland, 2004; López-Bucio *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007a). Cependant, leur mode d'action sur la physiologie de la plante n'a pas encore été élucidé et selon le type de composé il pourrait interagir (Zhang *et al.*, 2007a) ou non (López-Bucio *et al.*, 2007) avec la voie signalétique de l'auxine chez les plantes.

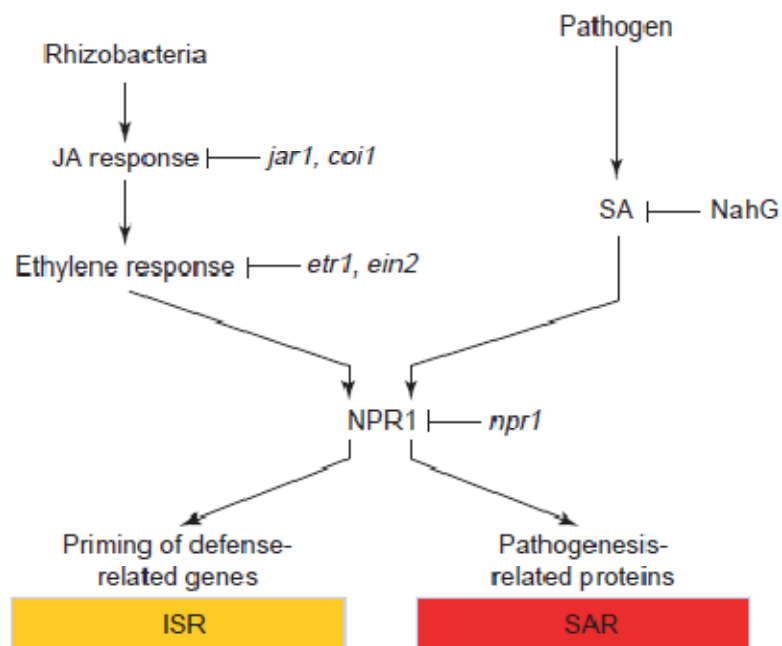
4.2. Optimisation du prélèvement des nutriments par la plante

La question de la promotion de la croissance des plantes par les vers de terre via une augmentation de la disponibilité en nutriments a déjà été abordée. Cette augmentation de la disponibilité en nutriments peut être réalisée par la stimulation de certaines bactéries du sol. Ces bactéries vont minéraliser la matière organique et transformer certains nutriments afin de les rendre plus disponibles pour la plante. Cependant, la promotion de la croissance à travers un mécanisme trophique, peut-être aussi réalisée à travers l'optimisation du prélèvement de ces nutriments par la plante. Certaines études ont montré que les substances humiques, dérivées de la digestion par les vers de terre, avaient un effet proche de celui de l'auxine au niveau de la croissance des plantes (Nardi *et al.*, 1988; Tomati *et al.*, 1988; Nardi *et al.*, 2002). Dans la continuité de ces études, il a été démontré que ces substances humiques, en plus de leur impact direct sur la croissance des plantes, ont un impact sur l'activité des H⁺-ATPase membranaires (Canellas *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004). La stimulation de ces H⁺-ATPase peut faciliter la nutrition minérale chez les plantes en augmentant le gradient de protons qui contrôle le transport ionique à travers les membranes des cellules (Morsomme & Boutry, 2000). De plus, l'expression du gène codant pour le transporteur membranaire de nitrate NRT1.1 (CHL1) peut être régulé par de l'auxine exogène (Guo *et al.*, 2002; Krouk *et al.*, 2010) et en présence d'acides humiques produits par les vers (Quaggiotti *et al.*, 2004).

4.3. Effet sur les mécanismes de défense de la plante

Certaines PGPR, sont capables d'améliorer la performance des plantes en activant des résistances systémiques chez ces dernières (Figure 6), leur conférant ainsi un large spectre de résistance face à de nombreux pathogènes et insectes (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Ryu *et al.*, 2004; Bakker *et al.*, 2007; van Wees *et al.*, 2008; Hayat *et al.*, 2010). On distingue deux types de résistances systémiques : la résistance acquise et la résistance induite. La résistance systémique acquise (SAR) repose sur la synthèse d'acide salicylique (SA) par la plante

(Figure 7), conduisant à une accumulation locale de Pathogenesis-Related Proteins (protéines PR). L'activation de ce mécanisme est causée par l'interaction avec un pathogène (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; van Loon *et al.*, 2006; van Wees *et al.*, 2008). L'autre mécanisme est celui de la résistance systémique induite (ISR). Contrairement à la SAR, l'ISR n'est pas dépendant de l'acide salicylique mais de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène. L'ISR est généralement induite lors de l'interaction avec des rhizobactéries non pathogènes et résulte en l'activation de gènes impliqués dans des mécanismes de défense, conférant une réponse plus rapide et efficace lors de l'attaque d'un pathogène. Contrairement à la SAR, l'ISR n'implique pas une production de protéines PR, excepté la protéine PR-4 qui peut-être induite lors d'une ISR (van Loon *et al.*, 2006). Les voies de signalisation de ces 3 phytohormones (Ethylène, SA et JA) se recoupent, permettant ainsi à la plante d'adapter le mécanisme de défense au pathogène rencontré (Figure 8).



TRENDS in Plant Science

Figure 8 : Voie de signalisation de la résistance systémique acquise (SAR) et induite (ISR) et de leur interaction. La SAR est induite lors de l'infection par un pathogène avirulent ou lorsque l'attaque d'un pathogène virulent est confinée. Ce mécanisme de défense dépend de la synthèse en acide salicylique (SA) par la plante conduisant à une accumulation locale de Pathogenesis-Related Proteins (protéines PR). Le mécanisme de résistance systémique induite (ISR) est quant à lui induit par certaines bactéries de la rhizosphère non virulentes. Ce mécanisme dépend de l'acide jasmonique et de l'éthylène. Ces deux mécanismes (SAR et ISR) requièrent une protéine fonctionnelle NPR1 (non-expressor of PR genes). Ce régulateur transcriptionnel va permettre à la plante de finement réguler les mécanismes de défense en fonction du pathogène rencontré (d'après van Loon, 2006).

4.3.1. Production de composés interagissant avec les mécanismes de défense de la plante

Les microorganismes du sol peuvent interagir directement avec les mécanismes de défense de la plante au travers de la synthèse d'acide salicylique (SA) ou d'1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), induisant un mécanisme de résistance acquise (SAR) ou induite (ISR) respectivement. La production de composés de la famille des jasmonates par les microorganismes du sol n'a à ce jour pas encore été démontrée. Les bactéries sont capables de produire un large spectre de molécules ayant un effet direct sur les mécanismes d'ISR. La flagelline, une des composantes majeures du flagelle des bactéries flagellées, est un éliciteur bactérien des mécanismes de défense chez les plantes (Bakker *et al.*, 2007). Ces éliciteurs sont des molécules présentes à la surface des certains microorganismes. Ces molécules présentent un motif qui a été conservé au cours de l'évolution et qui est spécifique à ces organismes. A travers un mécanisme de reconnaissance de ces molécules de petite taille, l'activation de la cascade signalétique qui en résulte va ainsi induire le mécanisme d'ISR (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Bakker *et al.*, 2007). Les lipopolysaccharides sont d'autres éliciteurs bactériens. Présents à la surface de bactéries phytopathogènes mais aussi de certaines PGPR (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Bakker *et al.*, 2007), ils ont également un rôle au niveau de l'activation des mécanismes de défense chez la plante. Enfin, une régulation de ce mécanisme de défense induite (ISR) a également été mis en évidence en réponse à divers composés organiques volatiles, permettant d'avoir une réduction des symptômes associés à l'infection par le pathogène (Ping & Boland, 2004; Ryu *et al.*, 2004).

4.3.2. Autres molécules

Un autre mécanisme utilisé par les PGPR, et leurs conférant un rôle d'agent de bio-contrôle, est la synthèse de composés agissant directement sur le pathogène ou bien en leur permettant d'entrer en compétition avec ce dernier. Parmi le spectre des molécules pouvant être synthétisées on peut retenir les sidérophores. Ces molécules sont capables de former des complexes avec le fer contenu dans le sol, principalement les ions Fe^{3+} , créant une compétition avec certains organismes phytopathogènes pour cette ressource (Bakker *et al.*, 2007; Hayat *et al.*, 2010). Les synthèses de composés antibiotiques ou antifongiques ont

également été reportées chez de nombreuses bactéries. Ces molécules, ne vont pas interagir avec la plante mais directement avec l'agent phytopathogène (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Bakker *et al.*, 2007; Hayat *et al.*, 2010).

4.3.3. Effet des vers de terre sur les mécanismes de défense de la plante

Excepté pour une étude (Elmer, 2009), l'interaction des vers de terre avec ces populations de PGPR, capables de promouvoir la croissance des plantes, via la synthèse de nombreux composés proches des hormones végétales reste à démontrer. Cependant, l'effet des vers de terre, sur la réduction de la sévérité de nombreuses maladies, a été démontré à de nombreuses reprises (Stephens *et al.*, 1993; Stephens *et al.*, 1994; Stephens & Davoren, 1995; 1997; Clapperton *et al.*, 2001; Wolfarth *et al.*, 2011). Leurs effets sur la réduction de certaines maladies chez les plantes sont souvent associés à une meilleure nutrition des plantes ou encore à un effet de prédation par le vers de terre. Cependant, ces hypothèses ne suffisent pas dans certains cas à expliquer l'effet observé des vers sur la réduction de la maladie (Blouin *et al.*, 2005; Elmer, 2009). L'hypothèse d'une action combinée avec certains microorganismes du sol afin de produire des composés antibiotiques et/ ou d'induire des réponses systémiques de défense chez la plante est une hypothèse parcimonieuse pour expliquer l'effet des vers.

5. Problématique

Les vers de terre sont responsables de profonds changements des propriétés physiques, chimiques et biochimiques du sol. Ces modifications font pour la plupart intervenir les bactéries du sol, dont la diversité et la densité est fortement modifiée par les vers de terre. En plus d'un impact direct sur le sol, toutes les structures biogéniques (galeries et turricules) laissées par les vers de terre vont continuer à être actives bien après avoir été produites (Brown *et al.*, 2000) et vont être source d'hétérogénéité dans les sols. L'impact des vers de terre et des microorganismes du sol sur la modification des propriétés physiques et chimiques du sol a été déjà largement étudié. Inversement, l'impact des vers de terre sur les propriétés biochimiques du sol reste à ce jour faiblement documenté. Pourtant, ces molécules sont des éléments déterminants pour la physiologie des plantes.

L'importance de la production de molécules signal par les microorganismes du sol et de leur action sur les plantes a depuis longtemps été mise en évidence. Cependant, l'effet des vers de terre sur la production de ces molécules demeure quasi inconnu malgré l'omniprésence des vers de terre dans les sols. A ce jour, une des seules pistes suggérant une action des vers de terre au niveau de la production de molécules signal est l'isolement d'une hormone végétale (l'acide indole acétique, une des formes de l'auxine) dans des substances humiques.

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'implication des molécules signal produites en présence de vers de terre tout en évitant que d'autres mécanismes ne puissent être responsables des effets observés (voir Synthèse bibliographique). Ceci va nous permettre de déterminer si les molécules signal produites dans le sol à un certain rythme, résultant en une concentration donnée, sont capables d'avoir un impact significatif sur la croissance des plantes. Un autre objectif de ce travail a été de quantifier et d'étudier la façon dont la plante s'adapte à la présence de vers de terre. Par cette approche *en immersion* dans les mécanismes physiologiques de la plante, nous comptons à la fois apporter des informations sur les mécanismes fins impliqués dans la réponse de la plante, et confirmer nos hypothèses sur la nature des mécanismes écologiques impliqués dans l'effet des vers sur les plantes.

Résultats et discussions

**Chapitre 1 : Etude de la réponse morphologique et physiologique
d'*Arabidopsis thaliana* à la présence du ver de terre
*Aporrectodea caliginosa***

Avant propos

L'effet des vers de terre sur la plante a souvent été attribué à un mécanisme trophique ou encore à une modification physique de l'environnement (Brown *et al.*, 2004). Cependant, ces deux mécanismes ne permettent pas d'expliquer à eux seuls l'effet observé des vers de terre lors de certaines études (Blouin *et al.*, 2006; Blouin *et al.*, 2007b; Laossi *et al.*, 2010). Une hypothèse parcimonieuse afin d'expliquer ces effets serait l'implication de molécules signal dont la quantité dans les sols semble modulée par les vers de terre (Tomati *et al.*, 1988; Muscolo *et al.*, 1998; Canellas *et al.*, 2002; Canellas *et al.*, 2011). Ces molécules signal, vont interagir avec les voies de signalisation hormonales des plantes. De cette interaction va résulter une modification profonde de la croissance et de la physiologie des plantes, même si ces molécules sont produites à de faibles concentrations. Cependant, l'implication de ces molécules signal comme mécanisme impliqué dans l'effet des vers de terre sur la croissance des plantes reste à démontrer par un isolement du facteur « ver de terre », en conditions de laboratoire. Une analyse originale permettant d'obtenir de nouvelles informations sur ce mécanisme consiste à utiliser les outils développés en sciences du végétal afin de caractériser l'état physiologique de la plante pour se renseigner sur les mécanismes écologiques qui l'influencent.

Dans une première étude, un turricule (dégénération de vers de terre) a été introduit dans un dispositif de culture *in vitro*. Les molécules ayant diffusé du turricule vers le gel d'agar ont eu un impact négatif sur la croissance d'*Oryza sativa* et positif sur la croissance de *Lolium perenne*. Dans une deuxième étude, *Arabidopsis thaliana* col-0 ou ayant subi une mutation de deux gènes impliqués dans le transport de l'auxine (*AUX1* et *AXR4*) a été cultivée en présence de vers de terre. Ce double mutant *aux1-7 ; axr4-2*, présentant un phénotype nain dans les substrats de culture classiques, a été caractérisé comme retrouvant un phénotype normal dans un milieu contenant de l'auxine (Hobbie & Estelle, 1995). Dans notre expérience, ce double mutant présente un phénotype nain en absence de vers de terre, tandis que son phénotype est identique à celui de la plante sauvage en présence de vers de terre. Ces résultats suggèrent une production de molécules signal en présence des vers de terre. Ces molécules signal semblent interagir avec la voie de signalisation des auxines.

Enfin, une étude du transcriptome d'*Arabidopsis thaliana* en présence de vers de terre a été réalisée. Les résultats de cette analyse montrent que les vers de terre sont responsables

de l'induction de nombreux gènes impliqués dans les mécanismes de défense de la plante. Ces mécanismes de défense sont sous contrôle de deux hormones végétales, les jasmonates et l'éthylène. Ce mécanisme implique l'induction de résistance systémique (ISR) par la reconnaissance par la plante de certaines populations de PGPR. Ceci confère à la plante une meilleure réactivité et résistance face à des stress d'origine biotique. De plus, cette analyse transcriptomique présente de fortes similitudes avec d'autres analyses transcriptomiques ayant étudié la réponse d'*A. thaliana* à la présence de bactéries promotrices de la croissance. Ces résultats combinés apportent des arguments en faveur de l'implication d'un mécanisme hormonal pour expliquer l'effet des vers de terre sur les plantes. Ce mécanisme hormonal étant analogue de celui rencontré avec les PGPR semble suggérer que les vers de terre agissent sur la plante via l'activation de PGPR.

Cette étude a fait l'objet d'un article qui a été soumis à PloS One où il a été accepté pour publication.

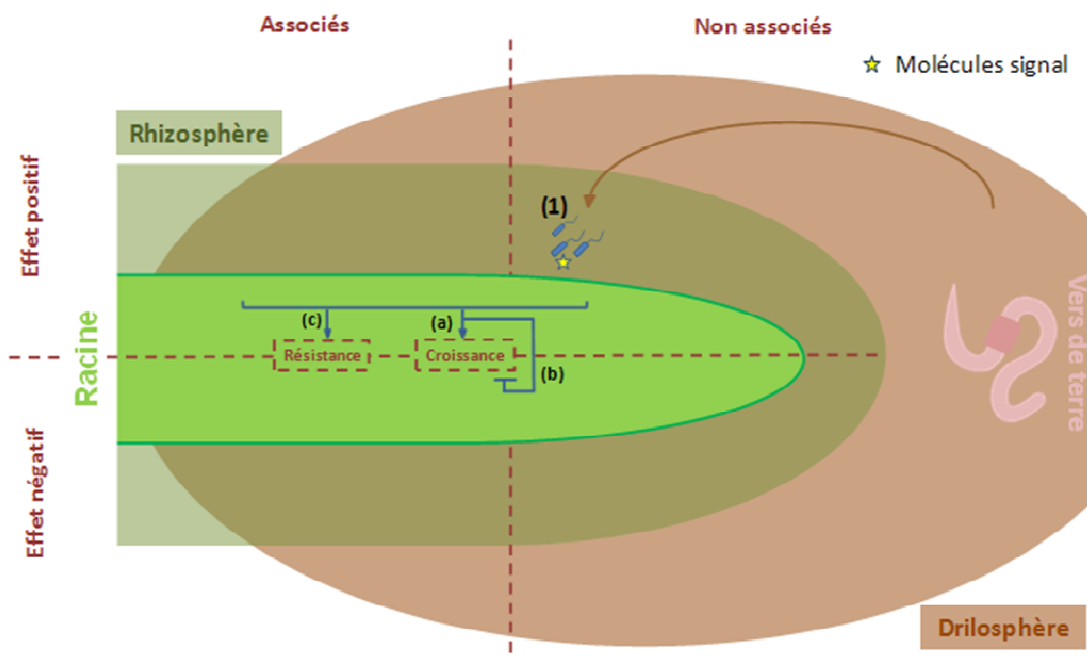


Figure 9 : Synthèse des résultats de l'effet du vers de terre *A. caliginosa* sur la croissance et physiologie des plantes. Le mécanisme à l'origine de l'effet des vers de terre semble impliquer une émission de molécules signal dans la rhizosphère des plantes. Ces molécules pénétrant à l'intérieur du système racinaire vont interagir avec des voies de signalisation hormonale sous contrôle de l'auxine et de l'association jasmonate/éthylène afin d'influencer de manière positive (a) la croissance et (b) le mécanisme de résistance systémique ISR respectivement. Cependant, des effets négatifs sur la croissance d'*O. sativa* et *A. thaliana* col-0 ont été observés. Ces effets seraient dus à une trop grande concentration de ces molécules signal dans la rhizosphère conduisant à (c) un effet inhibiteur sur la croissance de la plante. L'ensemble de ces résultats présentent une forte analogie avec les mécanismes de promotion de la croissance des plantes par les populations de bactéries PGPR (1) suggérant un impact des vers de terre sur cette catégorie de bactéries.

Title

Signal molecules mediate the impact of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* on growth, development and defence of the plant *Arabidopsis thaliana*.

Authors

Ruben Puga-Freitas¹, Sébastien Barot², Ludivine Tacconnat³, Jean-Pierre Renou³, Manuel Blouin^{1*}

Affiliations

¹UMR Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux, Université Paris-Est Créteil, Créteil, France

²UMR Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux, Institut de Recherche pour le Développement, Ecole Normale Supérieure, Paris, France

³Unité de Recherche en Génomique Végétale, INRA/CNRS, Evry, France

***Corresponding author**

Blouin Manuel

blouin@u-pec.fr

tel: +33 1 45 17 16 14

UMR Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux, Université Paris-Est, 61 avenue du Général De Gaulle, 94010 Créteil cedex, France

Abstract

Earthworms have generally a positive impact on plant growth, which is often attributed to a trophic mechanism: namely, earthworm increase the release of mineral nutrients from soil litter and organic matter. An alternative hypothesis has been proposed since the discovery of a signal molecule (Indole Acetic Acid) in earthworm faeces. In this study, we used methodologies developed in plant science to gain information on ecological mechanisms involved in plant-earthworm interaction, by looking at plant response to earthworm presence at a molecular level.

First, we looked at plant overall response to earthworm faeces in an *in vitro* device where only signal molecules could have an effect on plant growth; we observed that earthworms were inducing positive or negative effects on different plant species. Then, using an *Arabidopsis thaliana* mutant with an impaired auxin transport, we demonstrated the potential of earthworms to stimulate root growth and to revert the dwarf mutant phenotype. Finally, we performed a comparative transcriptomic analysis of *Arabidopsis thaliana* in the presence and absence of earthworms; we found that genes modulated in the presence of earthworms are known to respond to biotic and abiotic stresses, or to the application of exogenous hormones. A comparison of our results with other studies found in databases revealed strong analogies with systemic resistance, induced by signal molecules emitted by Plant Growth Promoting Rhizobacteria and/or elicitors emitted by non-virulent pathogens. Signal molecules such as auxin and ethylene, which are considered as major in plant-microorganisms interactions, can also be of prior importance to explain plant-macroinvertebrates interactions. This could imply revisiting ecological theories which generally stress on the role of trophic relationships.

Introduction

Plants grow and evolve in close relation with soils and their inhabitants and have done so for several hundred million years. Among soil organisms, earthworms constitute the most abundant animal biomass in terrestrial ecosystems (Lavelle & Spain, 2001). Reviews of more than 300 assays have revealed that earthworms increase plant growth in 70-80% of cases, with a 56% increase in shoot biomass (Brown *et al.*, 1999; Scheu, 2003). The common interpretation of this positive effect is the increased rate of mineral nutrient release from soil litter and organic matter in presence of earthworms. However, this does not provide any satisfying interpretation for cases where earthworms induce a negative effect on plant growth (Brown *et al.*, 1999; Scheu, 2003), or when they promote an increased plant resistance to parasites (Blouin *et al.*, 2005; Wurst, 2010). Moreover, earthworms may still increase plant growth even when the soil is supplied with nitrogen amounts higher than needed by the plant (Blouin *et al.*, 2006) and their effects do not necessarily decrease with soil fertility (Laossi *et al.*, 2010).

Alternative interpretations for earthworm effect on plant production have been proposed (Scheu, 2003; Brown *et al.*, 2004). Among other hypotheses, signal molecules that mimic plant hormones could be responsible for earthworm impact. Numerous signal molecules can be found in soil. The most widespread are compounds analogous to hormones such as auxins, cytokinins, ethylene, gibberellins, jasmonic and salicylic acids (Frankenberger & Arshad, 1995). All these molecules with a basic role in plant growth and development can be synthesized by soil microorganisms. They can have different impact on plants. For example, auxins and cytokinins are said to increase plant growth through the modification of plant morphogenesis, whereas ethylene, salicylic and jasmonic acids induce a resistance to pathogens (Ping & Boland, 2004).

These molecules can be produced in soil by microorganisms such as the Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and may enter into the roots by diffusion or active transporters; although positive effects of PGPR on plants are common, negative effects have also been reported (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). These bacteria either induce direct changes in plant development thanks to morphogenesis modification, or indirect changes by the biocontrol of plant pathogens or parasites (Bashan & Holguin, 1998; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Transcriptome analyses of *Arabidopsis thaliana* have shown that PGPR may

modify the expression of auxin-responsive genes, as well as genes involved in morphogenesis and defence mechanisms (Cartieaux *et al.*, 2003; Verhagen *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005).

Changes in plant morphogenesis and a higher resistance to pathogens have also been observed in the presence of earthworms (Blouin *et al.*, 2005; Jana *et al.*, 2010) or in the presence of the compost they produce (Arancon *et al.*, 2003; Zaller, 2007). It is acknowledged that humic acids may display hormone-like activity on plant physiology, especially auxin-like effects (Nardi *et al.*, 2002). This effect was also observed with humic substances derived from earthworm faeces (Canellas *et al.*, 2002; Nardi *et al.*, 2002). In addition, indole acetic acid (IAA), which belongs to the auxin family, has already been isolated from humic substances (Muscolo *et al.*, 1998), as well as earthworm compost (Canellas *et al.*, 2002). The origin of these auxin-like compounds is still not well documented, notably due to the difficulty of retrieving and quantifying auxin-like compounds from a natural soil. Whether signal molecules, especially IAA, can be responsible for the positive effect of earthworms on plant growth remains an open issue.

In this work, we used recently developed tools to investigate whether signal molecules could be responsible for earthworm effects on plant growth and development. In this respect, we set up *in vitro* experiments to investigate the potential of earthworm casts to induce significant effects on plant growth via signal molecules. We then focussed on the involvement of molecules related to the auxin signaling pathway by using an *Arabidopsis* mutant with impaired auxin transport. We finally analyzed the transcriptome of *A. thaliana* to identify the main molecular pathways modified in the presence of earthworms and to determine whether these modifications are likely to be caused by signal molecules.

Results

In the *in vitro* experiments, earthworm casts or non-ingested soil (control) with the same weight were confined in a nylon membrane which prevented the growth of bacteria outside of the nylon bag (Figure 1A and 1B).

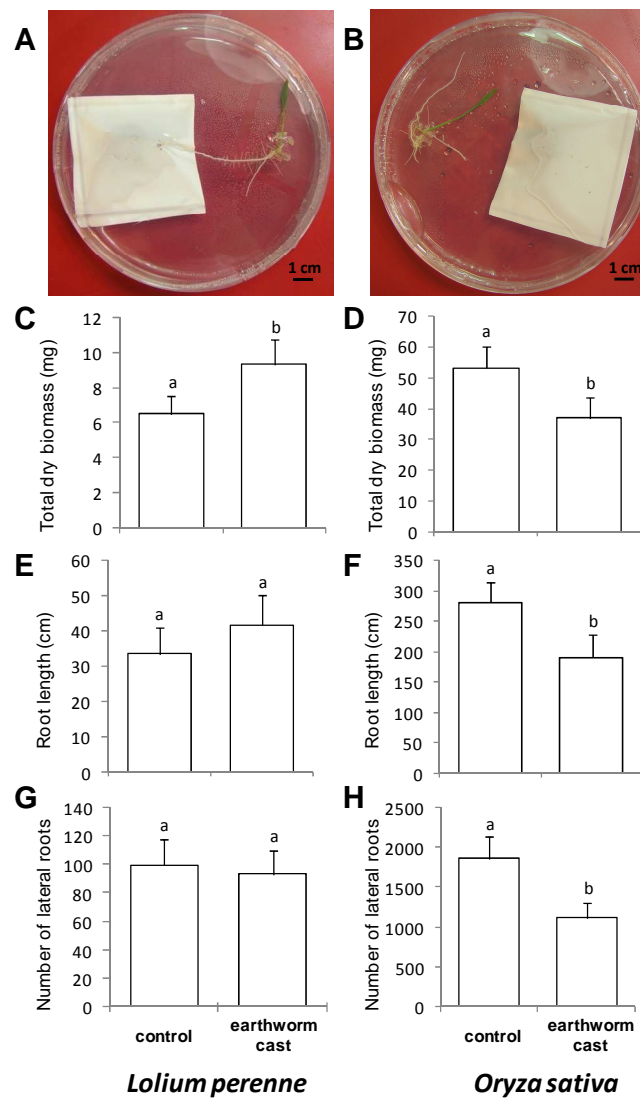


Figure 1. Effect of earthworm casts on plant growth in *in vitro* experiments. Experimental *in vitro* device with *Oryza sativa* in presence of (A) casts of *Aporrectodea caliginosa* or (B) equivalent weight of control soil enclosed into a nylon membrane. Effect of *Aporrectodea caliginosa*'s casts on total biomass production of (C) *Lolium perenne* and (D) *Oryza sativa*. Effect of *Aporrectodea caliginosa*'s casts on root length of (E) *Lolium perenne* and (F) *Oryza sativa*. Effect of *Aporrectodea caliginosa*'s casts on the number of lateral roots of (G) *Lolium perenne* and (H) *Oryza sativa*. Means \pm s.e., n=10 per treatment, different letters indicates a significant difference, Tukey HSD, P < 0.05.

We observed an increased shoot and total biomass production in *L. perenne* by respectively 50 and 43% in the presence of earthworm casts as compared with control soil (Figure 1C). Root length and the number of lateral roots were not significantly affected (Figure 1E and 1G). Opposite results were obtained with *O. sativa* grown in the same conditions: earthworm casts induced a significant decrease in shoot, root and total biomass by respectively 31, 29 and 30% (Figure 1D). Casts were also responsible for a significant decrease in total root length and the number of lateral roots (Figure 1F and 1H).

In a microcosm experiment, we compared the *A. thaliana* response to earthworms casts in wild type and a double mutant with impaired auxin transport (*aux1-7;axr4-2*). The double mutant exhibited a dwarf phenotype in the absence of earthworms: total, aboveground and belowground biomasses were reduced by respectively 94, 94.5 and 86.8% as compared to the wild type (Figure 2A and 2B).

The presence of earthworms had a very strong positive effect on the mutant, by increasing total, aboveground and belowground biomasses respectively by 718, 780 and 307% as compared with the mutant without earthworms. Moreover, the mutant exhibited a 4 fold increase in root length and a 6 fold increase in the number of lateral roots (Figure 2C and 2D), parameters which are strongly influenced by auxin and ethylene. All parameters measured on wild type were affected positively in the presence of earthworms (Figure 2A, 2B, 2C and 2D); for example, root length and the number of lateral roots was 2 to 3 times lower. A two-way ANOVA indicated that the interaction between the factors “genotype” and “earthworm” significantly affected all the morphological and growth parameters that we examined (Table 1).

In the third experiment, we studied the effect of earthworms on *Arabidopsis* transcript abundance. After 42 days, plants in the presence of earthworms exhibited no change in leaf area but a 42% increase in above-ground biomass, conversely to our observation in the second experiment with mutants. No significant differences were observed in root system morphology. Results from two repeated experiments conducted under the same conditions with one week of delay were deposited at Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, accession no. GSE GSE24393) and at CATdb (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb/>; Project: AU07-05_ground-worm) according to the “Minimum Information About a Microarray Experiment” standards. We found a significantly modified transcript abundance of 59 genes (Table 2). The transcript abundance of two genes

was reduced in the presence of earthworms, whereas transcript abundance of 57 genes was increased.

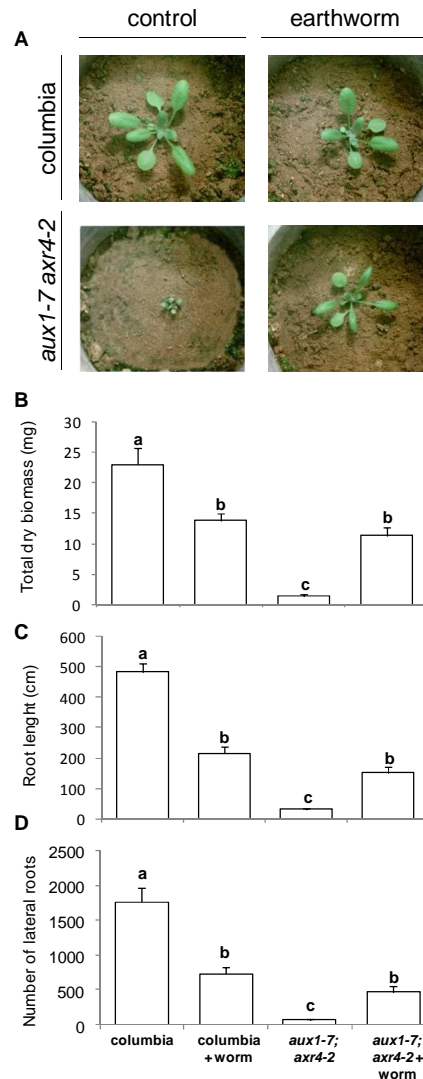


Figure 2. Effects of *Apporetodea caliginosa* on the growth of *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia and *aux1-7;axr4-2* mutant. (A) Picture of *Arabidopsis thaliana* at three weeks after sowing. Effect of the presence of *Apporetodea caliginosa* on (B) total biomass production, (C) root length and (D) the number of lateral roots. Means \pm s.e., n = 5 per treatment, different letters indicates a significant difference, Tukey HSD, P < 0.05.

We confirmed by real-time PCR that transcript abundance of a set of six genes was changing in the same direction than with microarrays (Figure 3). The 59 genes are mainly involved in plant interactions with other organisms such as beneficial or pathogenic bacteria (29%), exogenous hormones applications (15%) or abiotic factors (12%) (Figure 4). Some are involved in basal metabolism (32%) and none of them is known to be specific of mineral nutrition. Genes transcripts involved in defense signaling showed increased accumulation such as WRKY33 and WRKY40, involved in the biosynthesis of camalexin (a major

phytoalexin which inhibits the growth of pathogens) and induced by salicylic acid and avirulent pathogens (Xu *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2006).

Table 1. Impact of the factor “earthworm” and “genotype” on biomass and morphological parameters of *Arabidopsis thaliana*, estimated in a two-ways ANOVA.

	Aboveground dry biomass			Belowground dry biomass			Total dry biomass			Leaf area			Root area		
	Df	F	P-value	Df	F	P-value	Df	F	P-value	Df	F	P-value	Df	F	P-value
Earthworm	1	0.08	0.78	1	0.32	0.58	1	0.05	0.83	1	2.68	0.12	1	4.32	0.05
Genotype	1	55.3	<0.001	1	16.7	<0.001	1	55.1	<0.001	1	135	<0.001	1	113	<0.001
Earthworm*genotype	1	33.2	<0.001	1	21.7	<0.001	1	34.5	<0.001	1	46.6	<0.001	1	65.7	<0.001
Residuals	16			16			16			16			16		

n=20

Transcript abundance of Ethylene Response Factors like ERF11; RAP2.9; ERF104 (a nuclear substrate involved in plant defence) and ERF2 known to induce the overexpression of Pathogenesis-related genes such as PR-4 and Plant Defensins PDF1.2 were also differentially accumulated in response to earthworms.

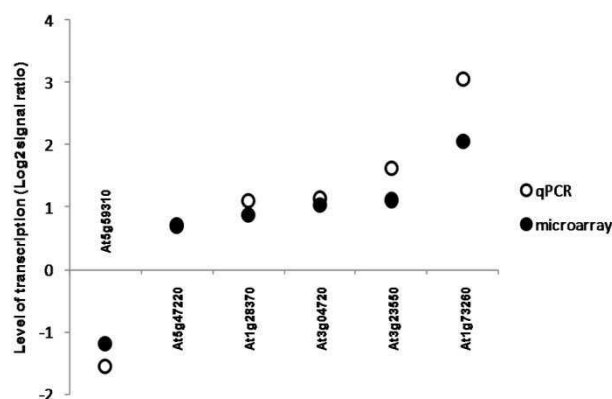


Figure 3. Validation of the results obtained in transcriptomic analysis by real-time polymerase chain reaction (qPCR). Six genes were selected from the 59 differentially expressed genes obtained by transcriptomic analysis (Table 2). Transcript abundance was standardized by reporting it to the constitutive At5g11770 gene. A log base 2 transformation was applied on the average transcript abundance level to obtain data similar to the transformed microarray data.

Abundance of transcripts of the gene PBP1, coding for a Pinoid Binding Protein was also increased; this gene is known to be up-regulated by auxin (Benjamins *et al.*, 2003). In a same way, transcript abundance of the gene coding for a Lipid Transfer Protein (LTP) which belong to the Pathogenesis-related (PR) proteins was also increased, e.g. genes coding for LTP4 and a another member of the LTP family protein (At4g12490) for which transcript abundance was respectively decreased and increased. Transcript abundance for a gene coding

for a putative thionin (At1g66100), which acts synergistically with LTPs for an antifungal activity (Sels *et al.*, 2008), was increased.

Table 2. List of the genes of *Arabidopsis thaliana* differentially expressed in the presence/absence of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* in two replicated experiments.

Locus	Function	Fold change	Pval	Locus	Function	Fold change	Pval
<i>Down-regulated</i>				AT5G54490	PBP1 (PINOID-BINDING PROTEIN 1); calcium ion binding	0,81	2,01E-5
AT5G59310	LTP4 (LIPID TRANSFER PROTEIN 4); lipid binding	-1,18	0,0E+	AT4G24370	unknown protein, phosphorylase family protein	0,84	3,82E-6
AT3G28270	unknown protein	-0,69	3,74E-3	AT4G12490	(LTP) family protein	0,84	3,79E-6
<i>Up-regulated</i>				AT5G57560	TCH4 (TOUCH 4); hydrolase, acting on glycosyl bonds	0,85	2,80E-6
AT3G25780	AOC3 (ALLENE OXIDE CYCLASE 3)	0,63	4,65E-2	AT1G62980	ATEXPA18 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A18)	0,85	2,73E-6
AT4G37520	peroxidase 50 (PER50) (P50) (PRXR2)	0,63	3,90E-2	AT4G31970	CYP82C2 (cytochrome P450)	0,85	2,60E-6
AT1G67980	CCoAMT (caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase)	0,64	2,93E-2	AT1G28370	ATERF11/ERF11 (ERF domain protein 11)	0,88	4,55E-7
AT4G06746	RAP2.9 (related to AP2 9); transcription factor	0,65	2,14E-2	AT1G32920	unknown protein	0,88	3,67E-7
AT3G46620	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	0,65	1,88E-2	AT4G27280	calcium-binding EF hand family protein	0,90	2,00E-7
AT1G76600	unknown protein	0,66	1,42E-2	AT1G80850	methyladenine glycosylase family protein, WRKY40 (WRKY DNA-binding protein 40); transcription factor	0,93	2,94E-8
AT4G36670	mannitol transporter, putative	0,67	8,59E-3	AT1G07135	glycine-rich protein	0,96	6,36E-9
AT1G66100	thionin, putative	0,68	7,01E-3	AT3G55980	zinc finger (CCCH-type) family protein	0,97	2,40E-9
AT2G40140	CZF1/ZFAR1	0,68	4,90E-3	AT2G39030	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	0,99	1,15E-9
AT2G24600	ankyrin repeat family protein	0,69	3,95E-3	AT3G16530	legume lectin family protein	1,00	5,9E-10
AT5G06320	NHL3 (NDR1/HIN1-like 3)	0,70	2,73E-3	AT1G80840	WRKY40	1,04	6,2E-11
AT5G56870	beta-galactosidase, putative / lactase, putative	0,70	2,66E-3	AT3G04720	PR4 (PATHOGENESIS-RELATED 4)	1,04	4,6E-11
AT1G03220	extracellular dermal glycoprotein	0,70	2,63E-3	AT4G12480	pEARL1 1; lipid binding	1,09	0,0E+0
AT2G05510	glycine-rich protein	0,70	2,53E-3	AT3G60140	DIN2 (DARK INDUCIBLE 2)	1,09	0,0E+0
AT2G38470	WRKY33 (WRKY DNA-binding protein 33); transcription factor	0,70	2,22E-3	AT3G23550	MATE efflux family protein	1,11	0,0E+0
AT1G76930	ATEXT4 (EXTENSIN 4)	0,71	1,71E-3	AT3G44300	NIT2 (NITRILASE 2)	1,11	0,0E+0
AT2G26530	AR781	0,71	1,46E-3	AT4G24570	mitochondrial substrate carrier family protein	1,16	0,0E+0
AT5G47220	ATERF-2/ATERF2/ERF2 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 2)	0,71	1,39E-3	AT2G43590	chitinase, putative	1,22	0,0E+0
AT5G61600	ethylene-responsive element-binding family protein	0,72	1,34E-3	AT1G66700	S-adenosyl-L-methionine	1,22	0,0E+0
AT2G05440	glycine-rich protein	0,73	7,69E-4	AT1G11610	CYP71A18 (cytochrome P450)	1,28	0,0E+0
AT3G15450	unknown protein	0,73	6,30E-4	AT4G16260	glycosyl hydrolase family 17 protein	1,40	0,0E+0
AT5G20230	ATBCB (ARABIDOPSIS BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN); copper ion binding	0,73	5,60E-4	AT4G11650	ATOSM34 (OSMOTIN 34)	1,41	0,0E+0
AT4G35770	SEN1 (DARK INDUCIBLE 1)	0,74	4,68E-4	AT5G44420	PDF1.2 (Low-molecular-weight cysteine-rich 77)	1,57	0,0E+0
AT2G35980	YLS9 (YELLOW-LEAF-SPECIFIC GENE 9)	0,76	2,11E-4	AT3G15356	legume lectin family protein	1,59	0,0E+0
AT3G57450	unknown protein	0,78	8,01E-5	AT1G75830	LCR67/PDF1.1 (Low-molecular-weight cysteine-rich 67)	1,76	0,0E+0
AT2G22500	mitochondrial substrate carrier family protein	0,80	3,17E-5	AT1G73260	trypsin and protease inhibitor family protein	2,05	0,0E+0
				AT3G49620	DIN11 (DARK INDUCIBLE 11); oxidoreductase	2,38	0,0E+0

The locus column is corresponding to the Arabidopsis Genome Initiative Identification (AGI ID), the function column is corresponding to the identified function reported in publications or putative function from bioinformatic analyses, the fold change column is corresponding to the Log2 of the ratio of transcript abundance in the treatment reported to the transcript abundance in the control, the Pval column is corresponding to the p-value obtained in a paired t-test performed on the log-ratio, adjusted by the Bonferroni method.

Transcripts of a gene coding for a protease inhibitor (At1g73260), the AR781 pheromone receptor (Segarra *et al.*, 2010), a nitrilase responsible for the production of indole-3-acetic acid during bacterial infection (Bartel & Fink, 1994) (NIT2), a putative chitinase (At2g43590), a lectin like protein whose expression is induced upon treatment with chitin oligomers (Broekaert *et al.*, 1989) (At3g16530) and markers for the Hypersensitive Response associated to plant response to pathogen (Varet *et al.*, 2003) like YLS9 and NHL3 and the transcaffeoyl Coenzyme A 3-O-methyltransferase (At1g67980) involved in the biosynthesis of phenylpropanoid and lignifications which could provide a better plant defence against pathogens by reinforcing cell walls (Busam *et al.*, 1997) were also over-accumulated. By comparing our list of 59 modulated genes with lists from other studies referenced in Genevestigator, we found many genes in common with studies dealing with biotic factors (30%), elicitors of plant defence (25%) or stress (17%) (Figure 5).

Discussion

In *in vitro* experiments, earthworm casts were enclosed into a nylon membrane, on an agar gel with nutrients *ad libitum*, i.e. at a level which satisfied plant needs. As increased mineralization of organic matter in earthworm casts was negligible compared with nutrient concentrations in the agar gel, observed modifications of plant phenotype could not be due to nutrients diffusing from earthworm casts. No microorganisms could exit the nylon membrane because of the mesh size. Consequently, signaling molecules and other small molecular weight compounds could diffuse from earthworm casts to plant roots, but it is easier to image that signaling molecules or hormones, which act at very low concentrations with huge effects on plant growth and development, are the most likely candidates. In this experimental device, we observed significant positive as well as negative effects, according to plant species. This genotype dependant response is typical of a response to signal molecules, and has already been observed for different rice cultivars exposed to the same earthworm species (Noguera *et al.*, 2011). Experimental device and results thus converge towards the involvement of signal molecules in the effect of earthworms on plant growth, although other mechanisms can also be important.

Mutants of *A. thaliana* used in the second experiment had a near-null allele for *AUX1* gene (Hobbie & Estelle, 1995), encoding an auxin influx facilitator protein (Swarup *et al.*,

2004), and a null allele for *AXR4* gene (Hobbie & Estelle, 1995), encoding for the polar localization of the protein encoded by *AUX1* (Dharmasiri *et al.*, 2006; Hobbie, 2006). Despite a slight auxin production in young roots and an auxin discharge from mature leaves in the phloem (Taiz & Zeiger, 2010), impaired auxin transport in mutant is responsible for altered root growth, decreased primary production and dwarf phenotype. The negative effect of earthworms on the wild type and their reversion of the mutant phenotype could be due to either auxin-like compounds, or ethylene, or molecules related to the pathway of one of these hormones. Since this dwarf mutant phenotype is known to be reverted by exogenous auxin application (Hobbie & Estelle, 1995) and auxin-like compounds have been isolated from humic substances (Muscolo *et al.*, 1998) or earthworm compost (Canellas *et al.*, 2002), earthworms could be responsible for an higher exogenous auxin concentration in soil. This auxin could enter root cells, increase intracellular concentration, and restore altered phenotype of the double mutant. We speculate that in the absence of earthworms, the mutant had too low an auxin concentration in root cells to exhibit the same growth rate as the wild type. In the presence of earthworms, additional exogenous auxin supply increased auxin concentration in root cells, which could be responsible for a higher growth rate (Figure 6). Conversely, auxin elevated above wild-type endogenous levels could lead to an inhibitory effect. This is corroborated by the fact that earthworms stimulate cultivable IAA producing bacteria (Puga-Freitas *et al.*, 2012), which could have positive or negative effects on plant growth according to their IAA production level (Nehl *et al.*, 1996; Barazani & Friedman, 1999).

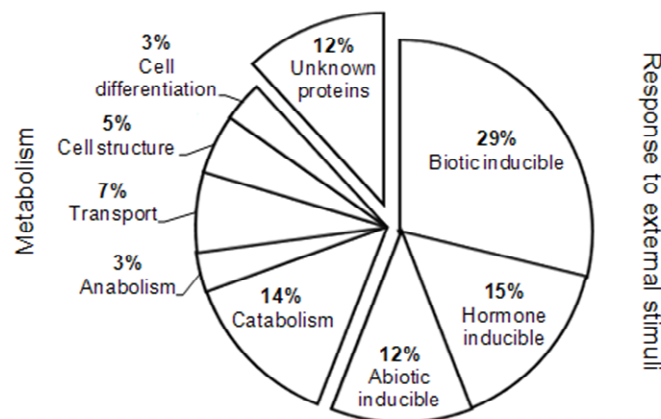


Figure 4. Functions of the 59 *Arabidopsis thaliana* genes differentially expressed in the presence of earthworms. Functional classification was established according to <http://www.arabidopsis.org> and the related publications.

With regard to the ethylene hypothesis, our transcriptomic analysis revealed the involvement of several ethylene response factors. Ethylene inhibition of root growth in *aux1-7* plants is approximately 30% that of wild type at saturating ethylene concentration (Pickett *et al.*, 1990), and enhanced auxin signaling in root tips after ethylene precursor treatment in the wild type is lost in *aux1* mutant (Stepanova *et al.*, 2007).

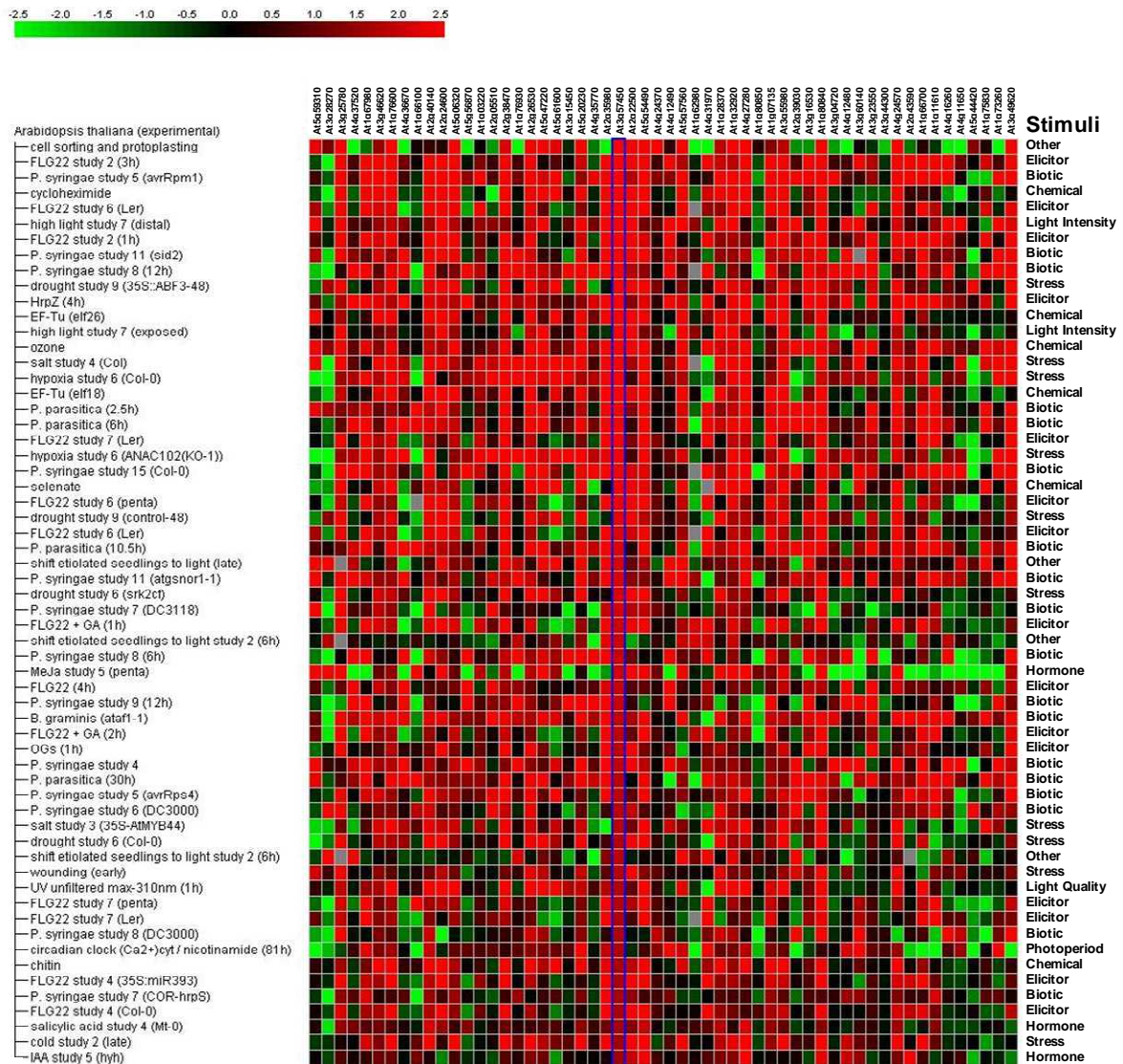


Figure 5. Comparison between genes modulated in the presence of earthworms with other transcriptomic studies. Among our 59 genes, 56 upregulated genes were found in Geninvestigator database (in column). We then select a list of 60 studies (in line), among 54 922 referenced in Genevestigator, exhibiting the most similar directional changes with the 56 genes of our study by choosing the “mosaic” with the highest number of red squares (higher transcript abundance in the treatment as compared with control). Green color is corresponding to a lower transcript abundance for the treatment as compared with the control, and red color is corresponding to higher transcript abundance. Color intensity is corresponding to the fold change in gene transcript abundance.

Auxin and ethylene can have antagonistic effect on lateral root initiation and synergistic effect on root elongation, with reciprocal effects on synthesis and signaling (Muday *et al.*, 2012). As a consequence, the fine-tuning of plant growth and development in the presence of earthworms may be due to auxin, ethylene, or the balance between these hormones. Isolation and quantification of auxin or ethylene emissions in soil is particularly difficult due to their low concentration in the large number of biochemicals present in soils. Auxins are adsorbed on organic matter and the number of purification steps can be responsible for significant losses which prevent comparison between treatments. Ethylene would require a specific experimental device to measure gas emissions, and measuring precursor concentration raise the same concerns than auxin. Therefore, we cannot exclude that earthworm effects were due to a molecule acting upstream of auxin and ethylene.

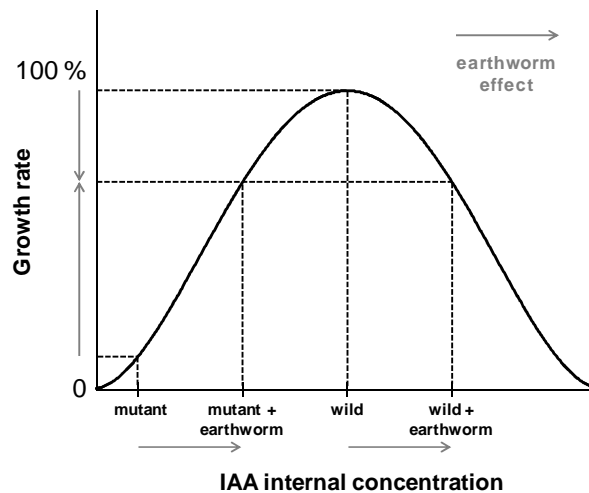


Figure 6. Model explaining contrasting effects of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* on *Arabidopsis thaliana*. This model explains positive as well as negative effects on *Arabidopsis thaliana* wild type and mutant for auxin transport (*aux1-7 axr4-2*). Note that the effect of an exogenous auxin supply in the presence of earthworms is dependent on the initial auxin concentration in root cells.

Finally, small molecules recognized as elicitors of plant defence can be responsible for the activation of ethylene signaling pathway. A comparison of our transcriptomic profile with other results published in Genevestigator showed that observed pattern of differences in transcript abundance was typical from a response to flagellin, an activator of plant defence mechanisms against bacteria, or beneficial and non-beneficial bacteria such as many *Pseudomonas syringae* strains (see Results section). Activation of defence mechanisms together with an increased plant biomass are typical of Systemic Acquired Resistance (SAR) triggered by local infection with an incompatible pathogen (Heil, 1999), or eventually of

Induced Systemic Resistance (ISR) triggered by many Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). These mechanisms are known to be under the control of hormones such as ethylene, salicylic acid and jasmonic acid (Ping & Boland, 2004).

We observe contrasted effects of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* on the growth of *Arabidopsis thaliana* depending on the considered experiment: a negative one on 23 days old plants in the experiment with mutants, but a positive one on 42 days old plants used in transcriptomic analysis.

These differences are typical from experiments with earthworms in natural soils: despite numerous precautions to take up the soil at the same place and despite careful homogenization of large soil volumes, there are still residual differences in the physical, chemical or biological properties, especially in bacterial communities, due to initial heterogeneity. Despite this variability, results from our three experiments converge towards the involvement of signal molecules in the effect of earthworms on plants. These molecules could be auxin-like compounds, ethylene, elicitors of plant defence, or a cocktail of these molecules. Novel insights in the signaling networks that regulate synergistic and antagonistic activities of ethylene and auxin (Muday *et al.*, 2012) and the role of auxin-like compounds or ethylene in SAR (Truman *et al.*, 2010) would help to choose between different proposed hypotheses.

An ecological perspective to this work could be to explore the parallel between earthworms and PGPR, since both change plant morphogenesis and induce plant resistance to pathogens (Cartieaux *et al.*, 2003; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Verhagen *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). This implies to determine whether earthworms (i) are themselves producing signal molecules, (ii) desorb old signal molecules from soil clays and organic matter, (iii) consume and break down bacteria, releasing signal molecules into the soil or (iv) stimulate PGPR or other bacteria producing signal molecules. Recently, it has been shown that the reduction of disease caused by soilborne pathogens by earthworms was associated with the stimulation of *Pseudomonas fluorescens* population, a bacteria recognized as a PGPR (Elmer, 2009). In the same way, protozoa are able to select bacteria producing signal molecules probably by differential grazing (Bonkowski, 2004) and collembola, other soil decomposers, can induce the differential expression of defence and auxin-responsive genes in *A. thaliana* (Endlweber *et al.*, 2011). Despite their long evolutive divergence, earthworms, PGPR, protozoa and collembola seem to modify plant growth through a similar mechanism,

i.e. the emission of signal molecules. This strongly encourages research to unravel the potentially common signaling pathway involved in the interaction between plants and soil organisms.

Materials and methods

Soil

Soil was collected at the CEREEP research station (Saint-Pierre-Lès-Nemours, France) in a natural meadow, with the permission of Beatriz Decencière, project coordinator of the CEREEP - Ecotron IDF / UMS CNRS/ENS 3194. It was dried at 25°C for a week and sieved at 2 mm mesh size. This soil has the following properties: total organic carbon content, 14.7 g kg⁻¹; total nitrogen content, 1.19 g kg⁻¹; pH, 5.22; CEC, 4.08 cmol kg⁻¹; texture: 6.9% clay, 19.0% silt, 74.1% sand.

Earthworms

Adults of *Aporrectodea caliginosa* Savigny (Annelida, Oligochaeta) were retrieved with permission at the CEREEP - Ecotron IDF. It is an endogeic earthworm which makes horizontal or randomly oriented burrows, considered to be temporary structures because they are rarely reused. For the *in vitro* experiment, two breeding boxes were prepared using the same weight of soil maintained at 80% of the field capacity. Earthworms were added in one of these boxes, the other one being used as control soil. After 14 days of incubation, earthworm feces, also called casts, and control soil were retrieved from their respective breeding boxes. In the experiments dedicated to transcriptome analysis or to the study of the double mutant, living earthworms were added to the devoted microcosms at a density close to the one observed in the field in France (Lavelle & Spain, 2001).

In vitro experiment

Plants were grown in sterile Petri dishes (14 cm diameter, 20.6 mm height, Fisher Scientific, France) in the presence of a non-sterile earthworm casts or same weight of control soil enclosed in a nylon membrane (Figure 1A). Culture medium was made of 7 g l⁻¹ gelrite (Duchefa Biochemie, U.S.A.). Nutrients were supplied at 4.3 g l⁻¹ of basal salt mixture (Duchefa Biochemie, U.S.A.), according to the well known Murashige and Skoog plant culture media (Murashige & Skoog, 1962). Macronutrients were supplied as follow: CaCl₂ : 332 mg l⁻¹ ; KH₂PO 170 mg l⁻¹ ; KNO₃ : 969.5 mg l⁻¹ ; MgSO₄ : 180.5 mg l⁻¹ and NH₄NO₃ :

1650 mg l⁻¹, and micronutrients: CoCl₂.6H₂O : 0.025 mg l⁻¹ ; CuSO₄.5H₂O : 0.025 mg l⁻¹ ; FeNaEDTA 36.7 mg l⁻¹ ; H₃BO₃ : 6.2 mg l⁻¹ ; KI 0.83 mg l⁻¹ ; MnSO₄.H₂O : 16.9 mg l⁻¹ ; Na₂MoO₄.2H₂O : 0.25 mg l⁻¹ ; ZnSO₄.7H₂O : 8.6 mg l⁻¹ and KNO₃ : 930.47 mg l⁻¹. As signal molecules are unstable at high temperature and cannot bear sterilization, axenic conditions were ensured by enclosing non sterile casts from earthworm husbandry and control soil into a 0.22 µm mesh size nylon membrane (MAGNA, Nylon, Transfer membrane, GE Water & Process Technologies, U.S) which let small molecules to diffuse into the gel while keeping bacteria inside. Seeds of *Oryza sativa* L. cv Morobekan were provided by the Laboratoire de Semences et des Ressources Biologiques of the Centre de Ressources Biologiques Tropicales de Montpellier CIRAD (France) and seeds of *Lolium perenne* L. bought in garden center. They were sterilized for 5 minutes in Teepol HB7 (Sigma Aldrich, Germany) and 10 minutes in ethanol 70°. *O. sativa* and *L. perenne* were grown respectively for 18 and 9 days in an *in vitro* culture chamber under controlled conditions at respectively 30°C and 19°C, with a 12-hours photoperiod (light intensity: 200 µmol photons s⁻¹). There were two independent experiments and ten biological replicates per treatment (either with control soil or earthworm casts).

Microcosm experiment with mutants

All *Arabidopsis thaliana* seeds were provided by the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) at The Ohio State University (U.S.A.). As auxin-like compounds were the best candidates for the signal molecules involved in the earthworm effect (Muscolo *et al.*, 1999; Canellas *et al.*, 2002; Nardi *et al.*, 2002), we set up a microcosm experiment, to compare the response of *A. thaliana* cv Colombia wild type and double mutant *aux1-7;axr4-2* (NASC ID: N8040, <http://www.arabidopsis.org>) in the presence or absence of earthworms. The *AUX1* gene is coding for an auxin influx facilitator protein (Swarup *et al.*, 2004). The *AXR4* gene is involved in the polar localisation of the protein encoded by *AUX1*, and is thus responsible for the polarised auxin transport from shoot apex to root tips (Dharmasiri *et al.*, 2006; Hobbie, 2006). As a consequence, auxin concentration in the root cells of the mutant is lower than in the wild type, which is responsible for an altered root growth and a decreased primary production, observed with the dwarf phenotype (Hobbie & Estelle, 1995). If earthworms are producing auxin-like compounds in the soil, these molecules could enter root cells, increase intracellular auxin concentration, and restore the altered phenotype of the double mutant.

A. thaliana cv Columbia wild type and the double mutant *aux1-7;axr4-2* were grown in experimental units of PVC (10 cm diameter, 15 cm height, n=5 per treatment) filled with 1kg of dry soil, which was then maintained at 80% of the field capacity. One week after soil humectation, five earthworms ($1.88 \text{ g} \pm 0.09$) were introduced. Two weeks after earthworm introduction, one seed of wild type or mutant was sown in each experimental unit. Plant growth was carried on for 23 days in growth chamber under controlled conditions (Conviron, Canada): $20 \pm 1^\circ\text{C}$ and $15 \pm 1^\circ\text{C}$ day and night temperatures, $55\% \pm 5\%$ relative humidity, $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PPFD for 10 h per day.

Transcriptome analysis

Experimental protocol

Two experiments were made at one week of delay to ensure robust and repeatable results. Plants were grown in experimental PVC units (20 cm diameter, 16 cm height), filled with 6kg DW soil and maintained at 75% of the field capacity. Seven earthworms (for a total of 3 g on average) were introduced. After one week, five seeds of *A. thaliana* cv Columbia were sown per microcosm and grown in growth chamber under controlled conditions (Conviron, Canada): $20 \pm 1^\circ\text{C}$ and $18 \pm 1^\circ\text{C}$ day and night temperatures, $70\% \pm 5\%$ relative humidity, $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PPFD for 10 h per day. Plants were harvested 42 days after sowing, when their rosette is 80% of their final size, corresponding to the 3.80 growth-stage as defined by (Boyes *et al.*, 2001).

RNA extraction and microarray analysis

Plants were pooled according to the treatment (Peng *et al.*, 2003). RNA was extracted from rosettes and roots using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, France) with an on-column DNase digestion using DNase I (Qiagen, France). The quality of the RNAs was assessed with the Agilent Bioanalyser (Agilent, Santa Clara, U.S.A.) and the quantity determined with Ribogreen (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.). cRNAs were produced with the “Message Amp aRNA” kit (Ambion, Austin, U.S.A.). Five μg of cRNAs were reverse transcribed in the presence of 200 U Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.), cy3-dCTP and cy5-dCTP (NEN, Boston, U.S.A.) and hybridized on Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArrays (CATMA), each with 24576 Gene Specific Tags from *A. thaliana* (Crowe *et al.*, 2003), with a dye swap to avoid dye bias (Cartieaux *et al.*, 2003). After an array-by-array normalization, a global intensity-dependent normalization and a correction of a print-tip effect on each metablock, paired t-tests were performed on the logarithm base 2 of the ratio of transcript

abundance. The raw P-values were adjusted by the Bonferroni method. Transcript abundance of 104 genes was increased in the first experiment and 103 in the second one, with 59 genes in common (Table 2). We looked for these 59 genes in Genevestigator database and we found 56 of them for which we have observed an increase in transcript abundance in the presence of earthworms (in column). As it is not possible to export rough data from Genevestigator, we selected the 60 studies among the 54 922 referenced (in line) exhibiting the most similar directional changes with the 56 genes of our study by choosing the “mosaic” with the highest number of red squares (higher transcript abundance in the treatment as compared with control).

Real-time PCR validation

First strand cDNA from leaves and roots of *A. thaliana* were synthesized by the reverse transcription of 2 µg of total RNA using an oligo-dT₍₁₅₎ primer, Protector RNase Inhibitor (Roche, France) and Omniscript Reverse Transcriptase kit (Qiagen, France). Real-time PCR was performed in a LightCycler 2.0 system (Roche Diagnostics, France) with the qPCR mastermix LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche Diagnostics, France). Primers of three constitutive genes (At5g11770, At3g18780 and At5g46290) as well as underexpressed and overexpressed genes (At5g59310, At5g47220, At1g28370, At3g04720, At3g23550, and At1g73260) were designed. The amplification program was made of an initial denaturation at 95°C for 10 min, 35 cycles of amplification at 95°C for 20 s, followed by 56°C for 20 s and 72°C for 20 s. The transcript abundance was standardized with At5g11770 taken as reference with the geNorm v3.5 software. A logarithm base 2 normalization of transcript abundance was performed and results (Figure 3) show similar direction in the relative transcript abundance for real-time PCR and micro-arrays.

Root system analysis

Root length, average diameter, root surface, number of forks and tips were analyzed with a digital scanner (EPSON Expression 10000 XL, Epson America Inc., U.S.A.) coupled with the WinRHIZO software (WinRHIZO, version 2007 pro, Regent Instrument, Canada), following recommendations found in literature (Himmelbauer *et al.*, 2004): a resolution of 16 p mm⁻¹ (400 dpi), with the automatic transformation threshold and a double light system.

Acknowledgements

We thank Fabien Lopes and Chantal Passaquet for their technical help and the Arabidopsis Biological Resource Center for mutant seeds provision.

Chapitre 2 : Impact du vers de terre *Aporrectodea caliginosa* et de la plante *Arabidopsis thaliana* sur la production de l'hormone végétale acide indole acétique par les bactéries cultivables

Avant propos

Les vers de terre semblent agir au niveau de la croissance des plantes via un mécanisme similaire à celui utilisé par certaines PGPR capables de synthétiser des molécules signal comme les hormones végétales. Parmi ces hormones, la production d'auxine est un mécanisme largement répandu au sein des bactéries de la rhizosphère (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Hayat *et al.*, 2010). De plus, certains résultats de notre précédente étude ainsi que ceux d'autres auteurs (Nardi *et al.*, 1988; Tomati *et al.*, 1988; Muscolo *et al.*, 1998; Canellas *et al.*, 2002; Canellas *et al.*, 2011) suggèrent que les vers de terre agissent via un mécanisme interagissant avec la signalisation de l'auxine. Afin d'étudier l'influence des vers de terre sur ces bactéries capables de produire des auxines, la production d'acide indole acétique (IAA) par les bactéries cultivables a été étudiée en présence et absence de vers de terre.

Dans cette étude préliminaire, les bactéries cultivables ont été isolées à partir du sol de microcosmes (i) ne contenant aucun macro-organisme, (ii) en présence du ver de terre *A. caliginosa*, (iii) en présence de la plante *A.thaliana* ou (iv) en présence des deux macro-organismes. Une fois extraites, ces communautés bactériennes ont été cultivées en présence du précurseur pour la biosynthèse de l'acide indole acétique, le L-tryptophane. Cette technique est couramment utilisée afin de discriminer les bactéries productrices des non productrices d'IAA (Frankenberger & Arshad, 1995; Tsavkelova *et al.*, 2007; Dimkpa *et al.*, 2008). Nos résultats montrent que les vers de terre ont un impact positif sur la production d'IAA par les bactéries. La plante a un impact négatif sur cette production d'IAA. Lorsque plante et vers de terre sont présents simultanément, le niveau de production d'IAA est le même que lorsque la plante est seule présente. Ces résultats indiquent que même si les vers de terre peuvent stimuler la production d'IAA par les bactéries du sol cultivables, l'effet des vers de terre sur ces communautés n'est pas significatif lorsque la plante est présente. L'effet des plantes au niveau des ces communautés de bactéries productrices d'IAA est prévalent sur celui des vers de terre. Ceci suggère la mise en place par la plante d'un mécanisme de contrôle des bactériennes productrices d'IAA. On peut émettre l'hypothèse évolutive selon laquelle ce mécanisme permettrait de prévenir un accroissement trop grand de la population de ces bactéries, qui pourrait conduire à une trop grande production d'IAA dans le sol, ce qui aboutirait à un effet inhibiteur sur la croissance de la plante.

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans Applied and Environmental Soil Science.

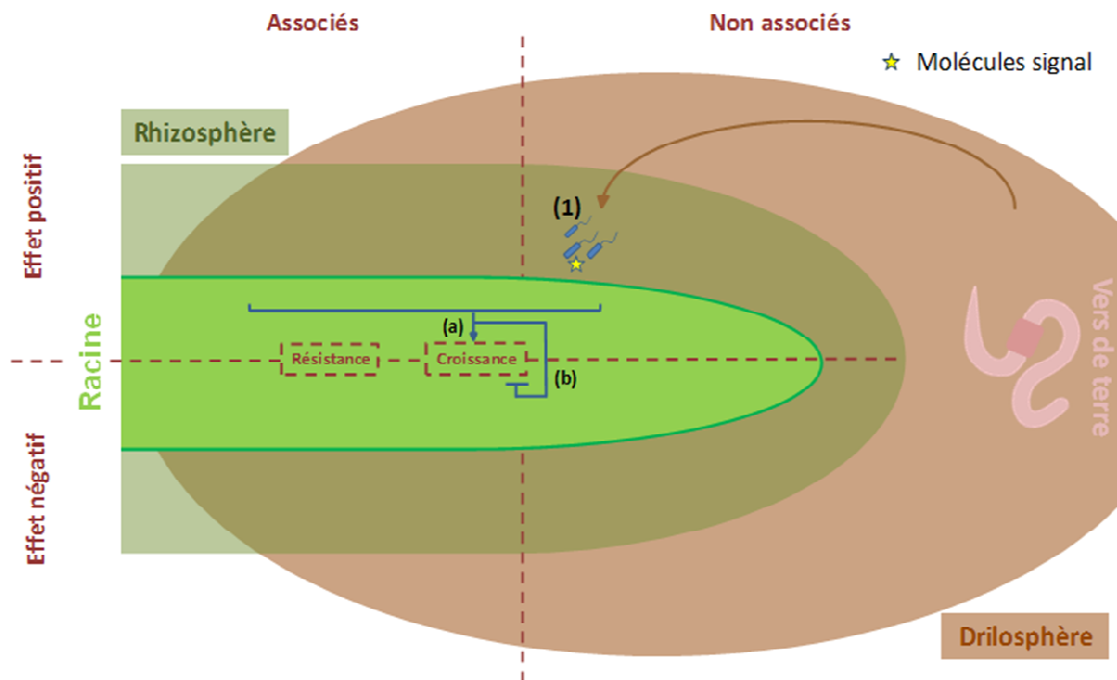


Figure 10 : Synthèse des résultats de l'effet du vers de terre *A. caliginosa* sur la production d'auxine par les bactéries cultivables du sol. Les vers de terre ont un impact positif sur (1) les communautés bactériennes du sol capables de produire de l'auxine. Cependant, lorsque la plante est aussi présente, la production d'auxine par les bactéries cultivables est réduite suggérant un effet prépondérant de la plante sur celui des vers de terre. L'auxine ayant généralement (a) un effet positif sur la croissance des plantes, le contrôle de ces communautés productrices d'auxine a probablement été mis en place au cours de l'histoire évolutive de la plante afin de prévenir une trop grande abondance en auxine dans le milieu qui résulterait en (b) une inhibition de la croissance de la plante.

Title

Control of cultivable IAA-producing bacteria by the plant *Arabidopsis thaliana* and the earthworm *Aporrectodea caliginosa*

Authors

Ruben Puga-Freitas, Samir Abbad, Agnès Gigon, Evelyne Garnier-Zarli, Manuel Blouin

Affiliations

UMR Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux, Université Paris-Est Créteil, 61 avenue du Général De Gaulle, 94010 Créteil cedex, France

Corresponding author

Puga-Freitas Ruben

ruben.puga-freitas@u-pec.fr

tel: +33 1 45 17 16 14

UMR Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux, Université Paris-Est,
61 avenue du Général De Gaulle, 94010 Créteil cedex, France

Abstract

Some soil microorganisms are involved in the complex interactions with plants and earthworms, through the production of indole acetic acid (IAA) which modifies plant growth and development. In a factorial experiment testing the impact of the presence/absence of plants and earthworms on IAA production by cultivable bacteria, we observed that plants were decreasing IAA production of 43%, whereas earthworms were increasing it of 46%. In the presence of both plant and earthworms, IAA production was as low as in the presence of plant control, showing that plants influence on IAA production by microorganisms prevails on earthworm influence. We discuss functional reasons which could explain this result.

Keywords : Cultivable microorganisms; Earthworms; IAA; Macro-organisms; Plants

1. Introduction

Soil microorganisms can be closely associated with soil animals such as earthworms for the delivery of ecosystem functions such as organic matter mineralization (Brown *et al.*, 2000; Lavelle & Spain, 2001; Lavelle, 2002). The release of nutrients due to this dual interaction has consequences on plant growth (Ingham *et al.*, 1985; Blouin *et al.*, 2006; Jana *et al.*, 2010). In addition to nutrients, interdependence between microorganisms, plants and earthworms has led to the selection of diversified signal molecules, from low-molecular weight compounds such as auxin (e.g. IAA), amino acids and secondary metabolites, to high-molecular weight compounds such as proteins and polysaccharides (for review see (Bais *et al.*, 2006)). Emission of signal molecules by microorganisms can be deleterious for plants in the case of pathogenic bacteria and invertebrate herbivores, or positive with mycorrhizas, nitrogen-fixing symbiotic bacteria or free living bacteria such as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Bais *et al.*, 2006; Badri & Vivanco, 2009). Auxin-like compounds have also been detected in earthworm dejections (Muscolo *et al.*, 1998; Canellas *et al.*, 2002), and could be responsible for the positive effect of earthworms (Brown *et al.*, 2004) and vermicompost (Canellas *et al.*, 2002) on plant growth. The same molecule can have positive or negative effects according to its concentration and plant sensitivity (Barazani & Friedman, 1999).

There are very few studies which consider simultaneously the impact of plants and earthworms on microbial activities. However, it is of prior importance to establish a hierarchy in biotic factors influencing soil microorganisms. The purpose of our study was to determine the hierarchy of biotic factors on IAA-producing bacteria: do microorganisms obey to plants or earthworms?

2. Materials and methods

To answer this question, we set up an experiment with 4 treatments: soil without macro-organisms (S), with the plant *Arabidopsis thaliana* (P), with the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (E), with both plant and earthworms (PE). Nine cm diameter-10 cm high PVC experimental units (n=5 per treatment) were filled with 1 kg of dry sandy soil from the CEREEP research station (Saint-Pierre-Lès-Nemours, France).

It was dried at 25°C for a week and sieved at 2 mm mesh size. This soil has the following properties: total organic carbon content, 14.7 g kg⁻¹; total nitrogen content, 1.19 g kg⁻¹; pH, 5.22; CEC, 4.08 cmol kg⁻¹; texture: 6.9% clay, 19.0% silt, 74.1% sand. During the experiment, it was then maintained at 80% of the field capacity. Three earthworms (1.60 g ± 0.06) were introduced one week after soil moistening in treatments E and PE. One seed of *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia was sown per experimental unit two weeks after soil watering in treatment P and PE. Plants were grown for 42 days under controlled conditions (Convicon growth chamber, Canada) at 20 ± 1°C and 18 ± 1°C day and night temperatures, 70% ± 5% relative humidity, 200 µmol m⁻² s⁻¹ photon flux for 10 h per day.

At the end of the experiment, plant shoots and roots were retrieved, dried at 45°C and weighted. As extraction and purification of IAA from natural soils is very difficult due to soil adsorbing complex (organic matter, humus, clays...), we extracted bacterial communities from the soil of the different treatments and quantified the production of IAA due to cultivable bacteria present in these extracts. Soil samples (100 g) were collected from experimental units and dried at 40°C. For all treatments (S, P, E and PE), microbial populations were extracted from these dried soil samples in aqueous solution (5 g l⁻¹ NaCl) at 1:10 soil:water ratio with 40 rpm agitation for 1 h. After centrifugation (3 min, 1000 rpm), 1 ml of bacterial suspension was inoculated on 6.5 ml of liquid Czapek media (with only 5 g l⁻¹ sucrose). Two hundred µg l⁻¹ of L-Tryptophan (Sigma, USA) was added as precursor for IAA production. Bacteria culture was performed in the dark at 27 °C with shaking at 180 rpm. At 24 h, 48 h and 72 h, 500 µl of the bacterial culture supernatant were retrieved. Bacterial cells were removed by centrifugation at 5000 rpm during 1 min. Part of the supernatant (250 µL) free of bacterial cells was mixed with 750 µL of Salkowski's reagent (50 ml HClO₄ at 35% and 1 ml of 0.5 M FeCl₃). IAA concentration was determined by absorbance at 530 nm with a Novaspec III spectrophotometer (Amersham Biosciences, USA), with the help of a standard curve obtained from serial dilutions of IAA stock solution (Sigma, USA).

3. Results

IAA production by cultivable soil microorganisms extracted from soil without macro-organisms (S) was about 8.8 10⁻⁵ mol l⁻¹, whereas the presence of earthworms in soil (E) was responsible for a significant 46% (12.7 10⁻⁵ mol l⁻¹) increase in IAA production by cultivable microorganisms (Figure 1).

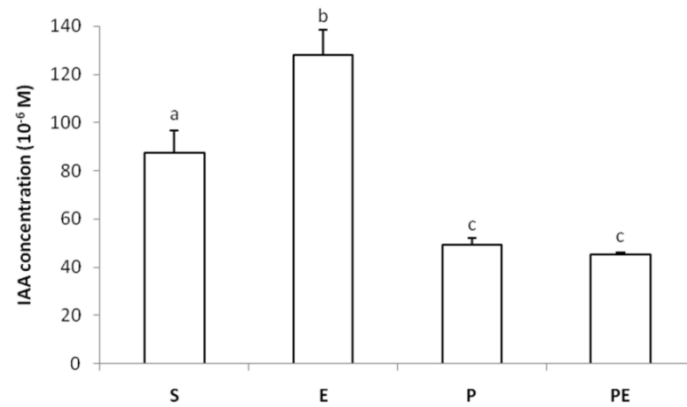


Figure 1: Average IAA concentration at 24, 48 and 72 h by cultivable soil bacteria from soil without macro-organisms (S), with the plant *Arabidopsis thaliana* (P), with the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (E) and with both plant and earthworms (PE). Means \pm s.e., n = 17, different letters indicates a significant difference, Tukey HSD, P < 0.05.

In the presence of plants (P) or in the presence of plants and earthworms (PE), IAA production was at the same level, respectively $4.9 \cdot 10^{-5}$ and $4.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (Figure 1), suggesting that plants halved IAA production by soil microorganisms. A two-ways ANOVA confirmed the significance of plant negative effect (P-value = $3 \cdot 10^{-6}$, F = 58.33), and earthworm positive effect (P-value = 0.02, F = 6.8) on IAA production by microorganisms (Table 1).

Table1: Impact of the factors “plant”, “earthworm” and their interaction on IAA production by cultivable microorganisms.

	IAA concentration		
	Df	F	P-value
Plant	1	58.33	< 0.001
Earthworm	1	6.80	0.02
Plant * earthworm	1	8.25	0.01
Residuals	13		

n = 17

The reason for this inhibition of IAA production by plants could be linked to the fact that too high IAA exogenous concentration can inhibit root growth and prevent plant development (Taiz & Zeiger, 2010) (see Discussion section). This was supported by the significant negative correlation ($R^2 = 0.71$, P value = 0.005) between plant biomass and IAA production (Figure 2).

As far as the interaction between plants and earthworms is concerned, we observed that the positive effect of earthworms on IAA production observed in treatment E disappeared in treatment PE (Figure 1).

A two-ways ANOVA showed that the statistical interaction between the factors plants and earthworms was significant (P-value = 0.01, F = 8.25), which means that earthworm effect on IAA production was dependant on the presence of plants. Note that the discussed IAA concentration was due to the production of IAA by cultivable microorganisms, which represent only a small fraction of microorganisms living in a soil, despite the large spectrum of microorganisms growing on the Czapek medium. An alternative approach would be to extract all the IAA from the soil, but a given extraction protocol would not have the same extraction efficiency for soils deeply modified by plants or earthworms. Moreover, protocols developed to detect IAA in complex soils (Muscolo *et al.*, 1998; Canellas *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004) do not provide reliable methods to quantify absolute amount of IAA in soil samples.

4. Discussion

Interactions between organisms in soil are mainly based on trophic relationships and exchange of signals. Among signal molecules, auxins have been showed to play a major role in plant-microorganism interactions; for example, rhizobacteria producing high amounts of IAA are generally responsible for a negative effect on plant growth and have been called “Deleterious Rhizo Bacteria” (Suslow & Schroth, 1982; Schippers *et al.*, 1987; Nehl *et al.*, 1996).

Rhizobacteria producing low amounts of IAA are generally responsible for a positive effect on plant growth and have been called “Plant Growth Promoting Rhizobacteria” (Kloepper & Schroth, 1978; Bashan & Holguin, 1998; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). This important effect of IAA can be related to its role in cell division and elongation: it is demonstrated that the auxin dose – response curve is bell shaped, with a maximal elongation rate reached for medium exogenous auxin concentration (Taiz & Zeiger, 2010).

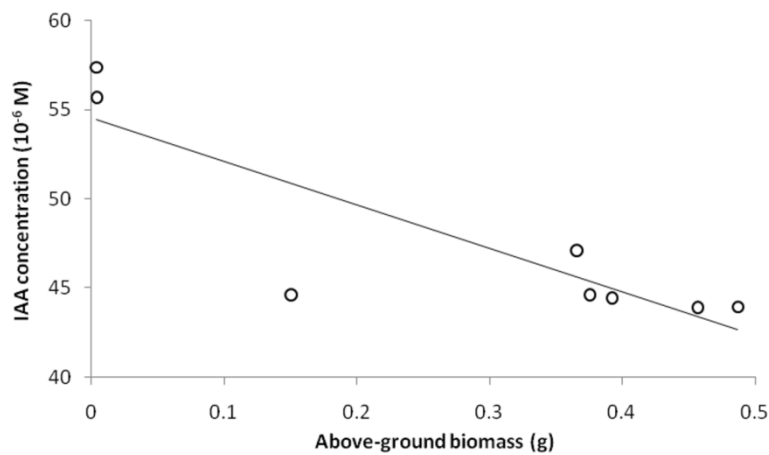


Figure 2: Relationship between IAA concentration and plant above-ground biomass ($y = -24.35x + 54.53$, $R^2 = 0.75$, $P = 0.005$).

Many soil bacteria use signals to direct plant carbon for the build-up of additional root structures (Hirsch *et al.*, 1997; Jameson, 2000; Bonkowski, 2004), with a subsequent positive effect on root exudates and bacteria populations. As earthworms are supposed to consume soil microorganisms, the increase in IAA production observed in the presence of earthworms could be explained as a way to increase root exudates, bacterial biomass and thus earthworm resources. This is supported by previous observations of higher IAA content in earthworm-worked soils as compared with soil without earthworms (Muscolo *et al.*, 1998; Canellas *et al.*, 2002) as well as the hormone-like effects observed in compost made by earthworms (Atiyeh *et al.*, 2000; Chaoui *et al.*, 2002; Arancon *et al.*, 2006).

However, initiation of additional root structures or increased exudation is probably not always beneficial to plants. Plants have indeed developed mechanisms to regulate IAA production by microorganisms. There are very few evidences of a direct control of IAA producing bacterial communities by plants. Nevertheless, it has been showed that transcription of *ipdC*, an *Erwinia* IAA biosynthetic gene, is induced in response to bean and tobacco compounds (Brandl & Lindow, 1997). This kind of mechanism could be at the origin of the repression of IAA producing bacteria in the presence of plants observed in our study.

5. Conclusion

In this study, we confirmed that earthworms can be responsible for an increase in IAA production by microorganisms. We also observed a repression of IAA production in the presence of plants. In the presence of both earthworms and plants, we found that plants took the advantage on earthworms in the control of cultivable IAA-producing bacteria, by maintaining a weak level of IAA production by cultivable microorganisms.

Plants are responsible for energy inputs in terrestrial ecosystems (about 90% of soil organic matter). They are major providers of substrates to microorganisms through root exudates and dead roots, which could represent 20 to 50% of the total assimilated carbon (Lynch & Whipps, 1990; Kuzyakov & Domanski, 2000), or to earthworms through dead leaves and roots (Brussaard, 1999). This could explain the fact that they control many soil processes such as the production of IAA, but also free-living bacteria nitrogenase activity (Zarea *et al.*, 2009), amoebae community structure (Alpei *et al.*, 1996) and hydro-structural stability of soil (Milleret *et al.*, 2009).

Chapitre 3 : Impact du vers de terre *Aporrectodea caliginosa* et de la bactérie productrice d'acide indole acétique *Micrococcus luteus* sur la croissance et le développement d'*Arabidopsis thaliana*

Avant propos

Les vers de terre stimulent la production de molécules signal par les bactéries cultivables du sol. Ces molécules qui agissent sur les voies de signalisation de nombreuses hormones végétales ont un effet sur la croissance et le développement des plantes. Alors que les bactéries productrices d'auxine ont été analysées à la fin de l'expérience du chapitre précédent, nous proposons dans l'étude suivante une manipulation de la population d'une bactérie isolée sur sa capacité à produire de forte dose d'IAA. L'objectif est ici d'étudier l'impact de la dose de bactérie inoculée et la présence de vers de terre.

Nous avons étudié l'impact du ver de terre *A. caliginosa* et de la souche bactérienne productrice d'auxine *Micrococcus luteus* sur la croissance et le développement d'*A. thaliana*. La bactérie a été isolée à partir de la rhizosphère de plants de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) à partir de sa capacité à produire de l'auxine. Cette bactérie a été inoculée dans le sol à trois concentrations. Les résultats montrent un impact négatif de ces bactéries sur la croissance des plantes, d'autant plus grand que l'inoculum est important. Cet effet délétère suggère que cette bactérie productrice d'auxine peut être classée comme bactérie délétère de la croissance des plantes (DRB). L'issue de l'action sur les plantes des bactéries de la rhizosphère productrices de molécules signal est fortement dépendante de la taille de la population (Persello-Cartieaux *et al.*, 2001; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003) mais aussi du génotype de la plante (Kremer, 2006). Concernant l'effet des vers de terre, nous avons observé un impact positif sur la croissance de la plante en absence de *M. luteus*. Cependant, cet effet positif diminue quand la taille de l'inoculum augmente, jusqu'à disparaître complètement pour la dose de bactérie la plus forte. Il existe donc une action antagoniste de *M. luteus* sur le mécanisme d'action du vers de terre. Ces résultats soulignent l'importance de l'action des molécules signal produites dans la rhizosphère. La bactérie *M. luteus* en produisant de fortes teneur en IAA perturbe probablement chez la plante la voie de signalisation sous contrôle de l'auxine. Ces changements pourraient perturber tous les mécanismes d'interaction les autres organismes du sol dont les vers de terre et leurs conséquences sur la plante via les microorganismes de la rhizosphère.

Cette étude fait l'objet d'un article prêt à soumettre à Applied Soil Ecology.

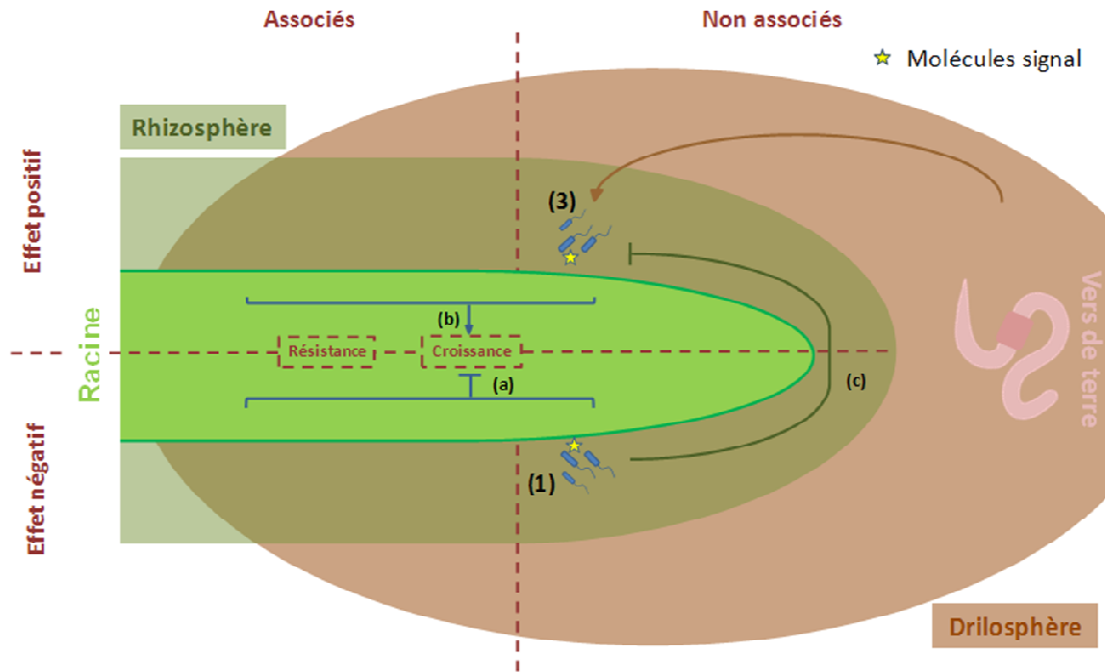


Figure 11 : Synthèse des résultats de l'effet du ver de terre *A. caliginosa* et de la bactérie *M. luteus* sur la croissance et le développement d'*A. thaliana*. L'inoculation de cette bactérie a (a) un effet négatif sur la croissance d'*A. thaliana* suggérant une action de type (1) DRB. Les vers de terre ont (b) un effet positif sur la croissance d'*A. thaliana* en absence de *M. luteus*. Cependant, cet effet est d'autant plus faible que la taille de l'inoculum de *M. luteus* est grande suggérant (c) un effet antagoniste de cette bactérie à celui du ver de terre, qui pourrait passer par un effet sur (2) les PGPR.

Title

Combined effects of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* and the IAA-producing Rhizobacteria *Micrococcus luteus* on the growth and development of the plant *Arabidopsis thaliana*.

Authors

Diana Edith CASTELLANOS SUAREZ¹, Agnès GIGON², Ruben PUGA-FREITAS², Patrick LAVELLE³, Elena VELASQUEZ⁴, Manuel BLOUIN²

Affiliations

1 Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia

2 UMR Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux, équipe Ibios, Institut de Recherche pour le Développement et Université Paris-Est Créteil, 61 avenue du Général De Gaulle, 94010 CRETEIL cedex, FRANCE

3 Centro Internacional de Agricultura Tropical, AA 6713, Cali, Colombia

4 Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia

Abstract

Micrococcus luteus bacteria has been isolated from rhizospheric soil of potato and is considered as a deleterious rhizo-bacteria (DRB) or as a plant growth promoter bacteria depending on the plant species. In this study, we tested the use of earthworms (*Aporrectodea caliginosa*) as a biocontrol or synergistic agent of *M. luteus*. We expected that earthworms would modify microbial communities in a way that would stimulate plant growth, as demonstrated in a large number of experiments. *M. luteus* actually had a negative effect on plant growth, with respective decreases of 31.2% for belowground biomass ($P = 0.96$) and 23.6% for aboveground biomass ($P = 0.16$) (23.3% for total biomass, $P = 0.21$) with the maximal dose applied (10^7 CFU ml⁻¹). In the absence of bacteria, earthworm activities allowed an 85% increase in belowground biomass ($P = 0.09$) and 1.4% increase in aboveground biomass ($P = 0.99$) (14% increase in total biomass, $P = 0.75$). Nevertheless, this positive effect of earthworms progressively decreased while increasing the dose of *M. luteus*, to finally disappear at the maximal dose, showing that earthworms cannot be used as a biocontrol agent for this DRB. Effects of earthworms and *M. luteus* on plant development strongly differed: while the first had a significant effect on the development of vegetative organs (e.g. rosette diameter and fine root proportion), the latter significantly affected floral organs (e.g. floral stem height). Some parameters such as leaf area were finally only influenced by the interaction between the two factors.

Significant interactions observed between earthworms and *M. luteus* suggest that signal molecules involved in their effects are probably different in nature, or delivered at different periods during the plant cycle.

1. Introduction

Some free living bacteria of the plant rhizosphere, called Plant Growth Promoting Rhizobacteria or PGPR (Bashan & Holguin, 1998), have potential to increase plant growth. Among several proposed mechanisms, PGPR could release signal molecules close to phytohormones, fix atmospheric nitrogen in the rhizosphere, solubilize nutrients, promote mycorrhizas, or regulate ethylene production in roots; they can also act indirectly on plant growth through the suppression of major plant pathogens (Nehl *et al.*, 1996; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

On the opposite, other free living rhizobacteria described as deleterious rhizo-bacteria (DRB) (Suslow & Schroth, 1982) can inhibit root and shoot growth. Since the symptoms caused by these bacteria are scarce and non specific (foliar symptoms similar to nutrient deficiencies, discrete root symptoms such as browning and discoloration, few recorded cases of mortality), and that there is no obligate physical contact between these bacteria and plant root, they have attracted much less scientific attention than the plant growth promoting rhizobacteria (PGPR).

Nehl *et al.* (1996) argue that the distinction between PGPR and DRB is probably artificial, since bacteria are classified in one group on the basis of bioassays, in which their net effect on plant growth is determined. Positive effects of PGPR and negative effects of DRB are actually host specific, at the species and cultivar levels, and there is little apparent relationship between taxonomic characteristics of rhizobacteria and their function as DRB or PGPR (Suslow & Schroth, 1982; Campbell *et al.*, 1986). For example, the individual effects of 43 strains of *Pseudomonas* isolated from roots of rough lemon in the field varied from a 52% reduction to a 116% increase in root growth (Gardner *et al.*, 1984).

It is therefore likely that a single organism may function alternatively as a DRB or PGPR according to circumstances, i.e. plant genotype, soil conditions or the presence of mycorrhizae (Nehl *et al.*, 1996).

The effect of these microorganisms on plants can actually be mediated by several kinds of molecules such as nutrients, antibiotics, siderophores or signal molecules mimicking plant hormones. Among these hormone-like compounds, auxins, cytokinins and ethylene are the most widespread, although other compounds such as gibberellin and jasmonate-like substances have been reported to be synthesized by soil and rhizosphere microorganisms

(Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Generally, auxins and cytokinins are reported to increase plant growth through the modification of plant morphogenesis, whereas ethylene, salicylic acid and jasmonic acid are beneficial due to their role in the activation of resistance to pathogens (van Loon *et al.*, 1998; Ping & Boland, 2004). The concentration of the signal molecule is crucial. For example, the dose response curve of plant to exogenous auxin application is bell shaped (Taiz & Zeiger, 2010), and rhizobacteria can induce positive or negative effect according to their level of auxin production (Barazani & Friedman, 1999).

Promoting microbial communities with dominance of PGPR on DRB is certainly a promising way to ecologically increase plant growth through an improved plant development. Our hypothesis is that earthworms might have such an effect for several reasons. First, earthworms are ecosystem engineers that influence activities of other organisms at modifying the physical environment (Jones *et al.*, 1994; Lavelle *et al.*, 1997). Earthworms galleries, allow better water infiltration (Le Bayon *et al.*, 2002; Shuster *et al.*, 2002) and drainage (Blouin *et al.*, 2007b), and thus avoid DRB proliferation which occurs in waterlogged situations (Mandryck, 1969; Chan *et al.*, 1989). Earthworms actually have a positive effect on plant growth in 80% of reported cases (Brown *et al.*, 1999; Scheu, 2003). Several results show that this effect is mostly due to signal molecules emitted in the soil (Puga-Freitas *et al.*, accepted), probably due to the activation of PGPR (Brown *et al.*, 2004). Other indirect effects of earthworms on plant growth are mediated through stimulation of plant defense (Blouin *et al.*, 2005), or control of plant pathogens, which can be associated with an increase in PGPR population (Elmer, 2009).

In this work, we tested the effects in isolation and combination of a DRB (*Micrococcus luteus*) and of an earthworm (*Aporrectodea caliginosa*) on plant growth (*Arabidopsis thaliana*). The bacteria used in this experiment is *Micrococcus luteus*, a Gram positive coccus. It exhibited positive effects on growth of tomato and radish and was therefore ascribed to the PGPR group (Arguello *et al.*, 2011). However, in another study, this bacteria was responsible for negative effects on young lettuce seedlings (*Lactuca sativa*) and thus considered as a DRB (Barazani & Friedman, 1999). Our study aims to answer several questions: (i) what is the effect of *M. luteus* on the growth and development of *A. thaliana*? (ii) If there is a positive effect, is there a synergy with earthworms? (iii) If negative, is there a control due to the presence of earthworms? (iv) what can we learn on the mechanisms of action of *M. luteus* and earthworms from such a factorial experiment?

2. Materials and Methods

The experiment was carried out in the laboratory using the model plant *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia, grown in the presence/absence of the endogeic earthworm *Aporrectodea caliginosa* and with three different concentrations of viable cells of the bacteria *M. luteus* selected for its ability to produce large amounts of auxin (Indole Acetic Acid or IAA).

2.1. Microcosms

Soils were collected from the top layer (0-20 cm), at the Centre de Recherche en Ecologie Expérimentale et Prédictive - CEREEP (Saint-Pierre-Lès-Nemours, France). It is a poor cambisol supporting a natural meadow (total organic carbon content: 14.7 g kg⁻¹; total nitrogen content: 1.19 g kg⁻¹; pH, 5.22; CEC: 4.08 cmol kg⁻¹) with a sandy texture (6.9% clay, 19.0% silt, 74.1% sand). Soil was dried at 25°C for several weeks, and sieved with a 2 mm mesh sieve. PVC pots 13 cm in diameter and 12 cm height were filled with 1.2 kg of soil. Soil was maintained at 80% of the field capacity with deionised H₂O (240 g of water per 1200 g dry soil). The amount of water in soil was checked twice a week by weighting pots. No nutrient addition was made.

2.2. Bacterial inoculums

Bacteria were isolated from the rhizosphere of healthy potato plants (*Solanum tuberosum*) in an organic cultivation in the savanna of Bogotá (Colombia) (León, 2003). Taxonomic characterization performed by 16S rRNA gene sequences ascribed the bacteria used in this experiment to the *M. luteus* species. *M. luteus* is a Gram positive coccus, that produced 52 µg ml⁻¹ of IAA after 6 days of fermentation (Arguello *et al.*, 2011). Colonies of bacteria were isolated on agar LB and grown in 100 ml of BT broth in 250 ml flask, up to a cell concentration of 1.0 x10⁶ cells ml⁻¹ (Castellanos *et al.*, 2009). Bottles were placed in continuous shaking in an orbital shaker at 170 rpm, temperature 27°C for 48 hours (Celis Bautista & Gallardo, 2008), for a final concentration of 1.9 x10⁸ CFU ml⁻¹. From this culture, we obtained dilutions of 10⁵, 10⁶ and 10⁷ CFU ml⁻¹ by adding sterile deionized water. Three applications of bacterial inoculum were carried out: at time zero (addition of seeds), 7 and 14 days later. These applications of 10 ml inoculum were performed at four points on the microcosm surface (for a total of 40 ml), located on a 5cm diameter circle from the centre of the microcosm, around the plants.

2.3. Earthworms

Earthworms (*Aporrectodea caliginosa*) were collected at the IRD site of Bondy (Seine Saint Denis, France) and maintained in a breeding room for several weeks. Two weeks after microcosms set up and soil watering, two earthworms with a 0.46 g average weight were inoculated in each unit, corresponding to a biomass of 520 kg ha⁻¹ in the field.

2.4. Plant growth conditions

Ten seeds of *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia were placed in the center of each microcosm 10 days before earthworm introduction. Fifty days after sowing, only one seedling was left in each microcosm. Plants were grown for 60 days under controlled conditions in a culture chamber (Adaptis A1000, Conviron, Canada) with a 22/20°C day/night temperature, a 70/75% day/night humidity, and a 12h photoperiod with a 150 μmol photon m⁻² s⁻¹ intensity.

2.5. Experimental design

There were 8 different treatments: 4 with (E0, E1, E2, E3), and four without earthworms (C0, C1, C2, C3). C0 and E0 were control treatment without inoculated bacteria. C1-E1, C2-E2 and C3-E3 treatments were inoculated respectively with 10⁵, 10⁶ and 10⁷ CFU ml⁻¹. Each treatment was replicated 6 times, for a total of 48 microcosms. Microcosms were randomly distributed in the culture chamber, and their position changed two times a week, after weighing and watering.

2.6. Plant measurements

At the end of the experiment, floral stem length and rosette diameter were measured. Foliar and root systems of each plant was analyzed with a digital scanner (Epson Expression 10000 XL, Epson America Inc., San Jose, CA, USA) coupled with the WinRHIZO software (WinRHIZO, V. 2007 pro, Regent Instruments, Quebec, Canada), at a 16 p mm⁻¹ (400 dpi) resolution and using the automatic transformation threshold, following the standard procedure (Bouma *et al.*, 2000; Himmelbauer *et al.*, 2004). Eleven diameter classes were defined: from 0–100 to 800–900 and >900 mm. After root system analysis, above- and belowground organs were dried for 2 days at 45°C and weighed.

2.7. Determination of Indole Acetic Acid production by cultivable bacteria

Twenty grams soil samples were retrieved from each microcosm 30 days after sowing, at the four inoculation points. Subsamples were homogenized and one gram was used for measurements. Bacteria were extracted in 9 ml of a solution of NaCl 0.9% (w/v) under circular agitation at 40 rpm for 30 minutes. The solution was then centrifuged at 1000 rpm for 3 minutes. One ml of supernatant was mixed to 6.5 ml of Czapeck culture medium and incubated under constant agitation (150 rpm at 26 °C). After 24 hours, 800 µl of a stock solution of L-tryptophan (2 µg µl⁻¹) was added as IAA precursor. Colorimetric quantification of IAA production was made at 24, 48 and 72 hours. Five hundred µl were centrifuged for 75 seconds at 14000 rpm. Two hundred and fifty µl of supernatant were mixed to 750 µl of Salkowsky reagent and incubated for 30 minutes in the dark. Absorbance was measured at 535 nm with the Novaspec III spectrophotometer (Amersham Biosciences, USA). IAA concentration was obtained from absorbance according to a standard curve equation ($y = 16.636 x ; R^2 = 0.99$).

2.8. Statistical analyses

All analyses were performed using the R software (Team, 2008). To get an overview of plant response in our data set, we performed a multivariate analysis (Principal Component Analysis) of all treatments based on dependant variables (biomasses and root and shoot morphology). The significance of treatment effect was tested in a Monte Carlo test. We also performed two-ways ANOVA, with earthworm presence and *M. luteus* inoculum as factors, on all dependent variables. Non-linear regressions for all dependent variables then allowed determining the equation of a regression curve for a given dependent variable as a function of the dose of *M. luteus* inoculated, either in the presence or absence of earthworms (two distinct regressions). Because the dose response curve of the plant to *M. luteus* dose could be bell-shaped as in the case of exogenous auxin application, we first tested a second degree polynomial function (dependant variable = $f(\text{inoculum}) = ax^2 + bx + c$). If the second degree parameter was not significantly different from zero, we used a first degree polynomial function ($f(x) = ax + b$). As a consequence, the shape of the regression curve was not always the same according to the treatment (with or without earthworms) or to the dependant variable.

We finally looked for potential correlations either between IAA production by cultivable microorganisms and the factors “earthworms” and “*M. luteus* inoculum”, or between IAA production and plant parameters.

3. Results

After describing our experimental results in a global way with the PCA, we will provide a detailed analysis for each dependent variable.

3.1. Overall effect of treatments on plant parameters

Treatments resulted in significant differences in plant response (Monte Carlo test: $P < 0.001$)(Figure 1).

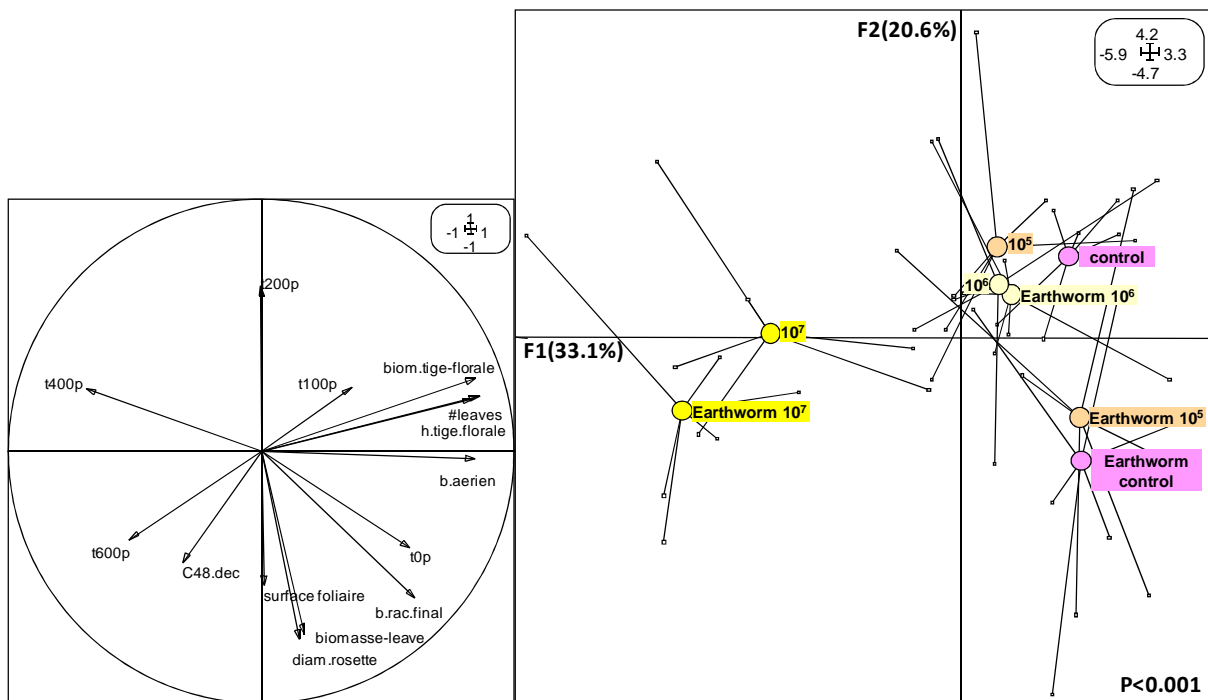


Figure 1 : Ordination of the different growth parameters of *A. thaliana* according to the inoculation dose of *Micrococcus luteus* in absence or presence of the earthworm *A. caliginosa* in the plane defined by the axis 1 and 2 of the PCA.

Factor 1 (33.1% of explained variance) opposed treatments with the lowest concentrations of inoculants to treatments with the highest concentrations of inoculants. The first set of treatments had higher shoot, floral stem and root biomass, size and number of leaves as compared with the second. Low inoculants levels were also associated with high root biomass proportion in fine diameter classes (0-100 and 100-200 μm). Treatments with the highest inoculation rates had plants with coarser roots and generally smaller biomasses.

Axis 2 (20.6%) clearly separated earthworm treatments from the other ones. These earthworm treatments exhibited highest biomasses of leaves and roots, but not reproductive parts.

Treatments with both earthworms and *M. luteus* showed an interesting pattern, with a general improvement of production parameters at low concentrations (10^5), no difference at intermediate concentrations (10^6) and apparent enhancement of the deleterious effects of the DRB at the highest inoculation rate (10^7). Donate-belt and Ricardo, (2004), observed the presence of *Micrococcus luteus* in the rhizosphere of *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste) which is a forage legume tree-shrub endemic to the Canary Islands with a concentration of 63 CFU g⁻¹. Univariate parametric analyses allowed better detailing the general picture provided by PCA analysis.

3.2. Plant biomasses

Taking into account all treatments irrespective of the presence of earthworms, we found a significant negative effect of the dose of *M. luteus* on total biomass ($P < 0.001$), aboveground biomass ($P < 0.001$) and belowground biomass ($P = 0.002$). When restricting the analysis to the four treatments without earthworms (C0, C1, C2 and C3), we found an almost significant effect of *M. luteus* dose on total biomass ($P = 0.094$), aboveground biomass ($P = 0.082$), but not on belowground biomass ($P = 0.203$). The decrease in plant production due to the maximal dose of *M. luteus* (10^7 CFU ml⁻¹ as compared with the control without bacteria) was significantly higher in the presence of earthworms than in the control with no worms: 37.8 % ($P < 0.001$) instead of 23.3 ($P = 0.21$) for total biomass, 63.8% ($P = 0.003$) instead of 31.2% ($P = 0.96$) for belowground biomass and 30.1% ($P = 0.007$) instead of 23.6 ($P = 0.16$) for aboveground.

A two-ways ANOVA with earthworms and bacterial inoculums as factors showed that earthworms had a positive effect on belowground biomass ($P = 0.017$) and total biomass ($P = 0.076$) but not on aboveground biomass ($P = 0.530$) Restricting the analysis to the treatments without *M. luteus* (C0 and E0), we found a significant effect of earthworms on total biomass (+ 14%, $P = 0.017$), belowground biomass (+ 85%, $P = 0.045$), but still not on aboveground biomass (+ 1.4%, $P = 0.762$).

When considering all data, total biomass and root biomass were affected by the interaction between earthworm and *M. luteus* although threshold for statistical significance were not attained ($P = 0.097$ and 0.153 respectively).

In the absence of earthworms, the second degree parameter of the polynomial regression was not significant resulting in a linear regression of the type $y = ax + b$ for all biomass parameters (Figure 2). However, in the presence of earthworms, the second degree parameter of the polynomial regression was significant for aboveground and total biomasses, resulting in a regression of the type $y = ax^2 + bx + c$. This means that the negative effect of *M. luteus* at 10^5 CFU ml⁻¹ observed in the absence of earthworms was disappearing in their presence. However, mean comparisons were inefficient in finding a significant difference between these treatments. The shoot:root ratio, a characteristic of plant development, was affected neither by earthworms nor by bacterial inoculums.

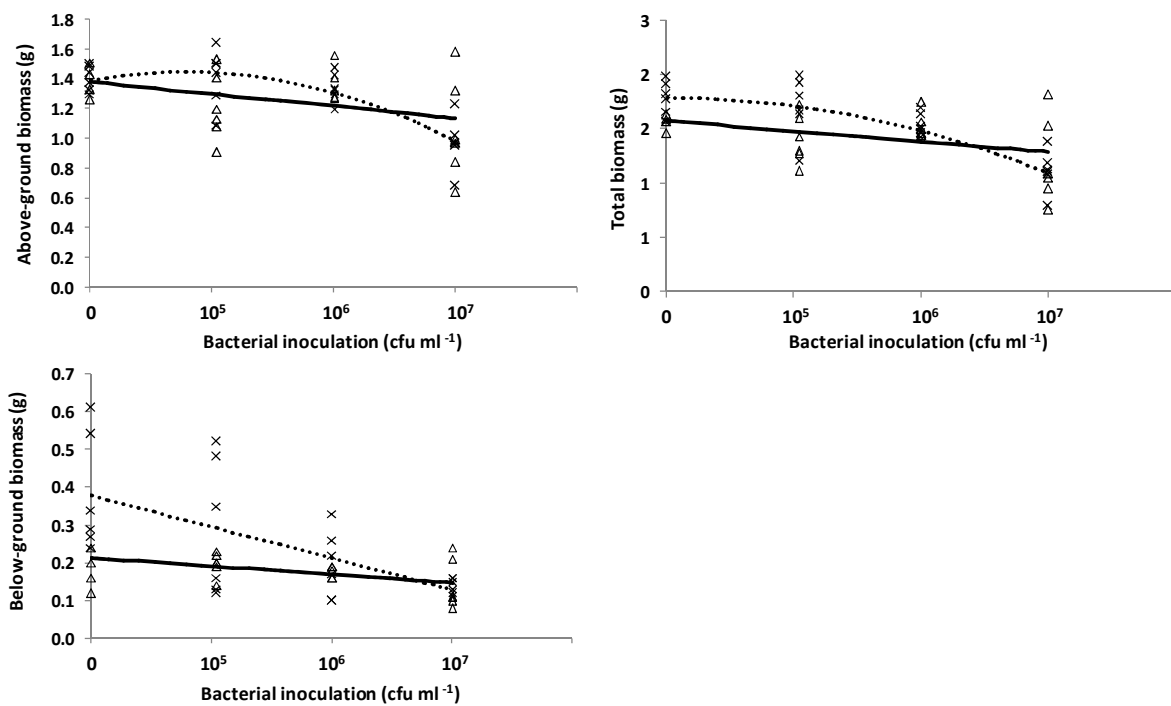


Figure 2: Relationship between the inoculation dose of *Micrococcus luteus* on *Arabidopsis thaliana* in absence (x) or presence (Δ) of earthworm and their respective regression (---) and (···) on (a) above-ground biomass (---), $y = -0.018x + 1.71$; (···), $y = 0.908x - 0.095x^2 - 0.72$); (b) below-ground biomass (---), $y = -0.022x + 0.3$; (···), $y = -0.083x + 0.71$); (c) total biomass (---), $y = -0.095x + 1.955$; (···), $y = 0.658x - 0.081x^2 + 0.442$). A log transformation ($\log(x+10000)$) was applied on the bacterial inoculation dose to obtain an homogeneous distribution on the x-axis.

3.3. Aboveground morphology

Earthworms and *M. luteus* did not affect plant development in a similar way. On measured parameters, earthworms affected positively vegetative organs, especially rosette diameter (+4.3%, $P = 0.068$) (Figure 3). On the other hand, *M. luteus* dose affected reproductive organs, with a significant ($P < 0.001$) negative impact on floral stem height

(Figure 4), the density (height/biomass) of floral stem ($P = 0.003$) and the ratio between floral stem biomass and leaf biomass ($P < 0.001$).

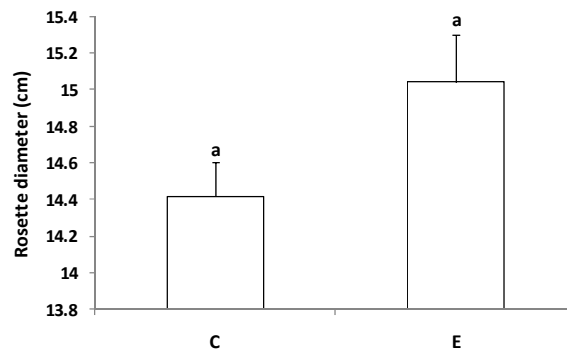


Figure 3: Effect of *Aporrectodea caliginosa* presence on the rosette diameter of *Arabidopsis thaliana*, irrespectively of the dose of *Micrococcus luteus* inoculated. C: control treatment without earthworms; E: treatment with earthworms. Means \pm s.e., n=24 per treatment, different letters indicates a significant difference, Tukey HSD, P-Value < 0.05.

Surface leaf area was affected neither by earthworm nor *M. luteus*, but by the interaction between these factors ($P = 0.029$): the dose of *M. luteus* was responsible for a significant increase in leaf area in the absence of earthworms, but for a significant decrease in leaf area in the presence of earthworms, as shown in Figure 5.

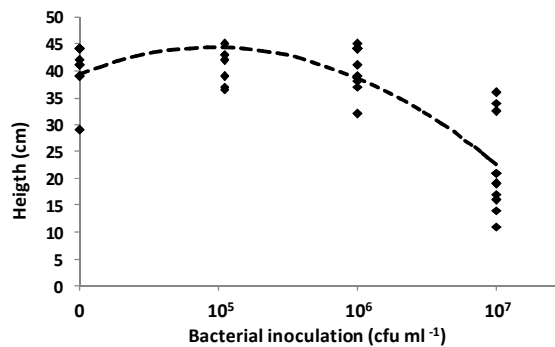


Figure 4: Effect of the dose of *Micrococcus luteus* inoculated on *Arabidopsis thaliana* floral stem height ($y = -5.25x + 52.1372x^2 - 85.1316$), irrespectively of the presence of earthworms. A log transformation ($\log(x+10000)$) was applied on the bacterial inoculation dose to obtain an homogeneous distribution on the x-axis.

3.4. Belowground morphology

Root biomass distribution in diameter class was affected by earthworms and *M. luteus*. Taken separately, absolute root biomass in each of the 0-100, 100-200, 200-400, 400-600, >600 μm diameter classes were significantly affected by *M. luteus*, whereas earthworms affected only the 0-100 μm class (results not shown). Because root biomass was changing according to the treatment (see above), a more relevant variable to characterize plant

development is the biomass per diameter class reported to the total root biomass, i.e. relative root biomass in each class. With this transformation, we found that earthworms had a significant impact on classes 0-100 μm ($P = 0.009$), 100-200 μm ($P = 0.091$), 200-400 μm ($P = 0.032$) and $> 600 \mu\text{m}$ ($P = 0.072$).

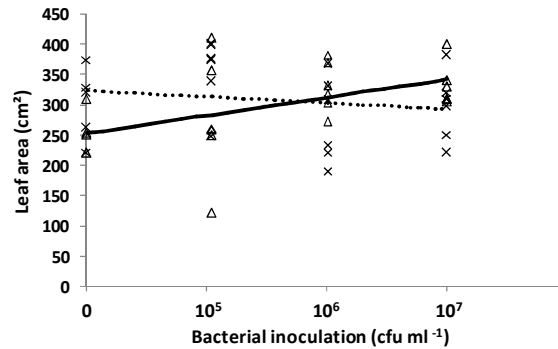


Figure 5: Relationship between the inoculation dose of *Micrococcus luteus* on *Arabidopsis thaliana* leaf area in absence (x) or presence (Δ) of *Aporrectodea caliginosa* and their respective regression (---) ($y = 29.77x + 133.8$) and (···) ($y = -10.22x + 364.88$). A log transformation ($\log(x+10000)$) was applied on the bacterial inoculation dose to obtain an homogeneous distribution on the x-axis.

M. luteus dose had a significant effect on classes 0-100 μm ($P = 0.0006$), 100-200 μm ($P = 0.030$), 400-600 ($P = 0.0002$) and $>600 \mu\text{m}$ ($P = 0.019$). Interaction between earthworms and *M. luteus* dose had a quasi significant impact on the 0-100 μm class ($P = 0.066$). The root biomass distribution profiles for each one of the eight treatments show clearly that, in the 0-100 μm diameter class, there were few variations according to the *M. luteus* dose in the absence of earthworms, but important variations in their presence (Figure 6).

3.5. IAA production by cultivable bacteria

As *M. luteus* used in this experiment has been selected among cultivable bacteria according to its ability to produce high amount of IAA (Arguello *et al.*, 2011), we measured the production of IAA by cultivable bacteria in each treatment. Surprisingly, two-ways ANOVA was not showing a clearly significant effect of the dose of *M. luteus* inoculated in the pot on the IAA concentration produced by cultivable bacteria ($P = 0.10$). Conversely, earthworms and the interaction between earthworms and *M. luteus* dose had a significant effect ($P = 0.002$ and 0.001 respectively). Earthworms were increasing the production of IAA by cultivable bacteria (Figure 7a); the shape of the effect of *M. luteus* dose was a parabola with a maximum in the absence of earthworms, but to a parabola with a minimum in the presence of earthworms (Figure 7b).

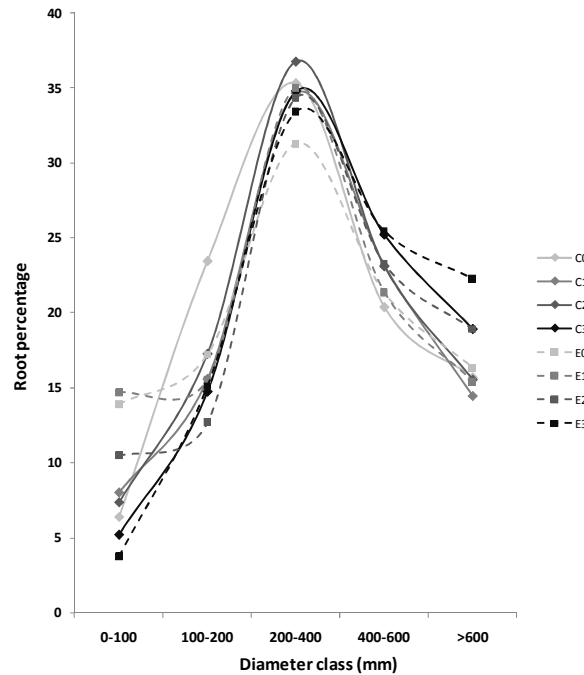


Figure 6: Effect of *Aporrectodea caliginosa* on the root morphology of *Arabidopsis thaliana* in absence (◆) or presence (■) of earthworms, for different doses of *Micrococcus luteus*. Grey intensity indicates increasing doses; 0: no bacteria; 1: 10⁵ CFU; 2: 10⁶ CFU; 3: 10⁷ CFU ml⁻¹

Correlation between measured IAA and factors

Surprisingly, we found no correlation between *M. luteus* inoculum and the dose of IAA produced by cultivable microorganisms extracted from soil in the different treatments ($P = 0.26$). Conversely, we found a significant correlation between IAA production and the presence of earthworms ($P = 0.009$).

3.6. Correlation between IAA production by cultivable bacteria and plant parameters

When tested on all data whatever the treatment, we found that several plant parameters were negatively correlated with IAA production by cultivable microorganisms: shoot biomass ($P = 0.017$), floral stem biomass ($P = 0.022$) and floral stem height to a lesser extent ($P = 0.090$). When plants submitted to earthworm presence were analyzed separately (E0, E1, E2 and E3), we found that root biomass ($P = 0.026$), leaf area ($P = 0.0072$), leaf biomass ($P = 0.031$), and to a lesser extent the percentage of root biomass in the >600 μm diameter class ($P = 0.073$), and 0-100 μm diameter class ($P = 0.0604$), were all positively correlated with the production of IAA by cultivable microorganisms. There was no correlation of IAA production with plant parameters for plants which were not submitted to the presence of earthworms (C0, C1, C2 and C3).

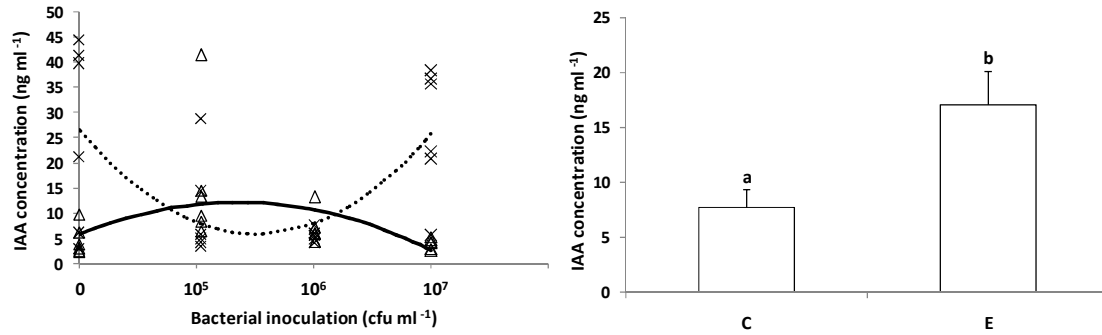


Figure 7: (a) Relationship between the inoculation dose of *Micrococcus luteus* on IAA production by cultivable soil micro-organisms in absence (x) or presence (Δ) of *Aporrectodea caliginosa* and their respective regression (---) ($y = 0.0374x - 0.0035x^2 - 0.0879$) and (\cdots) ($y = -0.0997x + 0.009x^2 + 0.2809$). A log transformation ($\log(x+10000)$) was applied on the bacterial inoculation dose to obtain an homogeneous distribution on the x-axis; and (b) the effect of *Aporrectodea caliginosa* on IAA production by cultivable soil micro-organisms. Means \pm s.e., n=24 per treatment, different letters indicates a significant difference, Tukey HSD, P-Value < 0.05.

4. Discussion

4.1. What is the effect of *M. luteus* on the growth and development of *A. thaliana*?

In our experiment, we observed a significant negative effect of the dose of *M. luteus* on plant total, above and below-ground biomasses. With some exceptions, it can be generalized that the greater the density of DRB, the greater the growth inhibition (Nehl *et al.*, 1996). This negative effect of our *M. luteus* strain was surprising to us, since it had been selected from a rhizospheric soil for its positive effect on biomass production of red radish (*Raphanus sativus*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) (Arguello *et al.*, 2011). A negative effect of *M. luteus* has already been observed on lettuce (*Lactuca sativa* cv. Noga 936) root growth, 96h after seed humectation; this was interpreted as an effect of the high amount of IAA produced by *M. luteus* ($195.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ after 84h of culture at 27°C) (Barazani & Friedman, 1999). The host specificity of DRB has already been discussed (Nehl *et al.*, 1996; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). As with all pathogens, DRB are pathogenic on some hosts and not others (Schippers *et al.*, 1987). For example, *Azotobacter paspali* has almost absolute specificity for a single ecotype of *Paspalum notatum* Aüggé (Dobereiner & Pedrosa, 1981).

We thus confirm the idea that rhizobacteria are *a posteriori* categorized either as deleterious rhizobacteria (DRB) or plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) according to bioassays of their effects on plant growth (Nehl *et al.*, 1996), depending on the couple of plant-bacteria considered and on the abundance of the bacteria. There is no physiological,

morphological or other characteristic identified so far as an indicator of the effect of rhizobacteria on plants (Schroth & Hancock, 1982).

4.2. Is there a control due to the presence of earthworms?

In our experiment, earthworms had a positive effect on plant growth (especially roots) when no bacteria were inoculated. This positive earthworm effect however decreased with the dose of *M. luteus*, and finally disappeared at 10^7 CFU ml⁻¹ (Figure 2). The slope of the regression line for root biomass was more negative in the presence than in the absence of earthworms (Figure 2b). This reveals that instead of a control of *M. luteus* effect by earthworms, we observed a disappearance of earthworm positive effect when the inoculum of *M. luteus* was increasing. The earthworm *Aporrectodea caliginosa* is thus not relevant to be used as a biocontrol agent against *M. luteus* for *Arabidopsis thaliana* in edaphic and climatic conditions set in this experiment.

4.3. What can we learn about the mechanism of action of *M. luteus* and earthworms?

Several mechanisms have been proposed to explain the negative effect of DRB on plant growth (see (Nehl *et al.*, 1996) for a detailed review). An interesting mechanism which could explain both negative and positive effects on plant growth could be that inhibitory or promoting effects of DRB and PGPR respectively are due to the production of IAA by bacteria. Up to 80% of rhizobacteria can synthesize indole-3-acetic acid (IAA) (Loper & Schroth, 1986). Root growth promotion by free living PGPR, e.g., *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Acetobacter diazotrophicus*, species of *Azospirillum*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*, as well as by symbionts, such as *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* spp., has been related to low levels of IAA secretion (Patten & Click, 1996). In contrast, the inhibitory effect of some deleterious rhizobacteria (DRB) has been related to high amounts of IAA excretion, e.g., *Enterobacter taylorae* (Sarwar & Kremer, 1995) and *Pseudomonas putida* (Xie *et al.*, 1996). In a convincing study, bacteria responsible for the suppression of root growth (*M. luteus*, *Streptoverticillium* sp., *Pseudomonas putida*, and *Gluconobacter* sp.) were shown to produce high levels of IAA (76.6 MM), whereas four isolates responsible for a positive effect on plant growth (*Agrobacterium* sp., *Alcaligenes piechaudii*, and two different strains of *Comamonas acidovorans*) secreted lower levels of IAA (16.4 MM) (Barazani & Friedman, 1999). A similar conclusion could be drawn from the effect of several concentrations of *Pseudomonas thivervalensis* (an IAA-producing strain) on *Arabidopsis* root length and branching (Persello-Cartieaux *et al.*, 2001): an inoculum of 10^5

CFU ml⁻¹ gave reproducible developmental and morphological changes on colonized plantlets whereas above 10⁶ CFU ml⁻¹ the bacterization caused irreversible damage to plants. An important consideration in predicting whether IAA-producing bacteria stimulate or inhibit root growth is therefore the concentration of IAA that would actually be disposable for plants (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

The level of IAA produced by *M. luteus* is one of the highest observed among a high number of cultivable bacteria retrieved from plant rhizosphere, i.e. 195.1 µM (Barazani & Friedman, 1999). In our study, the decrease in plant biomass as the bacterial inoculum increased could thus be explained in a first attempt by the fact that IAA production per bacteria or bacterial population are too high to induce positive effect on plant, even at 10⁵ CFU ml⁻¹. However, we did not observe correlation between *M. luteus* dose and the production of IAA by cultivable bacteria extracted from the soil at the end of the experiment (see Results section). As *M. luteus* has been isolated in the same way than we cultivated bacteria for IAA production assessment, this is probably not due to the extraction procedure. There was probably a factor responsible for the decorrelation between *M. luteus* dose and the production of IAA by cultivable bacteria. Above a given threshold at which the dose of bacteria and/or IAA becomes harmful, the plant itself could have exerted a control on IAA producing bacteria, by maintaining them at low density in the soil, or at a physiological state which is not associated with a high IAA production. Indeed, it has been demonstrated that plant can take an active part in the regulation of microbial IAA biosynthesis. For example, transcription of *ipdC*, an *Erwinia* IAA biosynthetic gene, is induced in response to bean and tobacco compounds (Brandl & Lindow, 1997). As the capability to produce auxins from tryptophan is common among soil micro-organisms, it is tempting to assume that bacterial auxin synthesis is dependent upon plant-exuded tryptophan (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). By reducing tryptophan exudation, plant could thus limit the production of IAA by microorganisms.

The story complicated again when integrating the effect of earthworms: statistical analyses showed that earthworm presence was associated with a higher level of IAA production, and that the interaction between *M. luteus* dose and earthworms also had a significant effect on IAA production (Figure 7b). We could imagine that earthworms have stimulated *M. luteus* population growth or its production of IAA at 10⁵ CFU ml⁻¹, plant was responsible for an inhibition of IAA production at 10⁶ CFU ml⁻¹, but was no more able to control bacteria population when 10⁷ CFU ml⁻¹ were inoculated in the presence of

earthworms, explaining the increase in IAA production and the decrease in plant biomass (Figure 2).

Finally, we only measured IAA production by microorganisms extracted at one single time, not the kinetic of IAA production. However, it is likely that both earthworms and bacteria have not produced signal molecule exactly at the same rate along the experiment. In fact, earthworms affected vegetative stages (Figure 3), whereas *M. luteus* affected floral stages (Figure 4). A survey of IAA production all along the experiment will probably greatly improve our understanding of biotic interactions through signal molecules. In addition, other parameters such as leaf area (Figure 5) or root biomass distribution in diameter class (Figure 6) were affected only by the interaction between *M. luteus* and *A. caliginosa*, suggesting that synergistic effects of both the organisms could be determinant for specific parameters of plant development. This could be explained by the diversity of signal molecules in general, or the diversity of auxines (e.g. IAA, IALD, ILA...), which could potentially be involved in plant growth promotion or inhibition (Sarwar & Kremer, 1995). More investigations are needed to understand the consequence of this molecule cocktail and its kinetic.

4.4. Conclusion

In this study, we observe that *M. luteus*, a bacteria selected for its high IAA production and a positive effect on red radish (*Raphanus sativus*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*), was responsible for a density dependant negative effect on *Arabidopsis thaliana* biomass production, whereas the earthworm *Aporrectodea caliginosa* was responsible for a positive effect. When testing the possibility to use this earthworm as a biocontrol agent of the Deleterious Rhizo-Bacteria, we found the opposite result from what we expected: the negative effect of the bacteria observed at the highest density was the same in the presence or absence of earthworms, i.e. the positive effect of earthworms disappeared. The exact mechanisms involved in earthworms and *M. luteus* effects are still to unravel. If both have been proposed to be due to signal molecules such as IAA, our experiment stresses on the need for a temporal analysis of IAA production, and the development of screening methods to identify the diversity of signal molecules produced in the presence of micro and macro-organisms. Such a better understanding of signal molecules could be of major help in developing alternative agricultural practices through soil ecological engineering.

Acknowledgements

This work has been supported by the University Paris-Est Créteil.

Chapitre 4 : Impact du vers de terre *Aporrectodea caliginosa* sur la pathogénicité du piétin échaudage du blé

Avant propos

Les vers de terre semblent capables d'induire des mécanismes de résistance systémique induite (ISR) chez *A. thaliana* (Puga-Freitas *et al.*, accepted). Ce mécanisme passe par la stimulation de certaines populations de PGPR. Cette induction d'une ISR par les vers de terre pourrait être à l'origine de l'impact significatif qu'ont les vers de terre sur la réduction de certaines maladies des plantes (Stephens *et al.*, 1994; Blouin *et al.*, 2005; Elmer, 2009). Cependant, l'induction d'un mécanisme d'ISR chez les plantes par les PGPR est fortement dépendante du génotype de la plante. Afin de conforter les résultats obtenus avec *A. thaliana* il serait donc intéressant d'étudier l'impact du vers de terre sur une maladie affectant une autre espèce de plante, notamment d'intérêt agronomique.

Dans cette étude, nous avons étudié l'impact des vers de terre *A. caliginosa* sur la maladie du piétin échaudage affectant le blé (*Triticum aestivum*). Dans une expérimentation en serre, la sévérité de cette maladie appelée piétin échaudage, et causée par le champignon pathogène *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, est réduite en présence de vers de terre. Ces résultats viennent confirmer le rôle du vers de terre comme agent de contrôle biologique efficace dans la suppression de cette maladie (Stephens *et al.*, 1994; Stephens & Davoren, 1995). L'étude du transcriptome du blé en réponse à *A. caliginosa* ne présente pas de modifications similaires à celles induites sur le transcriptome d'*A. thaliana*. Ceci souligne que l'issue de l'action des vers de terre sur les plantes, mécanisme qui semble dépendant des bactéries de la rhizosphère, est difficilement prédictible. Concernant la maladie, la sévérité semble due à une manipulation par le champignon des mécanismes de défense basale de la plante ainsi que d'une dérégulation des voies de biosynthèse et de la signalisation de nombreuses hormones végétales. Cette dérégulation est un mécanisme connu, qui est induit lors de l'infection par de nombreux champignons tels que *Botrytis cinerea*, afin de faciliter l'infection. Sur les plantes infectées, la présence de vers de terre n'a qu'une faible incidence sur la dérégulation de ces gènes. Ceci suggère que la réduction de la sévérité de la maladie par les vers de terre passe probablement par un autre mécanisme que l'induction de résistance systémique chez la plante. Les vers de terre ne changeant pas les propriétés chimiques du sol dans un sens qui pourrait être néfaste pour la maladie, l'hypothèse la plus parcimonieuse au regard de la littérature serait un changement au niveau de la composition microbienne de la rhizosphère. Certains sols ont été identifiés comme n'étant pas compatibles avec le développement de cette maladie. Cette incompatibilité a été corrélée avec la structure des

communautés microbiennes de ces sols. Les vers de terre stimulent des communautés microbiennes, en particulier des bactéries, ce qui pourrait augmenter la compétition pour les ressources et défavoriser le piétin qui est sensible à la compétition (Cook, 2003). Ces bactéries pourraient également émettre des composés antibiotiques nuisibles pour le champignon. Même si le transcriptome du blé reste fortement dérégulé, l'antagonisme des bactéries du sol avec le piétin pourrait ralentir la progression du mycélium, réduisant en conséquence la sévérité de la maladie.

Cette étude fait l'objet d'un article qui est en cours de rédaction, en vue d'une soumission à *Molecular Plant-Microbe Interaction*.

Le tableau supplémentaire (Supplementary Table 1) est fourni en Annexe 1.

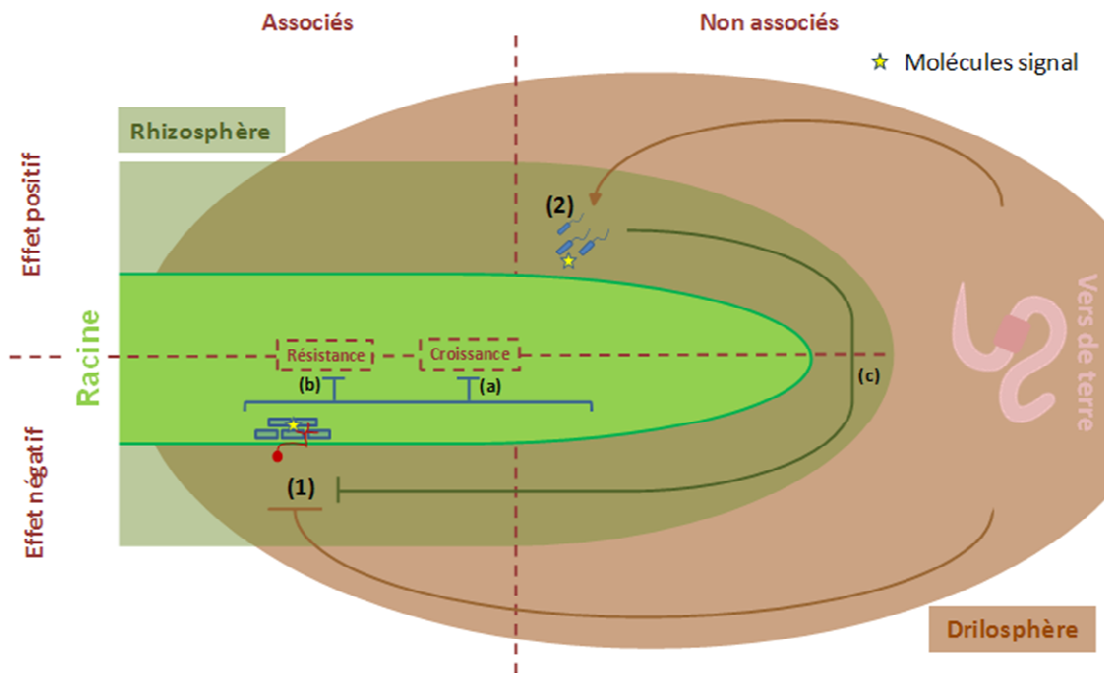


Figure 12 : Synthèse des résultats de l'effet du vers de terre *A. caliginosa* sur l'incidence de la maladie du piétin échaudage chez le blé (*Triticum aestivum*). La maladie du piétin échaudage, causée par (1) le champignon tellurique *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* est responsable (a) d'un impact négatif sur la croissance du blé. L'analyse du transcriptome du blé en réponse à l'attaque de ce champignon révèle une forte modulation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse hypersensible et dans la voie de signalisation de nombreuses hormones végétales. Ces hormones végétales sont impliquées dans (a) des processus de croissance et (b) des mécanismes de défense. La modulation de l'expression de gènes impliqués dans des mécanismes de résistance par le champignon va probablement faciliter la progression de la maladie. En présence de vers de terre, l'incidence de la maladie est fortement réduite. Cependant, le ver de terre ne semble pas modifier la réponse de la plante comme suggéré par l'absence de différence au niveau du transcriptome. Le mode d'action des vers de terre semble passer par un effet direct sur le pathogène (prédation ou modification de l'environnement) ou via la simulation de (2) certaines populations de PGPR. Ces populations de PGPR pourraient avoir (c) une action antagoniste sur le piétin à travers la synthèse de composés antibiotiques ou encore via une compétition pour les nutriments.

Title

Take-all disease involves hypersensitive response and hormonal control of wheat by the pathogenic fungus *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, which can be depleted in the presence of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*.

Authors

Ruben Puga-Freitas¹, Lamia Belkacem², Sébastien Barot³, Jean Roger-Estrade², Michel Bertrand², Manuel Blouin¹

Affiliations

¹UMR Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux, Université Paris-Est, 61 avenue du Général De Gaulle, 94010 Créteil cedex, France

²UMR 211 INRA/AgroParisTech. Thiverval-Grignon, 78850, France

³UMR Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux, IRD, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris cedex 5, France

Corresponding author

Puga-Freitas Ruben

ruben.puga-freitas@u-pec.fr

tel: +33 1 45 17 16 14

UMR Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux, Université Paris-Est,

61 avenue du Général De Gaulle, 94010 Créteil cedex, France

Abstract

The take-all disease caused by the soilborne fungus *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* (*Ggt*) is one of the most-studied and widespread root diseases worldwide. Through the deterioration of roots, this fungus disrupts the water flow to the shoots, causing the death of plants. The actual absence of plant genetic resistance and efficient fungicide against this disease stimulate the development of alternative management strategies such as crop-rotation or the use of biological control agent such as earthworms. Here, we investigated the ability of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to induce take-all disease tolerance in wheat. In a greenhouse experiment, we compared the effect of earthworms, *G. graminis* and the presence of both the organisms on wheat growth, development and resistance to take-all. Gene expression was studied by transcriptome analysis to get some insights in the mechanisms involved in earthworm and *G. graminis* effects on plants. Our results showed that *G. graminis* was responsible for a lower growth of plant shoots, whereas earthworms were responsible for an increase in plant height as compared with the control plants during a first phase, which then disappeared. At the end of the experiment, *G. graminis* had a strong negative impact with an 81% and 83% decrease in wheat root and shoot biomass respectively. However, when earthworms were present in association with *G. graminis*, the density of necrosis was significantly reduced by 63%, and no significant reduction in plant growth was observed in comparison with control plants. Earthworms were thus responsible to take-all disease suppression. As far as mechanisms are concerned, 212, 1461 and 1717 genes were differentially expressed as compared with the control in the presence of earthworms, *G. graminis* and both the organisms respectively. Genes involved in the hypersensitive response and in many hormones signaling pathways were modulated during the disease induced by *G. graminis*. This manipulation of plant metabolism by these mechanisms is known to be induced by several pathogens in a way that facilitates their infection. Mechanisms involved in the reduction of take-all severity by earthworms did not seem to modify hypersensitive response and hormonal pathways, as suggested in literature. Rather, earthworms were likely to act directly on the pathogen or by stimulating soil microorganisms which have an antagonistic effect on *G. graminis*. Our study provides new insights on molecular mechanisms involved in take-all disease and shows the high potential of earthworms in the control of take-all disease of wheat.

Introduction

Take-all disease caused by the soilborne fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) is the most widespread and studied root disease of winter wheat. Besides the infection of wheat, it also affects barley and rye in a lesser extent and occurs particularly in areas of intensive and continuous cultivation of cereals. This fungus, growth as superficial mycelium on roots and produce feeder hyphae that penetrate root tissues and colonize the cortex leading to the destruction of the root system (Cook, 2003; Freeman & Ward, 2004; Agrios, 2005). Then the pathogen remains into the soil and survives saprophytically in the dead roots and stem bases used as food source to infect the next host crop. Nevertheless, molecular mechanisms involved in *G. graminis* infection are still unknown.

Neither the absence of host plant resistance nor effective fungicides are efficient (Cook, 2003; Freeman & Ward, 2004). This has led to develop alternative control management (for Review see Cook, 2003). Chemical control which principally consists in the use of soil fumigants appears to be not affordable for an agronomic crop such as wheat (Cook, 2003). At this time, take-all decline depends primarily on cultural practices, in particular crop rotation with non host plants to break the infestation cycle. Another cultural control use fertilization such as ammonium rather than nitrate to make the wheat rhizosphere more acidic and detrimental to *G. graminis* (Cook, 2003). A great deal of last decades research has been to try to discover and develop biological controls of take-all. Some soils were shown to be suppressive to take-all, whereas others were conducive to the disease (Freeman & Ward, 2004). Efforts to isolate the cause of this suppression focused primarily on isolating microorganisms antagonist to these pathogen (Freeman & Ward, 2004) from soil where take-all decline was observed.

It has been shown that take-all decline (soil suppressiveness) was brought about by root-colonizing bacteria that are antagonistic to *G. graminis* and inhibit its growth on the root surface. Bacterial strains have been found that inhibit the fungus effectively in laboratory tests. Among these bacterial strains, *Pseudomonas fluorescens* has a high potential as an efficient biological control agent (Chapon *et al.*, 2002; Cook, 2003; Freeman & Ward, 2004; Daval *et al.*, 2011). But *in vitro* screening or pot experiments are not necessarily effective in the field (Freeman & Ward, 2004).

Among other biological control agents, earthworms have already be showed to be effective against *G. graminis* (Stephens *et al.*, 1994; Stephens & Davoren, 1995; Clapperton

et al., 2001) and several others plant pathogens such as *Plasmodiophora brassicae*, *Fusarium oxysporum*, *Heterodera sacchari* or *Venturia inaequalis* (Brown *et al.*, 2004; Elmer, 2009; Wurst, 2010). Further their reduction of the severity of several plant diseases, mechanisms through which earthworms act on plant disease are still not understood. Moreover, earthworms are known to have strong impacts on the N cycle. An additional flux of 63 kg N ha⁻¹ year⁻¹ through earthworms could count for 38% of the total N uptake by the sorghum crop (Parmelee & Crossley, 1988); this additional N could help the plant in facing fungal infection. Earthworms are also an important driver of nitrification, denitrification and ammonification (Parkin & Berry, 1999). This change in N form between NO₃⁻ and NH₄⁺ can be associated with a change in soil pH, which could lead to soil alcalinization or acidification, respectively favorable and harmful for *G. graminis*.

Here we investigated the potential control of take-all disease by earthworm on wheat plants. Through a microarray analysis we investigated plant response to *G. graminis* to identify the mechanisms involved in the disease and to understand and determine how earthworms eventually alleviate this disease.

Materials and methods

Soil

Soil was collected at the INRA research center (Thiverval-Grignon, France) in a field free from wheat, conducted in monoculture of maize, then shorgo. It was dried at 25°C for a week and sieved at 2 mm mesh size. This soil has the following properties: total organic carbon content, 27.1 g kg⁻¹; total nitrogen content, 1.28 g kg⁻¹; pH, 8.31; CEC, 14.5 cmol kg⁻¹; texture: 28.7% clay, 55.1% silt, 16.2% sand.

Earthworms

Aporrectodea caliginosa Savigny (Annelida, Oligochaeta) is an endogeic earthworm which makes horizontal or randomly oriented burrows, considered to be temporary structures because they are rarely reused (Sims *et al.*, 1985). In the experiments, living earthworms were added to the devoted microcosms at a density of 1.8 mg cm⁻³, close to the one observed in the field in France (Lavelle & Spain, 2001), 2 weeks after *G. graminis* inoculation.

Pathogen inoculation

Soil infestation was made by adding barley infested seeds by *G. graminis* provided by the INRA Bio3P (Rennes, France). In devoted experimental units, 1000 propagules corresponding to 1.60 g of seeds were mixed to the soil. In treatments without pathogen, the same amount of non-infested barley seeds were mixed to the soil. At the end of the experiment, for each treatment and experimental unit, the number roots with necrosis lesion was counted and reported to their respective root biomass. A necrosis index (called necrosis) was then calculated, corresponding to the amount of necrosis per root biomass.

Experimental protocol

Seeds of *Triticum aestivum* cv Soisson were purchased from the breeder Florimond-Desprez (Cappelle-en-Pévèle, France). Seeds were germinated for 48 h and vernalized during two weeks at 5°C. One week after the introduction of the earthworms, three seeds of wheat were sown per microcosm and grown in experimental PVC units (10 cm diameter, 15 cm height, n=10), filled with 900 g DW soil and maintained at 75% of the field capacity by weighing pots two times a week. Three earthworms (for a total of 1.5 g on average) were introduced. After one week, three seeds were sown per microcosm and grown in greenhouse at a density of 24 experimental units per square meter following these conditions: 13 °C and 11 °C day and night temperatures during the first 5 days, 19 °C and 13 °C day and night temperatures from 5 days to the end of the experiment and 75% ± 5% relative humidity.

Root system analysis

Dry root biomass distribution between diameter classes was established according to the method of Blouin et al. (2007) inspired from granulometry methodology. Briefly, shredded dry roots were passed through a column of sieves with decreasing mesh sizes; biomass distribution according to root diameter was assessed by weighing the biomass recovered in each sieve (Blouin *et al.*, 2007a).

Soil chemical analyses

Total carbon and nitrogen were analyzed by elemental analysis after dry combustion (NF ISO 10694 and NF ISO 13878). Soil nitrate and ammonium contents were determined by KCL extraction and quantified by spectrophotometry. Phosphorus was determined by spectrometry (NF ISO 11263). All these analyses were made at the INRA "Laboratoire

d'Analyse des Sols" (Arras, France). For each treatment, approximately 50 g of soil were taken from three separate microcosms and used for analysis.

Transcriptome analysis

RNA extraction and microarray analysis

Plant leaves of three replicates of each treatment were sampled after 52 days. RNA was extracted using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, France) with an on-column DNase digestion using DNase I (Qiagen, France). The quality of the RNAs was assessed by capillary electrophoresis using the Agilent Bioanalyser (Agilent, Santa Clara, U.S.A.) and its concentration was measured by its absorbance at 260 nm on a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.).

For microarray analysis, total RNA was processed by PartnerChip. This analysis was performed on Affymetrix GeneChip Wheat Genome arrays containing 61 127 probes sets corresponding to more than 55 052 Unigene clusters, according to the two-cycle amplification protocol from the manufacturer (Affymetrix, U.S.A). In brief, 200 ng of total RNA was reverse transcribed in presence of T7 oligo(dT) primer and Superscript II Reverse Transcriptase to generate first-strand cDNA. Second-strand was synthesized using DNA polymerase I and RNaseH. After second-strand synthesis, *in vitro* transcription was carried out using T7 RNA polymerase and biotinylated nucleotides analog/ribonucleotide mix for cRNA labeling (GeneChip IVT Labeling Kit, U.S.A) then cleaned up using the GeneChip Sample Cleanup Module and quantified by absorbance measurement at 260 nm. The resulting biotinylated cRNA was fragmented by incubation in a fragmentation buffer at 94°C for 35 min to reduce the fragment size to approximately 100-120 nucleotides. Fragmented cRNA was hybridized on Affymetrix GeneChip Wheat Genome array for 16 h at 45°C along with internal hybridization controls. Washing and staining procedures were performed in an Affymetrix Fluidics Station 450. Probe arrays were exposed to ten washes in non-stringent wash buffer A (6x SSPE, 0.01% Tween20) at 30°C, followed by six washes in stringent buffer B (100mM MES, 0.1M [Na⁺], and 0.01% Tween20) at 50°C. Biotinylated cRNA were stained with a streptavidin–phycoerythrin conjugate (SAPE, 10 µg ml⁻¹) and washed again 10 times with non-stringent buffer A. Finally, arrays were scanned in an Affymetrix GeneChip Scanner 3000.

Probe-level expression data (CEL files) were produced using GeneChip[®] Operation Software (GCOS) version 1.4 and data were normalized using the MAS5 algorithm. Quality-control and statistical analyses (background adjustment, normalization, and probe-level summarization of data) used the GC-Robust Multi-Array average algorithm (GC-RMA) from the GeneSpring GX11 Software.

Annotation and database analysis

Since wheat genome was poorly annotated, we completed the annotation given by Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>) by a transcript characterization following the recommendations (http://jcvl.org/wheat/annotate_methods.shtml) of the Wheat Genome Database. For all the genes, an annotation on the *Arabidopsis thaliana* genome was made by comparison with RefSeq proteins of the cluster transcripts of the UnigeneID. A Gene Ontology function was attributed to each genes according to the functional genomics tool DAVID (Huang *et al.*, 2008; 2009) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>). Finally, a pathway analysis for all genes with modified transcript abundance was performed thanks to KEGG pathway mapping tool (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

Results

During the first 38 days of the experiment, *A. caliginosa* significantly promoted *T. aestivum* height (Fig. 1a) by 36%, 31% and 28% respectively for 13, 28 and 38 after sowing, whereas they had a small effect on plants exposed to *G. graminis* (*Ggt* + E). After day 38 to the end of the experiment, earthworms (E) had no longer significant effect. Conversely to what happened in the treatment without *G. graminis*, earthworms had a positive impact on the height of plants infested by *G. graminis* (*Ggt* + E) after day 38. Earthworms increased the height of plants exposed to *G. graminis* by 47% and 39% as compared with plant with only *G. graminis*, at 50 and 63 days respectively. After 63 days, at the end of the experiment, no significant differences subsisted in the height of plants between the treatments with earthworms and control plants (*Ggt*+E, E and C) whereas *G. graminis* without earthworms significantly reduced it by 37% as compared to control plants. This negative impact of *G. graminis* was also found on above-ground, below-ground and total plant biomass (Fig. 1b) with a reduction by 83%, 81% and 82% respectively, as compared to control plants (C). In the presence of earthworms (*Ggt* + E) this negative impact of *G. graminis* was less important with

a reduction by 41% of above-ground, below-ground and total plant biomass as compared to control plants (C).

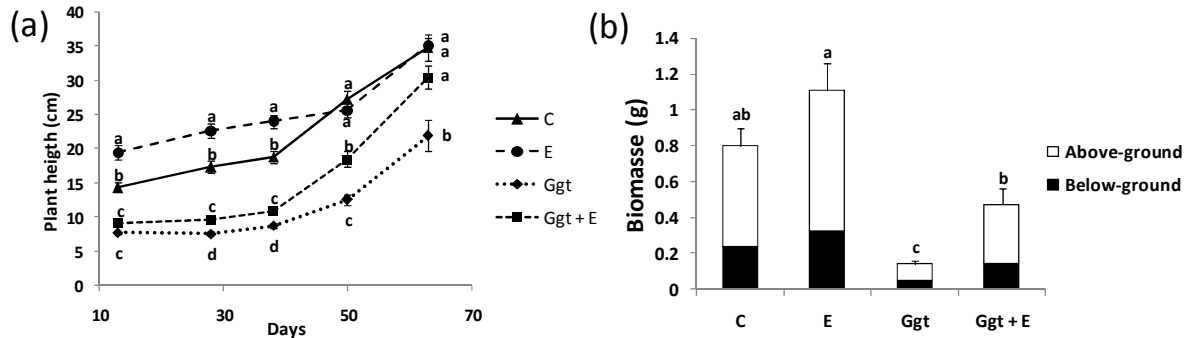


Figure 1: Effect of *Aporrectodea caliginosa* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on the height and biomass of *Triticum aestivum* during the experiment (63 days). Effect of *Aporrectodea caliginosa* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on: (a) plant height during the experiment (63 days) and (b) above-ground, below-ground and total plant biomass. C: control treatment; E: treatment with earthworms; Ggt: treatment with the pathogenic fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*; Ggt + E: treatment with *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and earthworms. Means \pm s.e., n=5 for C and E treatment and n=10 for Ggt and Ggt + E treatments, different letters indicates a significant difference, Tukey HSD, P-Value < 0.05.

The positive impact of earthworms on wheat plants infested with *G. graminis* was also observed on parameters such as necrosis per root biomass (Fig.2a). Earthworms partially suppressed disease symptoms on plants infested with *G. graminis* (Ggt+E) by significantly reducing it by 63% (P-value = 0.004) when compared to plants infested with *G. graminis* (Ggt).

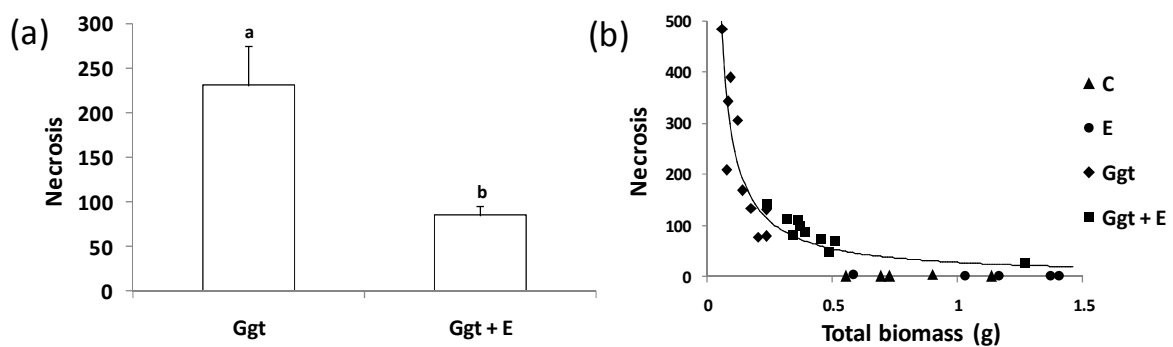


Figure 2: Effect of *Aporrectodea caliginosa* on the severity of the symptoms caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on *Triticum aestivum*. Effect of *Aporrectodea caliginosa* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on: (a) necrosis notation on wheat roots, (b) relationship between the number of necrosis and the total biomass ($y = 26.8 / x$). C: control treatment; E: treatment with earthworms; Ggt: treatment with the pathogenic fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*; Ggt + E: treatment with *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and earthworms. Means \pm s.e., n=5 for C and E treatment and n=10 for Ggt and Ggt + E treatments, different letters indicates a significant difference, Tukey HSD, P-Value < 0.05.

The severity of disease symptoms (Fig. 2a) seemed to be inversely correlated to the effect observed on total biomass in a non-linear way (Fig.2b): the more the amount of necrosis, the less the total biomass.

Concerning plant morphology, *G. graminis* strongly impacted leaf area and root diameter (Fig. 3a and b). *G. graminis* reduced leaf area by 78% and increased the proportion of thick roots (200 at 630 μm) at the expense of small ones ($>200 \mu\text{m}$). Earthworm had a positive impact on leaf area of plants infested with *G. graminis* but had no effect on the root morphology. The proportion of thin roots was more important in the plants without *G. graminis* (C and E) as compared to treatments with *G. graminis* (*Ggt* and *Ggt + E*). For all the treatments, the higher proportions of roots had a diameter between 400 and 200 μm (Fig. 3b).

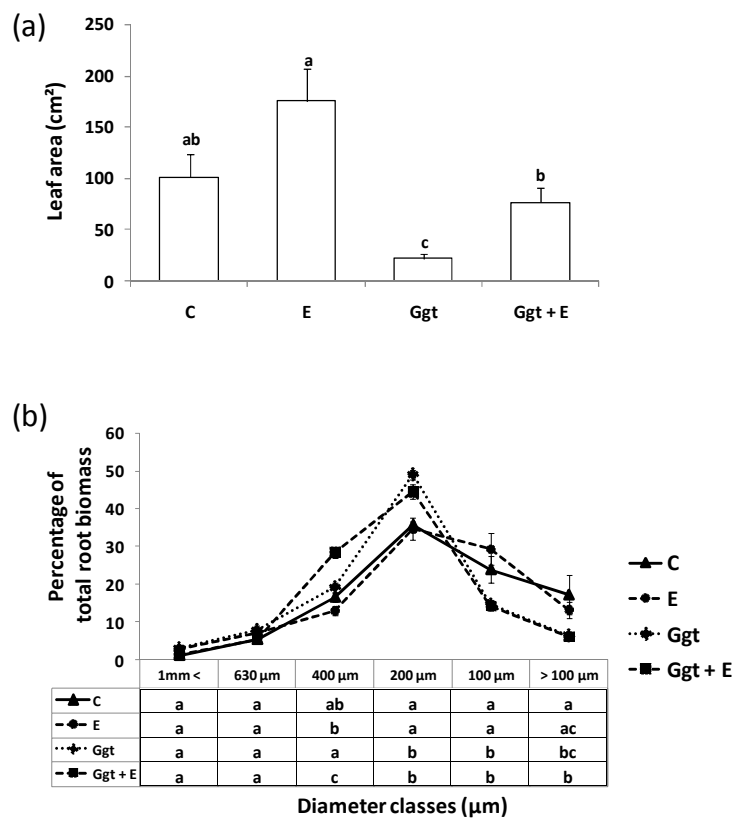


Figure 3: Effect of *Aporrectodea caliginosa* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on the above-ground and below-ground morphology of *Triticum aestivum*. (a) Effect of *Aporrectodea caliginosa* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on leaf area and (b) root distribution. C: control treatment; E: treatment with earthworms; *Ggt*: treatment with the pathogenic fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*; *Ggt + E*: treatment with *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and earthworms. Means \pm s.e., n=5 for C and E treatment and n=10 for *Ggt* and *Ggt + E* treatments, different letters indicates a significant difference, Tukey HSD, P-Value < 0.05.

Soil nitrate content was deeply modified in presence of *G. graminis* (Fig.4) with a significant 115% increase as compared to control (P-value = 0.006). Earthworms had also a positive effect on nitrate content by increasing it by 58%, but this difference was not significant (P-value = 0.40). This increase in soil nitrate content in presence of earthworms (E) and *G. graminis* (*Ggt*) seems to be additive since in presence of both organisms (*Ggt* + E) total nitrate content was increased by 166%.

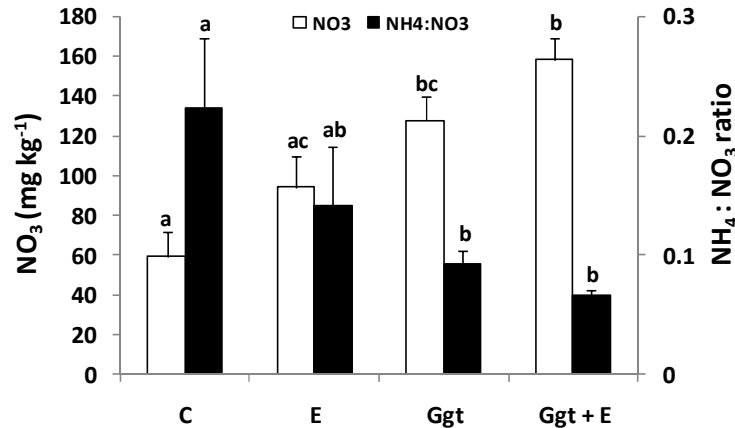


Figure 4: Effect of *Aporrectodea caliginosa* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on soil nitrate content and ammonium : nitrate ratio. C: control treatment; E: treatment with earthworms; *Ggt*: treatment with the pathogenic fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*; *Ggt* + E: treatment with *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and earthworms. Means \pm s.e., n=5 for C and E treatment and n=10 for *Ggt* and *Ggt* + E treatments, different letters indicates a significant difference, Tukey HSD, P-Value < 0.05.

Earthworms had also a positive effect on nitrate content by increasing it by 58%, but this difference was not significant (P-value = 0.40). This increase in soil nitrate content in presence of earthworms (E) and *G. graminis* (*Ggt*) seems to be additive since in presence of both organisms (*Ggt* + E) total nitrate content was increased by 166%. No significant differences were observed for the other measured parameters: carbon, nitrogen, ammonium and phosphate (Table 1). Since no changes in ammonium content were observed, the ammonium : nitrate ratio (Fig.4) show an inverted pattern than nitrate concentration, with the higher NH₄⁺ : NO₃⁻ ratio of 0.22 was found for control treatment and the minor i.e. 0.07, for *Ggt* + E treatment.

Table 1: Effect of *Aporrectodea caliginosa* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on soil chemical properties

	Total C (g kg ⁻¹)		Total N (g kg ⁻¹)		NH ₄ ⁺ (mg kg ⁻¹)		P (P ₂ O ₅) (g kg ⁻¹)	
Treatment								
C	19.9 ± 0.32	a	1.93 ± 0.30	a	10.46 ± 0.63	a	0.21 ± 0.02	a
E	19.22 ± 0.54	a	1.85 ± 0.32	a	10.30 ± 0.46	a	0.29 ± 0.03	a
Ggt	19.12 ± 0.20	a	1.99 ± 0.35	a	10.85 ± 0.63	a	0.25 ± 0.03	a
Ggt + E	19.23 ± 0.35	a	2.01 ± 0.30	a	10.00 ± 0.35	a	0.23 ± 0.01	a

C: control treatment; E: treatment with earthworms; *Ggt*: treatment with the pathogenic fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*; *Ggt* + E: treatment with *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and earthworms. Means ± s.e., n=5 for C and E treatment and n=10 for *Ggt* and *Ggt* + E treatments, different letters indicates a significant difference, Tukey HSD, P-Value < 0.05.

Microarray analysis of gene expression on *T. aestivum* after inoculation with *A. caliginosa* and/or *G. graminis*.

To obtain a global analysis of gene expression in *Triticum aestivum* (C) in response to the presence of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (E), the infection by *G. Graminis* (*Ggt*) and the impact of earthworm on plants infested with *G. Graminis* (*Ggt* + E), four independent microarray analyses were performed on three plants harvested at 58 days in each microcosm of all treatments. Wheat genome is fully sequenced but poorly annotated, and the best way to investigate pathways responsible for the plant response to pathogen and earthworms was to annotate genes with an UniGene ID on the basis of function known for the *Arabidopsis thaliana* genome. Results of the annotation (detailed on the M&M section) with their respective gene ontology function are available on Supplementary Table 1. Expression profile of each of the E, *Ggt* and E+*Ggt* treatments was compared to the control condition (without earthworms and *G. graminis*).

We observed that earthworms had a small effect on wheat gene expression (E vs C) with 212 genes differentially expressed, whereas *G. Graminis* has a stronger effect with 1461 genes differentially expressed (*Ggt* vs C) (Table 2). This small impact of earthworms on plant genes expression was also observed in plant infested with *G. graminis* since only six genes were differentially expressed (*Ggt* + E vs *Ggt*).

Table 2: Comparison of the number of differentially expressed genes between the treatments

	E vs C	Ggt vs C	Ggt + E vs C	Ggt + E vs Ggt
Up-Regulated	110	790	1016	3
Down-Regulated	102	671	701	3

C: control treatment; E: treatment with earthworms; *Ggt*: treatment with the pathogenic fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*; *Ggt + E*: treatment with *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and earthworms. The comparisons were made between two treatments. For the comparison *Ggt* vs C and *Ggt + E* vs C only the genes with a fold-change > 3 and a p-value < 0.05 were considered. For the comparison E vs C and *Ggt + E* vs *Ggt* only the genes with a fold-change > 1.5 and a p-value < 0.05 were considered.

Thanks to the DAVID database, we were able to assign a putative function to wheat non annotated genes. The low number of genes regulated in the presence of earthworms did not allow distinguishing specific class of genes regulated in their presence. The majority of the genes regulated by *G. graminis* infection belonged to the following functional categories (Fig.5): “oxidation-reduction process” (16.4 % of up-regulated genes and 17.5% of down-regulated genes), “response to abiotic stimulus” (15.1 % of up-regulated genes and 19.5% of down-regulated genes), “metabolism” (including phosphorus and lipid metabolism, 30.9% of up-regulated genes and 21.9% of down-regulated genes), “proteolysis” (5.9% of up-regulated genes and 4.8% of down-regulated genes), “transcription / translation” (11.8% of up-regulated genes and 14.3% of down-regulated genes), and “unclassified genes” (including unknown functions, 19.7% of up-regulated genes and 21.9% of down-regulated genes). Similar results were observed for expression profiles of plants submitted to *G. graminis* and earthworms (data not shown) since earthworms have a small impact on wheat gene expression of plants infested by *G. Graminis* (Table 2).

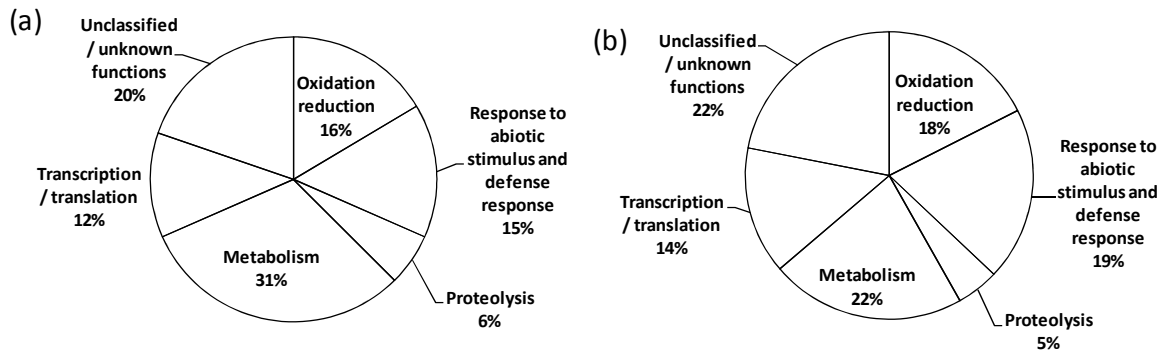


Figure 5. Functions of the *Triticum aestivum* genes differentially expressed in the presence of *Gaeumannomyces graminis var tritici*. Pie charts showing the percentage of (a) up-regulated and (b) down-regulated genes in each of the functional categories. Oxidation-reduction process; Response to abiotic stimulus; Metabolism = phosphorus, lipid and general metabolism; proteolysis; transcription / translation and unknown function. Functional classification was established according to the DAVID Bioinformatics Resources 6.7.

Discussion

Impact of *Gaeumannomyces graminis* on wheat

Large scale analysis of gene expression during the early steps of the disease was already studied (Guilleroux & Osbourn, 2004). Long term plant response to the fungus is however unknown and large scale screening seems to be an effective strategy. Microarray chip represent an efficient technique to obtain a rapid and large view of genes expressed during plant response to a stimulus. This analysis can give us reliable information on mechanisms involved in plant defence against the pathogen. Secondly, they allow us to investigate a putative modulation of these mechanisms by the earthworms leading to a potential take-all decline.

Looking at plant response to *G. graminis* at the level of transcript accumulation, we observed that the attack by this pathogen strongly influenced the transcriptome of the plant. During their multiple interactions with many pathogens, plants have developed along evolution several mechanisms to respond to those harmful organisms. One of these primary responses is the perception of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). PAMPs are common features of microbial pathogens, such as chitin, flagellin, glycoproteins and lipopolysaccharides (Pieterse *et al.*, 2009). Those molecules are recognized by plants surface receptors known as pattern-recognition receptors (PRRs). The activation of these receptors, after the signal transduction, are resulting in the activation of basal resistance mechanisms known as PAMP-triggered immunity (Pieterse *et al.*, 2009; Kombrink *et al.*, 2011). In

presence of *G. graminis*, wheat plants are able to recognize the presence of this pathogen as shown by the accumulation of transcripts for several genes involved in the signal transduction following the perception of PAMPs (Fig. 6). The transcript accumulation of genes such as *Rboh-F*, required to the full production of reactive oxygen intermediates (Torres *et al.*, 2002), and the high proportion of genes involves in oxidation – reduction process and proteolysis suggested that *G. graminis* induced a hypersensitive response (HR). HR is a basal plant defense mechanism, which involved an oxidative burst and a programmed hypersensitive cell death localized at the site of infection to limit the expansion of the pathogen (Pieterse *et al.*, 2009; Taiz & Zeiger, 2010).

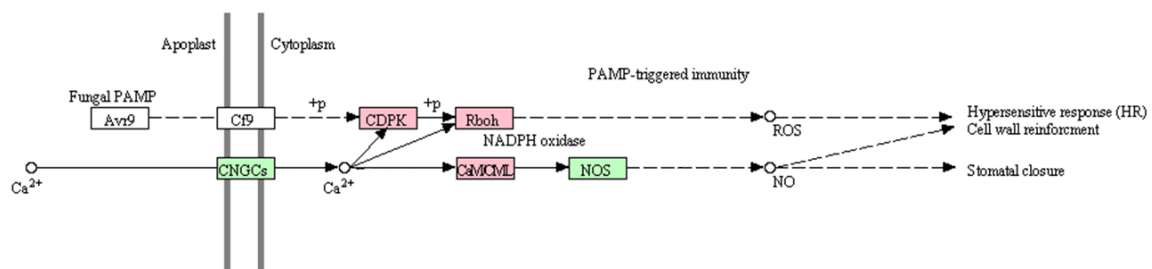


Figure 6. Pathway involved in the recognition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Triticum aestivum*. This signal transduction involves the calcium ion Ca²⁺ as secondary messenger. The recognition of the pathogen leads to the activation of the cyclic nucleotide gated ion channel (CNGC) and an increase in cytosolic Ca²⁺ concentration. Ca²⁺ bind to calmodulin (CaM) (or CaM-like protein, CML). This complex regulates the synthesis of downstream signaling components (nitric oxide, NO, and hydrogen peroxide, H₂O₂), which are essential for the development of the hypersensitive response (HR). The increase in Ca²⁺ elevation can activate H₂O₂ production through regulation of NADPH oxidase (Rboh) activity. CaM, CDPK, NO and H₂O₂ also play pivotal roles inactivating the expression of pathogen defense genes (adapted from Ma *et al.*, 2011). Arrows indicate activation unless noted otherwise. The squares correspond to a protein or a protein family that is involved in the PAMP-triggered immunity. Green square show proteins for which their respective gene are not modulated in our study. Pink squares show transcript accumulation in wheat in response to *G. graminis*, for at least one gene coding for the related protein. These genes are *CPK7* coding for a Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK), *Rboh - F*, coding for a NADPH oxidase Rboh (Respiratory burst oxidase homomlog) and a gene coding for a putative calcium-binding protein CML25 (CaMCML). Pathway analysis was established according to the KEGG pathway mapping tool (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

However, this hypersensitive response would favour growth of pathogens with a necrotrophic lifestyle, as their virulence strategy relies on their capacity to kill host cells (Glazebrook, 2005). It was also shown that some necrotrophic fungus like *Botrytis cinerea* could induce HR through the synthesis of elicitors, which results in the promotion of the disease (Govrin & Levine, 2000; Govrin *et al.*, 2006). According to the severity of take-all, we can postulate that this basal mechanism of defence is ineffective in confining the

pathogen, and could conversely promote the disease. As *G. graminis* could survive saprofitically on dead roots, we can argue that the stimulation of the HR response could facilitate the spread of the fungus.

***Aporrectodea caliginosa* reduce the severity of take-all**

In our study, earthworms induce take-all decline on plants exposed to *G. graminis*. Take-all decline was already observed in presence of the earthworms species *Aporrectodea rosea* and *Aporrectodea trapezoides* (Stephens *et al.*, 1994; Stephens & Davoren, 1995). Several mechanisms could explain the decline of take-all disease. One of them was a change in nutrient availability, especially nitrogen, since take-all disease was more important in restrained concentration of nutrients in the soils.

It has already been observed that the more severe the infection, the less important the N uptake by the crop (Macdonald & Gutteridge, 2012). This resulted in more mineral N (mostly nitrate) remaining in the soil as compared to plant less infected. This reduction of nitrate uptake was probably correlated to the fact that the root system in presence of *G. graminis* was reduced and has a lower proportion of thin roots as compared to control or earthworms treatments. Since thin roots are more efficient than the thicker ones on soil nutrient uptake, their inhibition by *G. graminis* could reduce N uptake. It has been shown that, in earthworms burrows, the amount of nitrifying bacteria is more important than in the surrounding soil (Businelli *et al.*, 1984; Parkin & Berry, 1999; Wu *et al.*, 2012). Ammonium content was weakly influenced by earthworms. Such effect on nutrient content was already observed in presence of the earthworm *A. caliginosa* (Jana *et al.*, 2010), with a strong influence of the earthworm on nitrate but not ammonium content. The high amount of nitrate in soils in the presence of both earthworms and *G. graminis* was probably the result of a decreased N uptake by the plant due to the infection by *G. graminis* coupled to the enhancement of the microbial nitrifying activity by the earthworms. All the others parameters (total N, total C and total P) were not significantly affected.

Take-all disease could be managed by providing the crop with ammonium rather than nitrate, with a concomitant acidification of the soil (Cook, 2003). Soil ratio of $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ close to 3 results in a soil acidification by an higher concentration of ammonium as compared to nitrate (Cook, 2003). But, in our study, this ratio doesn't seem to be a sufficient mechanism to explain positive effect of earthworms on take-all disease reduction since the $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ratio was around 0.1 for *Ggt* and *Ggt+E* treatments.

Since a change in nutrient distribution are not sufficient to explain take-all reduction, others mechanisms might be investigated. As *G. graminis* growth superficially and do not expand in soil, we can postulate that earthworms do not feed on this fungus. Moreover, earthworms do not seem to interact physically with wheat root system since no changes on root morphology (Fig. 3b) or growth (Fig. 1b) was observed. The stimulation of plants defence mechanisms by soil organisms such as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (van Wees *et al.*, 1999; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; van Wees *et al.*, 2008), collembolas (Endlweber *et al.*, 2011) and earthworms (Puga-Freitas *et al.*, accepted) has already been demonstrated. But, the induction of these defence mechanisms such as the induced systemic resistance (ISR) is not effective in all plant species and in all kind of soils (Bakker *et al.*, 2007). In the presence of earthworms only a small proportion of genes are modulated in wheat plants infested (*Ggt* + E) or not (E) with *G. Graminis* (Table 1) and these genes doesn't seems to be related to defence mechanisms such as ISR. We can argue that take-all decline mediated by earthworms was not mediated by an enhancement of wheat defence mechanisms, which would have been observed in wheat gene expression.

The last hypothesis was the stimulation by the earthworm of microbial antagonist populations. It was already observed that earthworms were able to reduce several soil borne diseases (Elmer, 2009). On asparagus plants, the amount of root lesions caused by *Fusarium oxysporum* was halved in the presence of earthworms, without significant changes in *Fusarium* density. The fact that earthworms did not act directly on pathogen density to reduce disease severity was supported by another studies interested in investigating the impact of two earthworms on *Fusarium* population (Wolfarth *et al.*, 2011) and the earthworm *Millsonia anomala* on the density of the nematological population of *Heterodera sacchari* (Blouin *et al.*, 2005). On their study, Elmer (2009) found that the reduction of the diseases might have been mediated through change in microbiological activity. The density of the population of the PGPR *Pseudomonas fluorescens* was increased in presence of earthworms. *P. fluorescens* is known to inhibit *G. graminis* by the production of several antibiotics compounds (Cook, 2003; Freeman & Ward, 2004). It was also showed that earthworms cast (dejection) and plant rhizosphere were survival hot spots for the soil-inoculated biological control agents *Pseudomonas protegens* (previously *Pseudomonas fluorescens*) CHA0 (Troxler *et al.*, 2012). Moreover, our results are strongly similar to those studying the reduction of the take-all disease by the *Pseudomonas fluorescens* strain Pf29A (Chapon *et al.*, 2002). Earthworm reduction of several soil borne disease seem to be microbially-mediated (Clapperton *et al.*,

2001; Elmer, 2009). Our results did not allow us to conclude on the mechanism involved on take-all suppression by earthworm but biochemical modifications through the activation of antifungal producing PGPR seemed to be the more likely hypothesis.

Discussion générale

1. L'interaction des plantes avec les organismes du sol : un réseau signalétique complexe

Les plantes, comme tout organisme vivant, se développent et évoluent en interaction avec les organismes présents dans leur milieu. Par exemple, les êtres humains maintiennent une association symbiotique avec leur microflore intestinale indispensable à leur nutrition, à leur développement et à leur système immunitaire. Bien avant les animaux, les plantes se sont associées avec d'autres plantes, mais aussi avec les microorganismes du sol (Figure 13) afin de réaliser des processus similaires. Ces associations sont facilitées à travers l'échange de molécules signal dans la rhizosphère entre la plante et les organismes du sol.

1.1 Les molécules signal dans la communication entre bactéries de la rhizosphère

Au niveau des bactéries du sol, la coordination de l'activité entre plusieurs bactéries est un mécanisme largement répandu. Ce mécanisme repose sur une communication de cellule à cellule, appelé « quorum sensing (QS) » ou détection du quorum en français. Ce mécanisme est réalisé à travers la diffusion de signaux chimiques. Même si les signaux et les mécanismes impliqués dans le quorum sensing varient, les plus répandus sont les N-acyl homoserine lactones (AHLs) (Badri *et al.*, 2009). Cette détection du quorum va coordonner l'expression de certains gènes bactériens lorsque la population aura atteint une densité suffisante. Les molécules signal (AHLs) impliquées sont produites à une concentration constante par chaque bactérie. En conséquence, la concentration de ces molécules dans le milieu extérieur va augmenter au fur et à mesure que la densité de la population bactérienne augmente. Une fois la concentration seuil atteinte, certains régulateurs vont être activés, induisant l'expression de gènes spécifiques (Williams, 2007). L'activation simultanée de ces gènes chez toutes les bactéries d'une colonie va permettre la coordination de leurs comportements afin de s'adapter à leur environnement. Ceci va notamment faciliter l'acquisition de nutriments ou d'une niche, augmenter la virulence de certaines espèces pathogènes, permettre la fuite de la colonie ou encore permettre la formation de biofilms (Williams, 2007; Badri *et al.*, 2009). Au niveau de l'association entre les plantes et les microorganismes du sol, ce mécanisme de détection du quorum va permettre l'association de la plante avec des organismes symbiotiques (Badri *et al.*, 2009) ou pathogènes (von Bodman *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008).

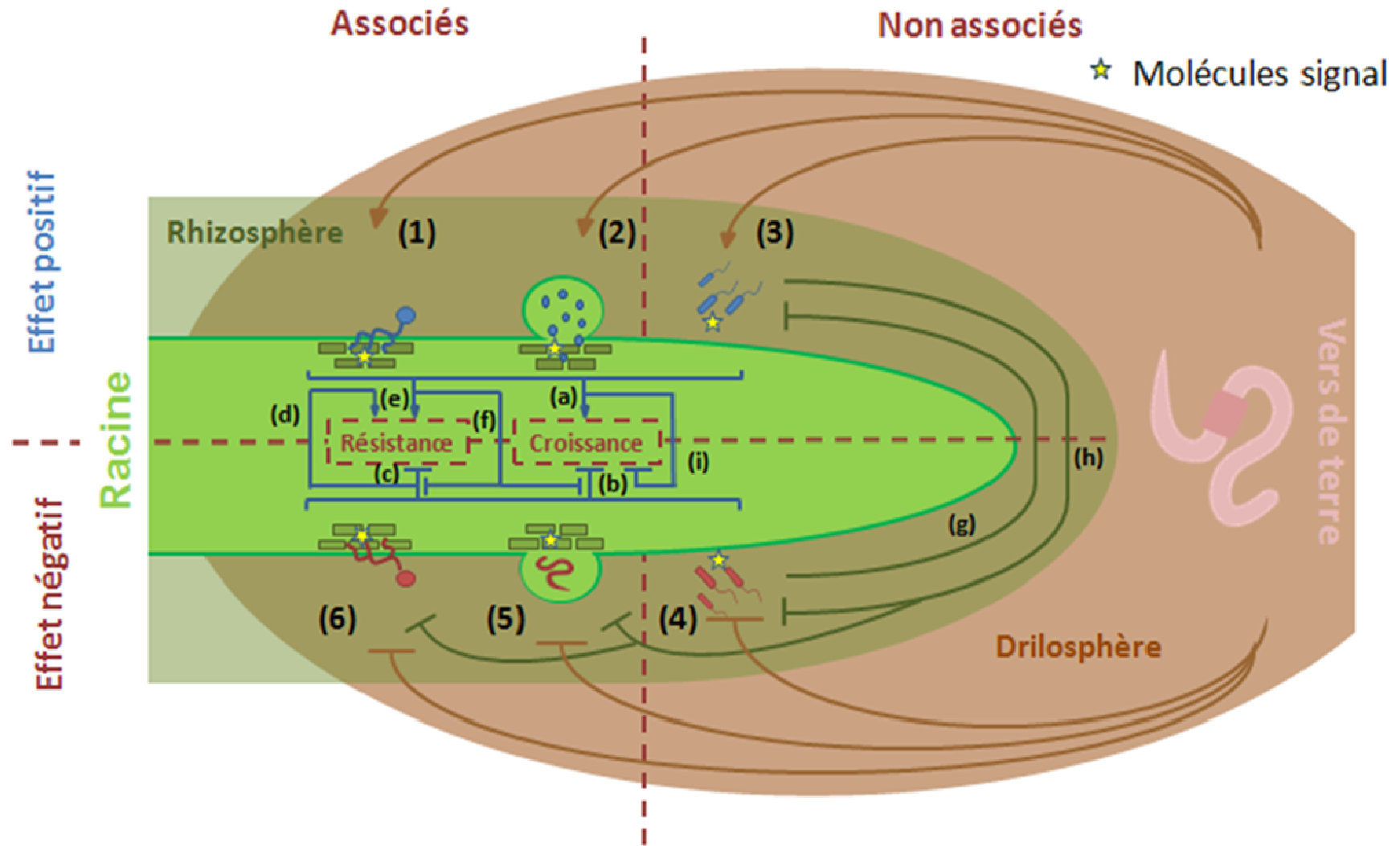


Figure 13 : Modèle représentant les modes d'action des vers de terre sur les interactions entre la plante et les organismes de la rhizosphère. Ces interactions vont résulter en des effets négatifs ou positifs selon le type d'organisme. L'effet des vers de terre sur ces interactions va être synergique ou antagoniste à leur effet sur la plante, avec en général une issue positive.

Les organismes bénéfiques sont (1) les mycorrhizes, (2) les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique, (3) les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR). Les organismes délétères sont : (4) les bactéries de la rhizosphère délétère de la croissance des plantes (DRB), (5) les nématodes et (6) les champignons. Ces organismes vont agir au niveau de la résistance et croissance des plantes au travers de l'émission de molécules signal (hormones végétales ou molécules PAMP qui sont des éliciteurs des mécanismes de résistance des plantes). Ces composés vont (a) stimuler ou (b) inhiber la croissance végétale par des modifications de l'homéostasie hormonale de la plante. La perception par la plante d'un organisme pathogène au travers de la reconnaissance de molécules PAMP va conduire à la mise en place de mécanismes de défense. Cependant, certains organismes pathogènes sont (c) capables de manipuler les mécanismes de reconnaissance et de défense de la plante. En cas de réponse efficace de la plante, l'infection qui a ainsi échoué va conduire à (d) une résistance systémique acquise (SAR) conférant une meilleure résistance de la plante lors de futures attaques. Certains organismes bénéfiques sont capables d'induire des mécanismes de défense chez la plante. La perception de ces organismes à travers la reconnaissance de molécules PAMP va conduire à (e) l'induction d'une résistance systémique (ISR). Cette ISR, va permettre à la plante de (f) mieux résister lors de l'attaque de certains pathogènes, inhibant ainsi les effets négatifs de ces derniers sur la croissance et les mécanismes de résistance. Ces organismes bénéfiques peuvent également avoir (h) un effet de contrôle biologique sur les organismes (4), (5) et (6) à travers la synthèse dans la rhizosphère de molécules ayant une action antibiotique ou encore via une compétition pour les nutriments. Dans la sphère des organismes n'établissant pas de contact physique avec la plante, les (3) PGPR peuvent avoir des effets positifs via l'émission de molécules diffusant par voie aqueuse ou gazeuses, telles que des hormones végétales ou des composés organiques volatiles (COV). D'autres organismes ayant un effet délétères à distance sont appelés (4) DRB et agissent par des mécanismes proches des PGPR, mais avec des molécules produites à des concentrations différentes, généralement plus élevées que chez les PGPR (eg. Acide Indole Acétique). Les PGPR et les DRB peuvent exercer (g et h) des effets inhibiteurs réciproques. De plus, selon l'espèce de la plante et de la taille de la population de PGPR, ces dernières peuvent avoir (i) une action de DRB.

Les vers de terre au travers de leur domaine d'influence (drilosphère) vont avoir un impact positif (flèche) ou négatif (flèche arrêtée) sur l'activité et la densité de ces organismes bénéfiques ou délétères. La stimulation par les vers de terre des organismes bénéfiques va résulter en une action amplifiée de ces derniers sur la croissance et la résistance des plantes par les mécanismes (a) et (e). L'effet des vers de terre des organismes délétères va réduire l'effet négatif de ces derniers sur la croissance et la résistance des plantes par les mécanismes (b), (c) et (g). Cependant, les vers de terre peuvent sur-activer les communautés de PGPR, produisant un effet délétère sur la croissance des plantes du fait d'une (i) production de molécules signal trop importante (e.g. forte concentration d'acide indole acétique). Enfin, les vers de terre en stimulant certaines populations de PGPR vont favoriser (h) un effet de contrôle biologique direct des agents pathogènes. Les vers de terre favoriseront ainsi un effet antagoniste des PGPR sur les organismes délétères sans changer la physiologie de la plante.

1.2 Les molécules signal dans la communication entre bactéries et plantes

Les plantes sont également capables d'interagir avec les microorganismes du sol, notamment à travers des molécules signal présentes dans leurs exsudats. Cette interaction peut être réalisée par l'émission de molécules mimant l'effet des AHLs (Teplitski *et al.*, 2000; Bais

et al., 2006; Badri *et al.*, 2009) mais aussi au travers d'un large spectre d'autres molécules qui sont souvent spécifiques à une catégorie d'organisme. Ces exsudats maintiennent et favorisent une haute diversité en microorganismes dans la rhizosphère. Cette diversité est spécifique à chaque espèce de plante, suggérant une évolution commune entre la plante et les microorganismes du sol (Badri & Vivanco, 2009). En réponse à l'exsudation de ces composés par la plante, les organismes du sol qui colonisent la rhizosphère sont capables eux aussi de synthétiser des molécules signal. Ces molécules vont participer à l'interaction qu'ils entretiennent avec les plantes. L'interaction entre la plante et les organismes du sol va résulter en des effets négatifs ou positifs sur la croissance et développement de la plante (Figure 13).

Parmi les interactions positives, on peut distinguer des relations symbiotiques où l'organisme est physiquement associé à la plante de celles où il n'y a pas de contact physique (Figure 13). La sécrétion de ces molécules signal par la plante va, par exemple, servir de signal dans l'initiation des symbioses avec des organismes tels que les (1) mycorhizes ou encore (2) des bactéries fixatrices d'azote (Figure 13.1 et 13.2). Au niveau du large spectre de molécules exsudées, les flavonoïdes jouent le rôle de molécules signal dans l'initiation de l'interaction avec les mycorhizes mais également les bactéries fixatrices d'azote (Badri *et al.*, 2009). Cependant, une interaction positive peut être également observée avec des organismes non symbiotiques, où l'organisme n'est pas physiquement lié à la plante mais interagit et communique avec cette dernière à distance, via de nombreuses molécules. Les bactéries agissant de cette façon (Figure 13.3) sont regroupés sous la dénomination PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Podile & Kishore, 2006; Hayat *et al.*, 2010). Les plantes sont capables d'attirer ces organismes par chimiotaxie, à travers l'exsudation de sucres, d'acides aminés, et d'acides aliphatiques tel que l'acide malique impliqué dans l'attraction avec *Bacillus subtilis* (Badri *et al.*, 2009).

Une distinction similaire peut être faite pour les interactions négatives, où l'on retrouve des organismes physiquement associés à la plante, comme des champignons nécrotrophes ou biotrophes (Figure 13.6), des nématodes (Figure 13.5) et des organismes non associés physiquement à la plante (Figure 13.4), communément regroupés sous l'appellation DRB (Deleterious RhizoBacteria) (Bais *et al.*, 2006; Kremer, 2006). Ces DRB sont des bactéries qui colonisent la surface du système racinaire des plantes, mais pas les tissus vasculaires des plantes comme le font les pathogènes (Nehl *et al.*, 1996; Kremer, 2006). L'absence de l'induction de symptômes caractéristiques d'une maladie et leur mode d'action

au travers de la rhizosphère est responsable du fait que ces bactéries aient longtemps été ignorées ou considérées comme des pathogènes mineurs (Kremer, 2006). Cependant, des études récentes montrent que ces bactéries seraient une composante non négligeable de la communauté totale de la rhizosphère (Kremer, 2006). D'une manière similaire aux interactions positives, ces interactions négatives sont également réalisées autour de molécules exsudées par la plante ou secrétées par l'organisme délétère. Les flavonoïdes sont connus pour être à l'origine de l'initiation de l'association avec certains champignons pathogènes. De leur côté, les nématodes sont capables de sécréter des cytokinines qui vont être impliquées dans l'initiation de leur interaction avec le système racinaire des plantes (Badri *et al.*, 2009). Etant donné le nombre et la diversité des organismes du sol et la diversité de composés biochimiques que chacun peut émettre dans la rhizosphère, ces signaux vont former un réseau biochimique extrêmement complexe.

1.3 L'impact des vers de terre sur ces échanges de signaux

Dans les sols, d'autres organismes sont capables d'interagir avec les communautés de microorganismes. Parmi ces organismes, les vers de terre sont d'importants déterminants des processus biologiques. Dans la drilosphère, définie comme le volume de sol qui sous l'influence fonctionnelle des vers de terre (Lavelle, 2002), les communautés microbiennes et tous les processus qui leur sont associés vont être modifiés. Lorsqu'une racine s'allonge dans le sol et rentre en contact avec des turricules ou galeries de vers, la superposition de la drilosphère et de la rhizosphère va induire des changements au niveau de la communauté microbienne, et donc sur le réseau signalétique de la rhizosphère (Figure 13). Cette implication des vers de terre dans le réseau signalétique a été démontrée par la présence de certains composés proches des hormones végétales dans les substances humiques dérivées de l'activité des vers de terre (Nardi *et al.*, 1988; Tomati *et al.*, 1988; Canellas *et al.*, 2002; Nardi *et al.*, 2002; Canellas *et al.*, 2011). Ce changement dans la composition chimique de la rhizosphère de la plante va alors avoir des effets sur la croissance et la physiologie de la plante. Les effets des vers de terre sur la physiologie des plantes ont déjà été démontrés par l'étude de gènes impliqués dans la division et différenciation cellulaire, (Jana *et al.*, 2010), codant pour une H⁺ ATPase membranaire (Canellas *et al.*, 2002), sur des gènes codant pour des protéines impliqués dans la réponse au stress et sur un précurseur de l'acide jasmonique, hormone impliquée dans les mécanismes de défense des plantes (Blouin *et al.*, 2005). Plus récemment, l'impact des substances humiques dérivées de l'activité des vers de terre

(Trevisan *et al.*, 2011) ou l'impact direct des vers de terre (Puga-Freitas *et al.*, accepted) sur le transcriptome d'*Arabidopsis thaliana* a été étudié. Ces études transcriptomiques montrent un rôle important des molécules signal dans la réponse de la plante. Ces résultats nous permettent de mieux comprendre le mécanisme via lequel les vers de terre agissent sur la croissance, la morphogénèse et la résistance des plantes face aux pathogènes et parasites.

2. Les molécules signal dans le développement des plantes

2.1 L'importance des hormones végétales dans l'effet des vers de terre

L'action des vers de terre sur la croissance des plantes via des molécules signal a été suggérée par la découverte de substances humiques bioactives dérivées de l'activité des vers de terre (Tomati *et al.*, 1988; Muscolo *et al.*, 1998; Nardi *et al.*, 2000; Canellas *et al.*, 2002; Nardi *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004; Canellas *et al.*, 2011). Ces extraits ont un impact significatif au niveau de la croissance des plantes et semblent agir via un mécanisme proche de celui de certaines hormones végétales. Notre étude (Puga-Freitas *et al.*, accepted) vient appuyer ces observations. L'effet significatif d'un turricule de ver de terre sur la croissance de deux espèces de plantes, alors que les nutriments sont en quantité optimale pour la croissance de ces plantes, confirme bien la présence de petites molécules émises dans les structures produites en présence de vers de terre (Chapitre 1). Nos études montrent pour la première fois que ces molécules sont actives, disponibles et produites en quantités suffisantes dans un turricule pour agir sur la croissance des plantes via un mécanisme proche de celui des hormones végétales.

L'implication de composés proches des hormones végétales dans l'interaction entre les plantes et des organismes du sol est un mécanisme bien connu, notamment au niveau de l'interaction entre la plante et certaines PGPR (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Podile & Kishore, 2006; Hayat *et al.*, 2010). L'impact des vers de terre sur les communautés de microorganismes du sol a déjà été bien étudié (Lavelle *et al.*, 2004). Cependant leur impact spécifique sur ces communautés de PGPR reste à ce jour quasiment inexploré. De rares éléments de littérature confirment toutefois une activation des PGPR en présence de vers. Certaines études (Elmer, 2009; Pižl *et al.*, 2012) montrent un effet positif des vers de terre sur la densité globale des bactéries *Pseudomonas fluorescens*, reconnues comme modèle parmi

les PGPR. L'effet des vers de terre sur la stabilité d'inoculum de *P. fluorescens* a également été démontré au champ (Troxler *et al.*, 2012). De plus, une de nos expériences (Chapitre 2) montre qu'en présence de vers de terre, la production d'auxine par les bactéries cultivables est plus élevée. Ces composés auxiniques vont pénétrer dans les cellules du système racinaire et modifier la concentration cellulaire interne de l'auxine (Martens & Frankenberger, 1994). A l'intérieur des cellules végétales, la concentration hormonale est finement régulée et dépendante de l'organe, du stade de développement et des stress environnementaux (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Peleg & Blumwald, 2011; Durbak *et al.*, 2012). Ces hormones agissent d'une manière synergique ou antagoniste sur les voies de signalisation sous contrôle d'autres hormones (Depuydt & Hardtke, 2011; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Muday *et al.*, 2012). Il résulte ainsi de la modification de la production d'hormones par les PGPR une modification des concentrations hormonales des cellules végétales.

2.2 La balance hormonale : un mécanisme fin de régulation de la croissance des plantes

2.2.1 L'auxine et les cytokinines

Au niveau de la croissance, l'auxine et les cytokinines sont deux hormones végétales majeures. Ces deux hormones sont connues pour jouer un rôle important au niveau du méristème apical aérien, racinaire et axillaire. L'auxine est une hormone essentielle à l'élongation cellulaire, du moins à faible dose (Taiz & Zeiger, 2010). Cependant, à des doses plus élevées, l'auxine a un rôle antagoniste à celui des cytokinines au niveau des racines, des feuilles mais aussi au niveau des bourgeons axillaires. Ces deux hormones ont un rôle synergique au niveau du méristème apical aérien (Durbak *et al.*, 2012). Au niveau du méristème apical racinaire, leur interaction va avoir un effet régulateur sur le transport et la signalisation de l'auxine. En présence d'auxine dans les racines, le répresseur *SHY2/IAA3* réprimant les protéines ARF (Auxin Responsive Factor) va être dégradé. Les protéines ARF vont alors activer les transporteurs PIN, impliqués dans le transport de l'auxine, conduisant à l'accumulation d'auxine dans l'extrémité de la racine (Ioio *et al.*, 2008). Cette accumulation d'auxine va avoir pour conséquence d'inhiber le processus d'élongation. A l'inverse, une concentration élevée en cytokinine dans les racines va induire l'expression des gènes *ARR1* et *ARR12*, qui vont activer le répresseur *SHY2*. Ceci va limiter l'accumulation d'auxine dans le méristème apical des racines et permettre l'élongation racinaire (Durbak *et al.*, 2012).

En présence de vers de terre (Chapitre 1 et 4), rien ne semble indiquer qu'une production de cytokinine soit impliquée dans la réponse des plantes. Cependant, l'implication des cytokinines dans l'action des PGPR a déjà été démontrée (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Hayat *et al.*, 2010; Wilkinson *et al.*, 2012) même si elle a fait l'objet de moins d'études que l'éthylène ou l'auxine. Ainsi, la bactérie *Bacillus subtilis* est capable de synthétiser différents composés de la famille des cytokinines tel que la zéatine riboside. Quinze jours après inoculation de plants de laitue (*Lactuca sativa* L.) avec cette bactérie, une augmentation dans la concentration en auxine dans les racines est observée. Parallèlement, une augmentation dans la concentration en acide abscissique et cytokinine au niveau des feuilles est également observée comparativement à des plantes non inoculées. Ces changements au niveau de la concentration interne de hormones sont accompagnés par des effets positifs au niveau de la croissance racinaire et aérienne (Arkhipova *et al.*, 2005).

Dans une étude récente, les effets de l'amibe bactérivore *Acanthamoeba castellanii* sur la croissance de deux lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* ont été étudiés. L'étude de l'activité d'un gène rapporteur pour l'auxine (*DR5*:GUS) et pour les cytokinines (*ARR5*:GUS) a montré que ces protozoaires modulaient la morphogène d'*A. thaliana* via des changements du rapport de concentration de ces deux hormones (Krome *et al.*, 2010). Sur des plantes âgées de six semaines, les auteurs ont observé, en présence du protozoaire, une légère diminution de l'intensité de la coloration GUS chez le mutant *DR5*:GUS et une forte augmentation chez le mutant *ARR5*:GUS démontrant un équilibre entre auxine et cytokinine différent. Ces changements au niveau de la concentration de ces deux hormones seraient fortement liés à la prédation sélective exercée sur les communautés bactériennes du sol par l'amibe *A. castellanii*. Cette prédation sélective des bactéries du sol par des protozoaires, qui favorise les bactéries productrices de molécules signal a été observée à plusieurs reprises (Bonkowski & Brandt, 2002), et pourrait être une hypothèse alternative à la boucle microbienne, qui explique l'effet positif des protozoaires sur les plantes par un recyclage plus rapide des nutriments (Bonkowski, 2004). Ces résultats montrent l'importance que peut avoir un changement au niveau de la structure de la communauté bactérienne sur la plante. On peut penser que les changements provoqués par les vers de terre au niveau des communautés de bactéries peuvent avoir des effets similaires sur la croissance des plantes.

2.2.2 L'auxine et l'éthylène

L'auxine est également connue pour interagir avec d'autres hormones au niveau des processus de croissance des plantes. Dans son interaction avec l'éthylène, l'auxine influence de nombreux processus de morphogénèse au niveau du système racinaire (Muday *et al.*, 2012). Ces deux hormones agissent de manière synergique au niveau de l'élongation et de l'émission de poils absorbants et de manière antagoniste au niveau de la formation de racines latérales et de l'élongation de l'hypocotyle (Muday *et al.*, 2012). Dans notre étude (Chapitre 1), nous avons observé que les vers de terre semblent agir via la voie de signalisation des auxines. En effet, le ver de terre *A. caliginosa*, a un effet positif sur la croissance du double mutant d'*A. thaliana aux1-7;axr4-2* et un effet négatif sur la croissance d'*A. thaliana col-0*. L'auxine étant produite majoritairement dans le méristème apical, le double mutant va être fortement perturbé dans le transport de l'auxine. Ceci va affecter la croissance de la plante, provoquant le nanisme de la plante. Ce double mutant est connu pour avoir un phénotype normal lors d'un apport exogène d'auxine (Hobbie & Estelle, 1995). L'auxine sous sa forme d'IAA est majoritairement transportée de cellule à cellule, cependant, d'autres molécules de la famille des auxines peuvent être transportées de manière passive (Delbarre *et al.*, 1996), par des voies indépendantes d'AUX1. L'effet du vers de terre produit le même effet qu'un apport exogène d'auxine. La réponse transcriptomique d'*A. thaliana* à la présence d'organismes du sol semble suggérer que la voie de signalisation sous contrôle de l'auxine est bien impliquée, aussi bien en présence de vers de terre (Chapitre 1) que de collemboles (Endlweber *et al.*, 2011). Cependant, l'implication d'autres molécules signal interagissant avec l'auxine et impliquées dans les mêmes processus de croissance ne peut être exclue.

L'éthylène pourrait également être responsable des effets observés car cette hormone interagit avec la voie de signalisation de l'auxine. Cette hypothèse est cohérente avec d'autres études qui montrent que les gènes *AUX1* et *AXR4* sont connus pour répondre à d'autres hormones telles que l'éthylène (Rahman *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2011) ou bien des composés organiques volatiles (López-Bucio *et al.*, 2007).

2.3. La balance hormonale : une petite perturbation pour de grandes conséquences

L'implication d'une régulation de la balance entre les hormones à l'intérieur de la plante permet d'expliquer les effets contrastés des déjections de vers de terre sur la croissance

de plantes. Dans notre étude (Chapitre 1), nous avons observé un effet négatif des vers de terre sur *O. sativa* alors qu'il est positif sur *L. perenne* dans le même dispositif. De même, cette hypothèse permet de comprendre l'effet négatif sur le cultivar *columbia* alors qu'il est positif sur le double mutant *aux1-7 ; axr4-2* (Chapitre 1). La signalisation des hormones est connue pour être soumise à une fine régulation dépendante de leur concentration tout autant que de leur nature, de leur interaction avec les autres hormones et de l'espèce végétale. De son côté, la plante a mis en place des mécanismes pour se prémunir de ces effets négatifs causés par un apport exogène d'auxine. Ces mécanismes sont bien connus en ce qui concerne l'interaction entre les plantes et les PGPR. La production d'auxine par certaines PGPR conduit à l'émission d'1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) par la plante au travers d'exsudats. Cet ACC se retrouve dans la rhizosphère et va alors réprimer l'élongation racinaire comme le ferait un apport exogène d'éthylène (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Cependant, certaines bactéries se sont à leur tour adaptées à ce mécanisme de défense de la plante. Certaines PGPR possèdent un gène codant pour l'ACC désaminase qui va hydrolyser l'ACC en ammonium et α -ketobutyrate. L'hydrolyse de cet ACC par ces bactéries va conduire à un déséquilibre entre la concentration interne et externe de ce composé. Ceci va conduire à une augmentation de l'émission de ce composé par la plante afin de maintenir l'équilibre. La plante va alors présenter une augmentation de l'élongation racinaire compte tenu de la diminution de la concentration interne en éthylène (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Au niveau de notre étude (Chapitre 1), l'implication de l'éthylène ne peut être écartée. Les mutants *aux1-7* et *axr4-2* sont connus pour être insensibles à l'éthylène. L'induction de gènes sous contrôle de l'auxine par un apport exogène d'ACC est perdue chez le mutant *aux1-7* (Stepanova *et al.*, 2007) et chez le mutant *axr4-2* (Lewis *et al.*, 2011). Dans l'hypothèse où cet ACC ne serait pas dégradé par les bactéries présentes dans le milieu, on devrait donc observer un effet inhibiteur sur la croissance du cultivar sauvage d'*A. thaliana*, alors que le double mutant insensible n'aurait pas sa croissance inhibée.

En plus des effets « dose dépendant » et « organe dépendant » de certaines hormones, il existe également un effet génotype. Cet effet « génotype dépendant » est illustré par certaines études portant sur les bactéries délétères de la croissance des plantes (DRB). Une spécificité entre la souche DRB et la plante hôte semble être un facteur important dans l'issue positive ou négative de l'interaction, sur la croissance de la plante. A partir de l'isolation de bactéries de la rhizosphère d'une culture de carottes (*Daucus carota*), un effet négatif sur la

croissance des plants de carotte a été observé avec 7% des bactéries isolées alors que 29% des bactéries isolées inhibent la croissance de la pomme de terre (Surette *et al.*, 2003).

Les PGPR sont considérées comme étant antagonistes aux DRB. Leur coexistence et leurs adaptations réciproques ont abouties à des modes de coexistence spécifiques. Par exemple, l'association commensale entre une souche DRB de *Pseudomonas* et une souche PGPR de *Bacillus* (Probanza *et al.*, 1996) témoigne de la coévolution entre DRB et PGPR. La classification d'une souche bactérienne au sein des PGPR ou des DRB est basée sur des « bioassays », c'est-à-dire des tests sur du matériel vivant, comme une plante spécifique. Puisque l'effet des DRB et des PGPR est propre à chaque génotype de plante, certaines bactéries de la rhizosphère sélectionnées comme PGPR sur une espèce végétale donnée se sont révélées avoir des effets délétères sur la croissance d'autres espèces (Nehl *et al.*, 1996; Kremer, 2006). Cet effet se retrouve également dans une de notre étude (Chapitre 3). Une bactérie isolée dans la rhizosphère de plants de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) à partir de sa capacité à produire de l'auxine s'est révélée avoir un effet inhibiteur sur la croissance d'*A. thaliana*. Cet effet délétère est d'autant plus important que la taille de la population inoculée était grande, comme déjà observé pour d'autres PGPR et DRB (Persello-Cartieaux *et al.*, 2001). Un effet antagoniste de ces DRB sur les PGPR semble également suggéré par notre étude. L'effet positif du vers de terre sur la croissance d'*A. thaliana* s'estompe d'autant plus que la taille de l'inoculum est grande. La réduction de l'effet des vers de terre par ces DRB serait donc due à un effet antagoniste de ces DRB sur les populations de PGPR stimulées par les vers de terre.

3. Impact des vers de terre sur les mécanismes de résistance des plantes : implication des molécules signal

3.1. Les mécanismes de défense basale chez les plantes

La plante se développe dans un environnement complexe dans lequel elle est amenée à interagir avec divers agents pathogènes qui ont des modes de vie et des stratégies d'infection différents (Pieterse *et al.*, 2009). Le premier obstacle rencontré par les pathogènes lors de l'attaque de la plante est la barrière physique (la paroi), enzymatique et chimique dressée par la plante. Le champignon pathogène responsable du piétin échaudage, *Gaeumannomyces*

graminis, est capable de synthétiser un large spectre d'enzymes impliquées dans la dégradation de ces parois (Freeman & Ward, 2004). Cependant, même si le pathogène possède toutes les enzymes nécessaires, la plante est capable de synthétiser et d'émettre au travers d'exsudats de nombreuses enzymes et composés chimiques pouvant empêcher l'infection par le pathogène. Par exemple, les racines d'avoine synthétisent une saponine, l'avenacine, qui est un métabolite secondaire ayant un effet antimicrobien efficace face à de nombreux champignons. Les pathogènes ont développé des réponses pour déjouer l'inhibition de l'infection par ces molécules exsudées : *G. graminis* var *avena* possède une avenacinase qui permet la dégradation de cette molécule alors que *G. graminis* var *tritici* ne la possède pas. Ainsi, les composés exsudés et les enzymes impliquées dans leur dégradation permettent d'expliquer que *G. graminis* var *tritici* ne peut pas infecter les racines de plant d'avoine alors que *G. graminis* var *avena* en est capable (Freeman & Ward, 2004).

3.2. Les molécules signal dans la reconnaissance de *Gaeumannomyces graminis*

En cas de réussite de l'agent pathogène à traverser la paroi ou d'échapper à des molécules exsudées, la plante va alors mettre en place d'autres mécanismes de défense. Les plantes et les organismes pathogènes ayant co-évolué conjointement, des mécanismes de reconnaissance et d'évitement ce sont mis en place du fait de la sélection naturelle. Cette évolution conjointe est décrite comme une « course à l'armement » dans laquelle le pathogène développe des armes qui déjouent les défenses de la plante, tandis que la plante développe un nouveau système de défense contre les nouvelles armes du pathogène (Pieterse *et al.*, 2009; Kombrink *et al.*, 2011). Les armes du pathogène peuvent être reconnues par la plante qui interprète la présence de certaines molécules produites par le pathogène comme des indicateur de sa présence ; ces molécules, appelées molécules élicitrices, deviennent par sélection naturelle des molécules déclenchant les mécanismes de défense des plantes. Ce mécanisme de reconnaissance des molécules élicitrices est un mécanisme connu et répandu dans le règne animal et végétal. Il a déjà été bien étudié pour des mammifères (souris), insectes (*Drosophila*) et plantes monocotylédones (riz) et dicotylédones (*Arabidopsis thaliana*) (Gómez-Gómez & Boller, 2002; Ronald & Beutler, 2010). Une de nos expériences met en évidence ce type de mécanisme de reconnaissance (Chapitre 4) : en présence du champignon responsable du piétin échaudage, la plante est capable de reconnaître certaines molécules effectrices comme en témoigne le profil d'accumulation des transcrits des gènes *CPK7* et *RBOH-F* (Figure 14). L'initiation des mécanismes de défense de la plante se fait au travers de la reconnaissance

d'éliciteurs (PAMP), comme la chitine, qui sont des composants de la paroi des champignons. La structure de la chitine a été conservée au cours de l'évolution, et cette molécule n'est pas produite par les plantes. Ces éliciteurs vont se lier à une protéine réceptrice membranaire capable de reconnaître le motif spécifique de l'éliciteur (pattern-recognition receptors). Cette reconnaissance va conduire à l'activation de mécanismes de défense basale tels que la réponse d'hypersensibilité.

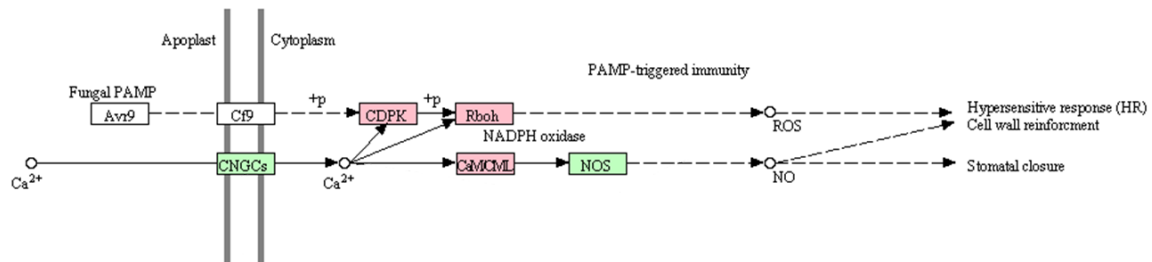


Figure 14 : Voie de signalisation impliquée dans la reconnaissance du champignon *Gaeumannomyces graminis var tritici* (Ggt) par *Triticum aestivum*. La transduction du signal implique les ions calcium Ca^{2+} comme messagers secondaires. La reconnaissance par des récepteurs membranaires d'éliciteurs (Fungal PAMP) produits par Ggt va conduire à l'activation d'une nucléotidyl cyclase (situé sur la membrane plasmique ou dans le cytosol), qui va avoir pour conséquence de provoquer une augmentation dans la concentration en nucléotides cycliques. L'augmentation de la concentration en ces nucléotides cycliques va activer la protéine membranaire CNGC (cyclic nucleotide ion channel) qui provoque une élévation de la concentration en Ca^{2+} dans le cytosol. Ces ions calcium vont alors venir se fixer sur la protéine calmoduline (CaM/CML). Ce complexe formé entre la calmoduline et les ions calcium ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) va réguler la synthèse d'oxydes nitriques (NO_x) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sont essentiels pour le développement de la réponse hypersensible (HR). Les ions Ca^{2+} vont également se fixer sur des protéines de type kinases (CDPK) qui peuvent activer la production d' H_2O_2 à travers la régulation de l'activité de protéines NADPH oxidase Rboh (Respiratory burst oxidase homomlog). Adapté de Ma (2011) et de l'analyse par KEGG pathway mapping tool (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Les rectangles correspondent à une protéine ou une famille de protéines impliqués dans la voie de signalisation. Les rectangles verts correspondent à des protéines pour lesquelles nous n'observons pas de modification de l'expression pour les gènes associés. Les rectangles roses correspondent à des protéines pour lesquelles nous observons une accumulation des transcrits en présence de *G. graminis* (Chapitre 4) pour au moins un des gènes associés.

La reconnaissance de ces éliciteurs est une réponse efficace car elle est généralement suivie d'une réponse hypersensible au niveau du site d'infection (Pieterse *et al.*, 2009; Kombrink *et al.*, 2011). Au travers d'un pic oxydatif apoplastique (oxidative burst), cette réaction conduit à la mort cellulaire programmée des cellules périphérique à la zone infectée. L'agent pathogène se trouve alors confiné et l'infection ne peut pas progresser. D'autres mécanismes peuvent également être mis en place et incluent une réponse rapide reposant sur une fortification de la paroi des cellules en périphérie de la zone d'infection par la synthèse de callose et de lignine. D'autres mécanismes de résistance vont également être mis en place, à

travers la production de métabolites secondaires ayant une activité antimicrobienne tel que les phytoalexines ; une accumulation de protéines liées à la pathogénie (Pathogenesis Related proteins ; PR protein) telles que des chitinases et des glucanases pouvant dégrader les parois des champignons et des oomycètes.

La maladie du piétin échaudage est responsable de profondes modifications physiologiques comme en atteste le profil d'accumulation des transcrits dans les stades précoces (Guilleroux & Osbourn, 2004) et avancés (Partie 4) de l'infection. Nous avons observé une augmentation de l'accumulation des transcrits pour près de 800 gènes et une diminution pour près de 700 gènes. Ces gènes pour lesquels il semble y avoir une régulation différente sont impliqués dans des processus biologiques tel que les processus d'oxydation, la protéolyse, la biosynthèse et la signalisation hormonale et en particulier dans l'initiation d'une réponse hypersensible (Figure 14). On notera en particulier l'accumulation de transcrits du gène *CPK7*, qui code pour un membre de la famille des protéines kinases calcium dépendantes (CDPK), du gène *RBOHF* (Respiratory burst oxidase homomlog), qui code pour une NADPH oxydase transmembranaire impliquée dans la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) via la génération de radicaux superoxydes dans les cellules végétales en réponse à des pathogènes (Asai *et al.*, 2008; Wi *et al.*, 2012). Ce gène est indispensable à divers mécanismes de résistance (Chaouch *et al.*, 2012). L'activation de cette cascade signalétique conduit à une réponse hypersensible au niveau du site d'infection. Cependant, cette réponse hypersensible n'a pas que des avantages. Elle peut influencer voir faciliter l'infection de pathogènes nécrotrophes tel que *Botrytis cinerea* (Govrin & Levine, 2000; Govrin *et al.*, 2006). Ce pathogène va être capable de résister au stress oxydatif résultant de la réponse hypersensible (Temme & Tudzynski, 2009). Cette réponse hypersensible va conduire peu à peu à la mort cellulaire de tous les tissus végétaux infectés, qui serviront de ressources à *B. cinerea* et permettront à la maladie de se propager. De plus, le fait de retrouver une accumulation des transcrits, pour des gènes impliqués dans la cascade signalétique de la réponse hypersensible, au niveau des feuilles témoigne qu'au lieu d'être adaptative et localisée au niveau du site d'infection, la réponse de la plante est systémique et donc probablement due à une manipulation de ce mécanisme de défense par le champignon.

Certains agents pathogènes sont en effet capables de contourner les mécanismes de défense des plantes ou encore de les manipuler. Cependant, au cours de la coévolution entre les plantes et leurs pathogènes et de la course à l'armement qui en a résulté, certains

pathogènes ont acquis des molécules signal effectrices. Ces molécules sont transportées dans les cellules de la plante hôte et vont supprimer la réponse initiale de la plante qui était dirigée par la perception d'éliciteurs (PAMP triggered immunity, PTI). Cette suppression promeut la virulence du pathogène par une réaction de sensibilité dirigée par des effecteurs (effector triggered susceptibility, ETS). En réponse, certaines plantes ont acquis des protéines dites de résistance (R protéines) qui sont capables de reconnaître ces molécules effectrices, résultant en une seconde réponse de défense appelée immunité dirigée par des effecteurs (effector triggered immunity, ETI). L'issue de la bataille entre la plante et l'agent pathogène va dépendre de la balance entre la capacité du pathogène à supprimer les mécanismes de défense de la plante et de la capacité de la plante à reconnaître le pathogène et activer un mécanisme de défense adéquat (Pieterse *et al.*, 2009; Kombrink *et al.*, 2011; Ma & Berkowitz, 2011).

A la suite de cette réponse précoce, mise en place dès le début de l'attaque, va se mettre en place (1) une cascade signalétique sous contrôle de plusieurs hormones résultant en (2) l'induction d'un mécanisme de résistance systémique, plus complexe et adapté au type de pathogène rencontré.

3.3. La balance hormonale dans les mécanismes de résistance des plantes

L'importance de la régulation hormonale en réponse à des stress biotiques (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011) ou abiotiques (Peleg & Blumwald, 2011; Wilkinson *et al.*, 2012) apparaît de plus en plus comme étant un mécanisme à la base de la résistance ou bien de la susceptibilité face à ces stress. En réponse au champignon pathogène *G. graminis* (Chapitre 4), nous avons observé une diminution de la quantité des transcrits pour deux gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'éthylène, le gène *ACO1* et *ACO4*. Ces deux gènes codent pour une 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACC oxidase), impliquée dans la conversion du 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) en éthylène (Taiz & Zeiger, 2010). Hormis la biosynthèse de certaines hormones, leur voie de signalisation est également modulée en présence de vers de terre. La régulation de la signalisation via le protéasome 26S est importante dans les mécanismes de défense (Dielen *et al.*, 2010; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Dans notre étude (Chapitre 4), une diminution de la quantité des transcrits est observée pour le gène *COII*. La protéine codée par ce gène est fondamentale dans la signalisation de l'acide jasmonique (Figure 15).

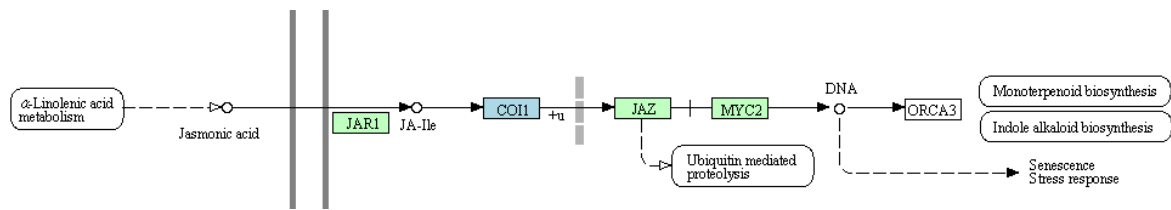


Figure 15 : Voie de signalisations via l'acide jasmonique modulée par la présence du champignon *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* (Ggt) chez *Triticum aestivum*. Cette analyse a été réalisée à partir de l'outil KEGG pathway mapping (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Une flèche (→) indique une activation. Dans le cas contraire (□) cette flèche indique un effet inhibiteur. Les rectangles correspondent à une protéine ou une famille de protéines impliqués dans la voie de signalisation. Les rectangles verts correspondent à des protéines pour lesquelles nous n'observons pas de modification de l'expression pour les gènes associés. Les rectangles bleus correspondent à des protéines pour lesquelles nous observons une diminution de la quantité des transcrits en présence de *G. graminis* (Chapitre 4) pour le gène *COI1* (Coronatine insensitive 1). Ce gène code pour une protéine à F-Box et joue un rôle clé dans la régulation de la signalisation au travers des jasmonates. En présence de jasmonates, le répresseur JAZ (Jasmonate ZIM domain) va se lier à la protéine COI1 et va être ainsi être ubiquitiné et dégradée au travers du protéasome 26S.

La mutation au niveau du gène *COI1* va déréguler la réponse de la plante face à certains pathogènes. Ainsi le mutant *coil* est plus résistant face à *Pseudomonas syringae* (Kloek *et al.*, 2001) ou encore *Fusarium oxysporum* (Thatcher *et al.*, 2009) mais a une plus grande sensibilité face à des champignons pathogènes tels que *Alternaria brassicicola* et *Botrytis cinerea* (Thomma *et al.*, 1998) ou encore *Sclerotinia sclerotiorum* (Stotz *et al.*, 2011).

Au niveau de la signalisation des gibbérellines (Figure 16), la diminution des transcrits pour le gène codant pour la protéine GID1, qui est impliquée dans la dégradation des protéines DELLA, suggère une stabilisation de ces protéines DELLA. Ces protéines DELLA sont impliquées dans la répression des gènes sous contrôle des gibbérellines. La stabilisation des protéines DELLA est un mécanisme impliqué dans la résistance à divers stress environnementaux et interconnecte de nombreuses voies signalétiques hormonales (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

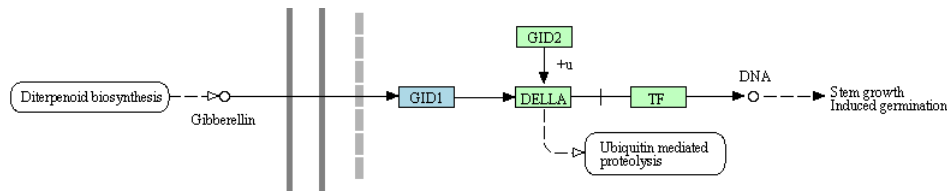


Figure 16 : Voie de signalisations des gibbérellines modulée par la présence du champignon *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* (Ggt) chez *Triticum aestivum*. Cette analyse a été réalisée à partir de l'outil KEGG pathway mapping (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Une flèche (→) indique une activation. Dans le cas contraire (□) cette flèche indique un effet inhibiteur. Les rectangles correspondent à une protéine ou une famille de protéines impliqués dans la voie de signalisation. Les rectangles verts correspondent à des protéines pour lesquelles nous n'observons pas de modification de l'expression pour les gènes associés. Les rectangles bleus correspondent à des protéines pour lesquelles nous observons une diminution de la quantité des transcrits en présence de *G. graminis* (Chapitre 4) pour le gène *GID1C*. Ce gène code pour une protéine GID1 (GA-insensitive dwarf 1). La signalisation au travers les gibbérellines est bloquée par une famille de protéines DELLA qui répriment l'expression de gènes sous contrôle des gibbérellines. En présence de gibbérellines, ces protéines DELLA vont venir se lier au récepteur GID1. Ces protéines DELLA vont être ubiquitinées puis vont être dégradées par le protéasome 26S.

D'autres hormones, autres que les gibbérellines, peuvent agir sur la dégradation des protéines DELLA. Ainsi, l'auxine ou l'éthylène, en interagissant avec la voie signalétique de l'auxine (Achard *et al.*, 2003; Fu & Harberd, 2003; Weiss & Ori, 2007), peuvent agir au niveau de la stabilité de ces protéines DELLA. La voie de signalisation des auxines (Figure 17) semble elle aussi fortement dérégulée comme le montre l'accumulation des transcrits codant pour la protéine SHY2. Cette protéine agit comme répresseur des gènes sous contrôle de l'auxine (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Durbak *et al.*, 2012).

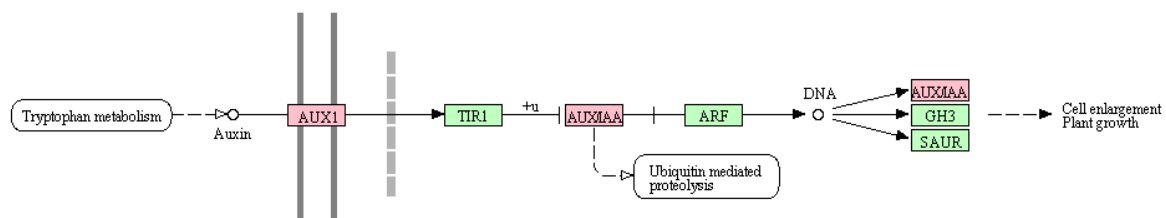


Figure 17 : Voie de signalisations de l'auxine modulée par la présence du champignon *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* (Ggt) chez *Triticum aestivum*. Cette analyse a été réalisée à partir de l'outil KEGG pathway mapping (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Une flèche (→) indique une activation. Dans le cas contraire (□) cette flèche indique un effet inhibiteur. Les rectangles correspondent à une protéine ou une famille de protéines impliqués dans la voie de signalisation. Les rectangles verts correspondent à des protéines pour lesquelles nous n'observons pas de modification de l'expression pour les gènes associés. Les rectangles roses correspondent à des protéines pour lesquelles nous observons une accumulation des transcrits en présence de *G. graminis* (Chapitre 4) pour le gène *AUX1* et *SHY2/IAA3*. La protéine AUX1, est un transporteur membranaire apical impliqué dans l'influx d'auxine dans les cellules. La protéine SHY2/IAA3 est impliquée dans la répression des gènes sous contrôle de l'auxine. En présence d'auxine, ces protéines SHY2/IAA3 vont se lier à la protéine réceptrice de type F-box TIR1, être ubiquitinées puis dégradées par le protéasome 26S, aboutissant à la levée de la répression qu'elles induisent.

Enfin, la signalisation via l'acide abscissique, hormone végétale connue pour être impliquée dans des processus de développement mais aussi de résistance à des stress abiotiques, est également fortement modulée (Figure 18).

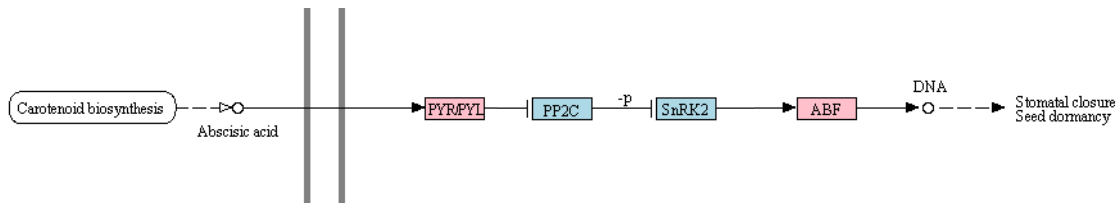


Figure 18 : Voie de signalisations de l'acide abscissique modulée par la présence du champignon *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* (Ggt) chez *Triticum aestivum*. Cette analyse a été réalisée à partir de l'outil KEGG pathway mapping (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Une flèche (→) indique une activation. Dans le cas contraire (⊘) cette flèche indique un effet inhibiteur. Les rectangles correspondent à une protéine ou une famille de protéines impliqués dans la voie de signalisation. Les rectangles verts correspondent à des protéines pour lesquelles nous n'observons pas de modification de l'expression pour les gènes associés. Les rectangles roses correspondent à des protéines pour lesquelles nous observons une accumulation des transcrits en présence de *G. graminis* (Chapitre 4) pour au moins un des gènes associés. Les rectangles bleus correspondent à des protéines pour lesquelles nous observons une diminution de la quantité des transcrits en présence de *G. graminis* (Chapitre 4) pour les gènes associés. On observe une accumulation des transcrits pour les gènes *PYL1* et *PYL4*. Ces deux gènes codent pour des protéines de la famille des RCARs/PYR1/PYLS, qui, en présence d'ABA, vont réguler l'effet inhibiteur des protéines appartenant à la famille des PP2C, qui sont elles-mêmes des inhibiteurs de la voie de signalisation de l'ABA. Une diminution de la quantité des transcrits des gènes la famille des PP2C a été observée pour quatre de ces membres (*HAI1*, *HAI2*, *HAI3* et *ABI2*) codant pour des protéines phosphatases de type 2C. L'acide abscissique en se fixant sur les protéines *PYL* va induire un changement dans la conformation de ce complexe qui va alors pouvoir inhiber le site actif des protéines *PP2C*, supprimant l'effet inhibiteur de ces dernières sur les protéines de la famille des *SnRK2*. Au niveau des protéines *SnRK2*, une diminution dans la quantité de transcrits pour les gènes *OST1*, *SRK2A* et *SRK2C* est observée. Ces protéines *SnRK2*, sont des protéines sérine / thréonine kinases qui vont induire l'activation de gènes sous contrôle de l'acide abscissique à travers l'activation de protéines (accumulation des transcrits pour *ABF2*). Ces protéines *ABF* vont être responsables avec d'autres régulateurs de l'activation des gènes répondant à l'ABA.

On peut postuler que la diminution de la quantité de transcrits codants pour des protéines *SnRK2*, impliquées dans l'activation des gènes sous contrôle de l'acide abscissique, est responsable des signes de stress hydriques associés à la maladie du piétin échaudage (Cook, 2003). En effet, l'acide abscissique est une hormone souvent associée à des stress édaphiques tels que la sécheresse (Raghavendra *et al.*, 2010; Wilkinson *et al.*, 2012), provoquant une fermeture des stomates afin de limiter les pertes hydriques de la plante par transpiration. La perturbation de la signalisation de cette hormone va donc potentiellement provoquer des signes de stress hydrique en réponse à la maladie du piétin échaudage.

Nos résultats (Chapitre 4) mettent en avant la dérégulation de nombreuses voies signalétiques hormonales. On peut émettre l'hypothèse que l'augmentation des transcrits pour le gène codant pour la protéine SHY2, va conduire à une forte répression des gènes sous contrôle de l'auxine. D'une manière similaire, la dérégulation des gènes codant pour la protéine GID1 et COI1, vont conduire à une stabilisation des protéines réprimant respectivement l'expression des gènes sous contrôle des gibbérellines et de l'acide jasmonique. Enfin, la dérégulation au niveau de la voie de signalisation de l'acide abscissique va potentiellement résulter en une diminution de l'expression de gènes sous contrôle de l'acide abscissique. Ces résultats montrent que l'interaction entre les plantes et les organismes du sol est réalisée au travers des modifications de la signalisation hormonale. De plus, en plus de la compréhension des interactions de la plante avec les organismes du sol, la gestion de l'équilibre entre les hormones constituerait une approche originale pour la gestion des stress environnementaux au niveau des cultures (Peleg & Blumwald, 2011; Wilkinson *et al.*, 2012).

3.4. L'induction de mécanismes de défense systémique par les vers de terre

Les mécanismes de défense systémique sont sous contrôle hormonal. Généralement, le mécanisme de défense systémique acquise (SAR), sous contrôle de l'acide salicylique, confère une résistance aux pathogènes biotrophes tandis que les mécanismes de défense systémique induite (ISR), sous contrôle de l'association entre l'acide jasmonique et l'éthylène activent des défenses généralement efficaces contre des organismes pathogènes ayant un mode de vie nécrotrophe (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Ces mécanismes de défense systémique SAR et ISR sont antagonistes. L'activation d'un de ces mécanismes va conduire à la répression de l'autre mécanisme (van Loon *et al.*, 2006; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Que ce soit le mécanisme de défense SAR déclenché par l'attaque d'un pathogène ou le mécanisme de défense ISR induite par des PGPR, tous deux sont contrôlés par le régulateur transcriptionnel NPR1. C'est ce régulateur NPR1 qui va permettre de réguler l'expression de nombreux gènes en fonction de la voie signalétique qui est activée en amont. Cette régulation va permettre à la plante de finement adapter son mécanisme de défense selon l'organisme pathogène rencontré (van Loon *et al.*, 2006), et ainsi éviter que trop de pathogène détournent des réponses comme l'hypersensibilité à leur avantage (Chapitre 4).

Le mécanisme de défense SAR est caractéristique d'une attaque par un pathogène non compatible avec la plante. La transduction du signal sous contrôle de l'acide salicylique va

alors provoquer une synthèse et accumulation de protéines de défense. Cette accumulation va être réalisée localement au niveau du site d'infection dans un premier temps, puis de façon systémique, dans l'ensemble des tissus de la plante. Ce mécanisme va rester actif pendant des semaines, voire des mois, et conférera une meilleure résistance de la plante si une nouvelle attaque d'un organisme pathogène a lieu (Kombrink *et al.*, 2011).

Contrairement à la SAR qui est induite par une attaque d'un organisme pathogène, l'ISR n'est pas associée à une forte reprogrammation du transcriptome. Le changement au niveau de l'expression des gènes étant souvent faible voir négligeable (van Wees *et al.*, 2008). L'ISR est caractéristique de l'interaction avec certaines PGPR. Les motifs spécifiques (MAPM) reconnus par la plante au travers d'un système de perception (PRR) incluent une large liste de composés : des lipopolysaccharides de bactéries Gram-négatif, des flagellines bactériennes, des facteurs d'élongation EF-Tu, de la chitine d'origine fongique ou encore plus récemment des peptides sulfatés nommés Ax21 isolés chez une proteobactérie phytopathogène du riz *Xanthomonas oryzae oryzae* (Bakker *et al.*, 2007). Des extraits purifiés de flagelline, induisent chez *A. thaliana* une ISR au travers de leur perception par la protéine membranaire FLS2, tandis que chez les plants d'haricot et de tomate, ce mécanisme n'est pas induit (Gómez-Gómez & Boller, 2002; Bakker *et al.*, 2007) soulignant la spécificité de l'induction de ce mécanisme en fonction du génotype de la plante hôte.

En présence de vers de terre (Chapitre 4), on observe au niveau des feuilles une accumulation des transcrits pour certains gènes induits lors de stress biotiques ou abiotiques. Certains de ces gènes sont sous contrôle de certaines hormones végétales comme les jasmonates (JA) et l'éthylène. Ainsi, on observe une accumulation des transcrits pour les gènes PR-4 et PDF1.2 identifiés comme étant des marqueurs de la réponse d'ISR (van Loon *et al.*, 2006). De plus, contrairement à la SAR, l'ISR n'est pas associée à une forte reprogrammation du transcriptome (van Wees *et al.*, 2008). Ceci est cohérent avec la faible proportion de gènes qui semblent modulés par la présence du ver de terre. L'absence de différence au niveau de l'accumulation des transcrits pour des gènes connus pour être régulés par l'acide salicylique, comme des gènes codant pour des protéines PR (PR-1 par exemple), semble indiquer que le ver de terre n'exerce pas un stress sur le système racinaire de la plante comme celui que l'on pourrait rencontrer avec l'attaque de certains insectes herbivores (Engelberth *et al.*, 2012). En complément, la comparaison du profil transcriptomique d'*A. thaliana* en présence de vers de terre avec d'autres études référencées dans la base de données

Genevestigator montre une forte similarité entre notre profil transcriptomique et ceux d'études portant sur l'influence d'extraits purifiés de flagellines, d'autres molécules élicitrices (ET-Fu) ainsi que des organismes pathogènes inactivés. Ces résultats viennent appuyer l'hypothèse d'une action synergique entre les vers de terre et les bactéries de la rhizosphère capables d'induire une ISR.

Perspectives

La synthèse de nos résultats met en évidence l'implication de molécules signal dans l'effet des vers de terre sur les plantes. Ce mécanisme étant probablement réalisé en étroite collaboration avec certains microorganismes de la rhizosphère. Il serait intéressant de mettre en place une série d'expérience afin de conforter nos résultats et d'approfondir l'exploration des mécanismes impliqués dans la réponse des plantes à cette association des vers de terre avec les microorganismes du sol. Dans ce but, nous proposons quatre axes de recherche distincts, mais complémentaires : (1) caractériser les changements induits par les vers de terre au niveau des populations microbiennes du sol ; (2) étudier plus précisément les voies métaboliques impliquées chez la plante dans la réponse aux vers de terre ; (3) caractériser ces molécules signal dans les sols ; (4) étudier le lien évolutif entre les microorganismes du sol, les vers de terre et les plantes.

1. Etude des modifications de la composition des communautés microbiennes du sol.

Dans nos expériences, le lien entre les vers de terre et certains microorganismes du sol capable de promouvoir la croissance des plantes a été mis en évidence. Ces résultats fournissent une première démonstration de l'implication des molécules signal dans l'effet des vers de terre sur les plantes. Cependant, ces effets ont été observés à travers des changements au niveau de la croissance, du développement et de la résistance des plantes (Chapitre 1 et 4). Ces changements sont analogues et spécifiques à ceux induits par les populations de PGPR. Nous avons démontré également une influence des vers de terre sur ces PGPR. Ces études préliminaires constituent de nouvelles pistes de recherche qu'il est nécessaire d'approfondir. Dans nos autres études (Chapitre 2 et 3), nous nous sommes intéressés à une fraction réduite des bactéries du sol : les communautés cultivables ou une souche de PGPR inoculée. Ces études ont également été centrées autour d'une fonction, la production d'acide indole acétique par ces bactéries. Il est nécessaire de réaliser des études sur l'influence des vers sur l'ensemble des communautés de microorganismes pour différentes fonctions comme la production d'autres molécules signal ou des composés antibiotiques afin de dégager une vision plus globale. Afin d'atteindre ces objectifs, l'utilisation de nouvelles techniques émergentes en écologie microbienne comme la métagénomique fournirait un outil adapté à cette problématique.

Actuellement, la question de la diversité des microorganismes d'un sol est étudiée en ciblant une séquence d'un gène codant pour la petite sous-unité 16S des ribosomes. Le choix de cette séquence est dû à son ubiquité et à son haut degré de conservation au sein des microorganismes. Cette technique repose sur l'extraction de l'ADN total d'un sol. La séquence complète ou bien une séquence partielle vont être amplifiées par réaction en chaîne de polymérisation (PCR). L'obtention des séquences complètes est utilisée afin de construire des arbres phylogénétiques pour étudier les communautés de microorganismes. L'amplification par PCR d'une séquence partielle, plus rapide, est quant à elle utilisée afin de réaliser une empreinte génétique sur électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE). Pour l'empreinte génétique, les différents fragments obtenus après PCR vont être séparés en fonction de leur taille et de leur composition en acides nucléiques. Cette méthode est la technique couramment utilisée afin de caractériser de manière simple et rapide la diversité globale des communautés microbiennes d'un sol en un temps et lieu donné.

Cette technique donnant une vision sur la diversité globale est souvent couplée à une autre technique permettant d'étudier le fonctionnement de ces communautés. Généralement, cette analyse est réalisée à travers le système BioLog MicroPlates. Ce système permet de tester 95 substrats carbonés différents et repose sur la capacité d'une communauté à se développer sur ces milieux. Les différents organismes, composant la communauté qui a été isolés du sol, vont consommer ces différents substrats carbonés à des vitesses différentes. Ceci va renseigner sur la structure de la communauté ainsi que sur la diversité fonctionnelle.

Ces deux techniques ont couramment été utilisées afin de caractériser des changements au niveau de la composition et du fonctionnement des communautés bactériennes d'un sol (Barton & Northup, 2011). Toutefois, ces deux techniques pourraient être adaptées à notre problématique d'étude. La synthèse de molécules signal agissant sur la croissance des plantes est largement répandue au sein des microorganismes du sol (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Hayat *et al.*, 2010). De plus, de nombreuses voies de biosynthèse de ces composés par les microorganismes du sol ont déjà été identifiées (Frankenberger & Arshad, 1995; Hooykaas *et al.*, 1999; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). En prenant comme exemple l'auxine, sa voie de biosynthèse chez les microorganismes du sol, similaire à celle de chez les plantes, diffère cependant sur quelques points (Figure 7). Certaines enzymes impliquées dans cette voie de biosynthèse propre aux microorganismes ont été identifiées et la séquence des gènes codant pour ces enzymes est connue (Lehmann *et al.*, 2010). En amplifiant ces gènes par PCR, il

serait possible d'avoir une empreinte génétique de l'ensemble des microorganismes, cultivables ou non, capables de participer à la voie de biosynthèse des auxines. A partir de cette empreinte, il nous sera alors possible de déterminer l'impact des vers de terre sur la diversité fonctionnelle des microorganismes capables de produire de l'auxine dans un sol.

Pour ce qui est du profil global, l'étude du gène codant pour la petite sous-unité du ribosome 16S fourni des informations importantes. Cependant, ces profils ne renseignent pas sur la composition exacte de communauté microbienne, du fait de la petite taille du fragment amplifié. Afin d'obtenir des arbres phylogénétiques précis il faut passer à des techniques plus lourdes comme le séquençage des séquences complètes. L'émergence de nouvelles techniques en écologie microbienne peut permettre d'obtenir simultanément des informations sur la diversité globale spécifique et fonctionnelle des microorganismes. Une de ces techniques est la métagénomique. Cette technique présente l'avantage d'être basée sur un protocole ne nécessitant pas de cultiver les organismes isolés dans un environnement. Ceci représente un grand avantage méthodologique sur les techniques nécessitant de cultiver les bactéries. En effet, on estime que dans la plupart des environnements, 99% des microorganismes ne peuvent être cultivés selon les méthodes courantes (Riesenfeld *et al.*, 2004). Un autre avantage de la métagénomique est d'analyser le génome complet de tous les organismes composant la communauté et non plus de cibler qu'une séquence du génome. Cette technique va alors permettre d'étudier la nature et le potentiel fonctionnel de quasiment chaque microorganisme présent, avec un degré de précision dépendant de la profondeur du séquençage.

Au niveau de la technique, la métagénomique commence par l'extraction de l'ADN total d'un échantillon prélevé dans un milieu. Cette étape va être suivie de l'insertion de ces molécules d'ADN dans un vecteur plasmidique. Ces vecteurs vont par la suite être clonés dans un organisme hôte tel qu'*Escherichia coli* afin de constituer une banque génomique. Par la suite cette banque génomique pourra être séquencée grâce aux nouvelles techniques de séquençage à haut débit (technologie 454 et CRT Solexa/Illumina). A partir des données de ce séquençage, des ARN ribosomiaux de la sous unité 16S, qui sont des gènes hautement conservés et présents en grande quantité pourront être ciblés afin de constituer des arbres phylogénétiques. Cette banque d'ADN pourra également être utilisée afin d'étudier le potentiel fonctionnel de la communauté. Grâce à d'autres techniques telles que la

métatranscriptomique et la métaprotéomique, l'expression de ces gènes et l'analyse de l'activité spécifique de certaines enzymes permettra de connaître le fonctionnement de ces communautés. De cette façon, certains gènes codant pour certaines enzymes impliquées dans la biosynthèse des molécules signal peuvent être ciblés, leur expression étudiée et leur activité enzymatique évaluée.

2. Etude des voies métaboliques impliquées dans la réponse des plantes aux organismes du sol.

Les vers de terre, comme d'autres organismes du sol, tel que le champignon responsable de la maladie du piétin échaudage, sont responsables de changements au niveau du transcriptome de la plante (Chapitre 1 et 4). Ces changements semblent réalisés en étroite collaboration avec la voie signalétique de nombreuses hormones. L'utilisation de plantes ayant subi une mutation sur un ou plusieurs gènes impliqués dans la signalisation de ces hormones constitue un outil performant dans l'étude de ces mécanismes. Les plantes mutantes ont été largement utilisées afin de comprendre le mécanisme d'action des PGPR sur les plantes. Ces études ont par exemple permis de mettre en évidence une interaction de certaines PGPR avec l'homéostasie hormonale des plantes ou encore la mise en évidence de l'implication de molécules signal à l'origine de l'initiation de l'ISR (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Bakker *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007a; Zhang *et al.*, 2007b).

Ces études portant sur les PGPR se sont généralement intéressées à une souche spécifique. Le vers de terre, par un remaniement de l'ensemble des communautés microbiennes, va complexifier les interactions qui sont entretenues entre les microorganismes de la rhizosphère et la plante. De cette complexification va résulter une modification de l'abondance relative de l'ensemble des molécules signal produites. L'utilisation de plantes mutantes soumises à une variation de l'abondance relative de ces composés pourrait permettre d'identifier les voies signalétiques impliquées dans la réponse aux vers de terre. De plus, grâce à l'utilisation de mutants, il serait possible de supprimer des carrefours signalétiques (cross-talk) et ainsi d'identifier l'implication d'une molécule signal indépendamment de ses interactions avec les autres. Il serait ainsi possible de déterminer si l'implication de l'auxine dans l'effet du vers de terre, mise en évidence par la réponse du double mutant d'*A. thaliana*

aux1-7 ; axr4-2, est bien due à l'émission de cette hormone dans la rhizosphère, ou à une autre molécule signal comme l'éthylène ou un éliciteur bactérien.

Dans la continuité de cette étude, il serait intéressant de voir l'interaction de ces voies métaboliques avec le changement des propriétés chimiques (nutriments) et physiques (porosité et agrégation) induit par les vers de terre au niveau des sols. Les vers de terre via leur activité vont conduire à l'apparition de zones (patch) où les nutriments sont à des concentrations différentes du sol adjacent. Ces différences de la distribution des nutriments (comme le nitrate) sont connues pour influencer l'émission et l'élongation des racines latérales (Zhang *et al.*, 1999; Linkohr *et al.*, 2002). Dans une étude annexe à ce travail (Annexe 2), nous nous sommes déjà intéressés à l'influence de la distribution et de la disponibilité en nitrate sur le développement d'*Arabidopsis thaliana* (Blouin & Puga-Freitas, 2011). Dans un dispositif de culture *in vitro*, plusieurs doses (faible, optimale et forte) de teneur en nitrates ont été couplées à différents degrés d'hétérogénéité (nulle, faible et forte). Dans la continuité de ces travaux, il serait intéressant d'étudier la réponse de plusieurs plantes mutantes affectées dans la signalisation d'une ou plusieurs hormones dans notre dispositif expérimental. Il serait notamment intéressant de faire le lien entre l'hétérogénéité de la distribution des nutriments, la teneur en nutriments des zones riches et la présence de molécules signal dans ces zones, qui pourrait modifier la croissance et le développement des racines.

3. Dosage des molécules signal dans les sols

Une autre démonstration claire de l'impact des vers de terre sur les molécules signal serait de doser ces composés dans les sols. L'élaboration d'un protocole permettant d'extraire, d'isoler, de doser ces composés et de caractériser leur effet sur les plantes permettrait d'étudier la stabilité, la disponibilité et l'abondance de ces composés dans les sols et de mieux comprendre l'effet des vers de terre. Largement maîtrisé pour les tissus végétaux (Hooykaas *et al.*, 1999; Birkemeyer *et al.*, 2003; Barkawi *et al.*, 2008), le dosage de ces composés dans les sols est soumis à de nombreuses contraintes. Comme souligné précédemment, le dosage de l'auxine a déjà été entrepris dans les déjections des vers de terre (Nardi *et al.*, 1988; Tomati *et al.*, 1988; Muscolo *et al.*, 1998; Canellas *et al.*, 2002). Ces dosages ont été entrepris selon des techniques immunologiques (test ELISA) ou bien par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse (GC-MS). Ces études ont montré la présence

d'auxine dans les sols soumis à l'activité des vers de terre. Dans la continuité de ces travaux il serait intéressant de voir si ces protocoles permettent la comparaison de plusieurs sols, pour différentes molécules signal.

Le dosage simultané de ces molécules signal dans la plante et dans le sol permettrait de mieux comprendre l'importance de la régulation et de l'action de ces composés. Les plantes dans leurs environnements sont soumises à de nombreux stress biotiques et abiotiques. La production de certains composés hormonaux par les champignons pathogènes est un élément clé dans leur virulence (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Les bactéries de la rhizosphère, en produisant ces composés, vont pouvoir influencer l'équilibre hormonal dans la plante, ce qui pourrait accroître la capacité de défense et donc la croissance des plantes. Cette voie de recherche pourrait déboucher sur des alternatives à l'utilisation de pesticides ou d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans la lutte contre les pathogènes et parasites des plantes.

4. Etude du lien coévolutif entre les plantes, les vers de terre et les microorganismes de la rhizosphère.

Les effets opposés des vers de terre sur différentes espèces de plante (Scheu, 2003; Brown *et al.*, 2004; Puga-Freitas *et al.*, accepted), souligne l'importance de diversifier les espèces de plantes, de vers de terre, voire de la composition des communautés microbiennes par une diversification des sols utilisés ou par l'inoculation de bactéries spécifiques. Cela nous permettrait d'approfondir le lien co-évolutif qui existe entre ces différents acteurs. Les études portant sur l'action d'organismes du sol tel que les PGPR ou les pathogènes, sur la plante, ont souligné l'importance des mécanismes adaptatifs sur lesquels reposent ces interactions. En réalisant différentes associations d'une plante et d'un ver de terre issus ou non de la même aire géographique, on pourrait vérifier que l'effet positif est d'autant plus important pour des organismes issus de la même région géographique. Le fait que des mécanismes de communication entre la plante et le vers de terre soient responsables d'un effet des vers plus efficace pour les organismes issus de la même région soutiendrait l'idée d'une co-évolution mutualiste entre les plantes et les vers de terre.

Les analyses métagénomiques pourraient également déboucher sur une meilleure compréhension des liens évolutifs qui existe entre ces organismes. Il serait intéressant de voir l'influence d'une plante et d'un vers de terre issus ou non de la même aire géographique, sur un sol (et donc une composition microbienne) qui leur est commun ou non. A partir de la caractérisation des communautés microbiennes de la rhizosphère on pourrait ainsi voir si une espèce invasive (de vers de terre ou de plante) va imposer une nouvelle composition microbienne ou alors si l'espèce autochtone (de plante ou de vers de terre) va être capable de conserver la composition d'origine ou bien si un brassage va avoir lieu et va résulter en une communauté microbienne nouvelle.

Références

-A-

- Achard, P., Vriezen, W.H., Van Der Straeten, D. & Harberd, N.P.** (2003) Ethylene Regulates Arabidopsis Development via the Modulation of DELLA Protein Growth Repressor Function. *The Plant Cell Online*, **15**, 2816-2825.
- Agrios, G.N.** (2005) *Plant pathology*. Elsevier Academic Press.
- Alpei, J., Bonkowski, M. & Scheu, S.** (1996) Protozoa, Nematoda and Lumbricidae in the rhizosphere of *Hordelymus europaeus* (Poaceae): faunal interactions, response of microorganisms and effects on plant growth. *Oecologia*, **106**, 111-126.
- Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Bierman, P., Metzger, J.D., Lee, S. & Welch, C.** (2003) Effects of vermicomposts on growth and marketable fruits of field-grown tomatoes, peppers and strawberries. *Pedobiologia*, **47**, 731-735.
- Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Lee, S. & Byrne, R.** (2006) Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. *Eur J Soil Biol*, **42**, S65-S69.
- Arguello, H., Rincón, J. & Castellanos, D.** (2011) Obtención y evaluación de un biofertilizante enriquecido que contribuya con el incremento de la productividad de cultivos de hortalizas. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, pp. 209.
- Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E.V. & Kudoyarova, G.R.** (2005) Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, **272**, 201-209.
- Arshad, M., Shaharoon, B. & Mahmood, T.** (2008) Inoculation with *Pseudomonas* spp. Containing ACC-Deaminase Partially Eliminates the Effects of Drought Stress on Growth, Yield, and Ripening of Pea (*Pisum sativum* L.). *Pedosphere*, **18**, 611-620.
- Asai, S., Ohta, K. & Yoshioka, H.** (2008) MAPK Signaling Regulates Nitric Oxide and NADPH Oxidase-Dependent Oxidative Bursts in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell Online*, **20**, 1390-1406.
- Atiyeh, R.M., Arancon, N., Edwards, C.A. & Metzger, J.D.** (2000) Influence of earthworm-processed pig manure on the growth and yield of greenhouse tomatoes. *Bioresour. Technol.*, **75**, 175-180.

-B-

- Badri, D.V. & Vivanco, J.M.** (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, **32**, 666-681.
- Badri, D.V., Weir, T.L., van der Lelie, D. & Vivanco, J.M.** (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, 642-650.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. & Vivanco, J.M.** (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms *Annual Review of Plant Biology*. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 233-266.
- Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. & van Loon, L.C.** (2007) Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, **97**, 239-243.
- Barazani, O. & Friedman, J.** (1999) Is IAA the Major Root Growth Factor Secreted from Plant-Growth-Mediating Bacteria? *J. Chem. Ecol.*, **25**, 2397-2406.
- Barkawi, L.S., Tam, Y.-Y., Tillman, J.A., Pederson, B., Calio, J., Al-Amier, H., Emerick, M., Normanly, J. & Cohen, J.D.** (2008) A high-throughput method for the quantitative analysis of indole-3-acetic acid and other auxins from plant tissue. *Anal. Biochem.*, **372**, 177-188.
- Barois, I., Villemin, G., Lavelle, P. & Toutain, F.** (1993) Transformation of the soil structure through *Pontoscolex corethrurus (oligochaeta)* intestinal-tract. *Geoderma*, **56**, 57-66.
- Bartel, B. & Fink, G.R.** (1994) Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 6649-6653.
- Barton, L.L. & Northup, D.E.** (2011) *Microbial Ecology*. Wiley.
- Bashan, Y. & Holguin, G.** (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant-growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.*, **30**, 1225-1228.
- Benjamins, R., Ampudia, C.S.G., Hooykaas, P.J.J. & Offringa, R.** (2003) PINOID-Mediated signaling involves calcium-binding proteins. *Plant Physiol*, **132**, 1623-1630.

- Bernard, L., Chapuis-Lardy, L., Razafimbelo, T., Razafindrakoto, M., Pablo, A.-L., Legname, E., Poulain, J., Bruls, T., O'Donohue, M., Brauman, A., Chotte, J.-L. & Blanchart, E.** (2012) Endogeic earthworms shape bacterial functional communities and affect organic matter mineralization in a tropical soil. *ISME J*, **6**, 213-222.
- Birkemeyer, C., Kolasa, A. & Kopka, J.** (2003) Comprehensive chemical derivatization for gas chromatography-mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. *J. Chromatogr. A*, **993**, 89-102.
- Blanchart, E., Albrecht, A., Alegre, J., Duboisset, A., Gilot, C., Pashanasi, B., Lavelle, P. & Brussaard, L.** (1999) Effects of earthworms on soil structure and physical properties. In Lavelle, P., Brussaard, L., Hendrix, P. (eds) *Earthworm management in tropical agroecosystems*. CAB International, Wallingford, pp. 149–172.
- Blanchart, E., Lavelle, P., Braudeau, E., Le Bissonnais, Y. & Valentin, C.** (1997) Regulation of soil structure by geophagous earthworm activities in humid savannas of Côte d'Ivoire. *Soil Biol. Biochem.*, **29**, 431-439.
- Blouin, M., Barot, S. & Lavelle, P.** (2006) Earthworms (*Millsonia anomala*, Megascolecidae) do not increase rice growth through enhanced nitrogen mineralization. *Soil Biol. Biochem.*, **38**, 2063-2068.
- Blouin, M., Barot, S. & Roumet, C.** (2007a) A quick method to determine root biomass distribution in diameter classes. *Plant and Soil*, **290**, 371-381.
- Blouin, M., Lavelle, P. & Laffray, D.** (2007b) Drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) is enhanced in the presence of the compacting earthworm *Millsonia anomala*. *Env. Exp. Bot.*, **60**, 352–359.
- Blouin, M. & Puga-Freitas, R.** (2011) Combined effects of contrast between poor and rich patches and overall nitrate concentration on *Arabidopsis thaliana* root system structure. *Funct. Plant Biol.*, **38**, 364-371.
- Blouin, M., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.T., Laffray, D., Reversat, G., Pando, A., Tondoh, J. & Lavelle, P.** (2005) Belowground organism activities affect plant aboveground phenotype, inducing plant tolerance to parasites. *Ecol. Lett.*, **8**, 202-208.

- Bonkowski, M.** (2004) Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytol.*, **162**, 617-631.
- Bonkowski, M. & Brandt, F.** (2002) Do soil protozoa enhance plant growth by hormonal effects? *Soil Biol. Biochem.*, **34**, 1709-1715.
- Bossuyt, H., Six, J. & Hendrix, P.F.** (2005) Protection of soil carbon by microaggregates within earthworm casts. *Soil Biol. Biochem.*, **37**, 251-258.
- Bouché, M.B.** (1971) *Lombriciens de France: écologie et systématique*. Institut national de la recherche agronomique.
- Bouché, M.B.** (1975) Action de la faune sur les états de la matière organique dans les écosystèmes. In Kilbertus, G., Reisinger, O., Mourey, A., Cancela da Fonseca, J.A. (eds) *Humification et biodégradation*. Pierron, Sarreguemines, France, pp. 157-168.
- Bouma, T.J., Nielsen, K.L. & Koutstaal, B.** (2000) Sample preparation and scanning protocol for computerised analysis of root length and diameter. *Plant and Soil*, **218**, 185-196.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R. & Gorchach, J.** (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, **13**, 1499-1510.
- Brandl, M.T. & Lindow, S.E.** (1997) Environmental Signals Modulate the Expression of an Indole-3-Acetic Acid Biosynthetic Gene in *Erwinia herbicola*. *Mol. Plant Microbe In.*, **10**, 499-505.
- Broekaert, W.F., Van Parijs, J., Leyns, F., Joos, H. & Peumans, W.J.** (1989) A Chitin-Binding Lectin from Stinging Nettle Rhizomes with Antifungal Properties. *Science*, **245**, 1100-1102.
- Brown, G.G., Barois, I. & Lavelle, P.** (2000) Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the rhizosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *Eur J Soil Biol*, **36**, 177-198.
- Brown, G.G., Edwards, C.A. & Brussaard, L.** (2004) How earthworms affect plant growth: burrowing into the mechanisms. In Edwards, C.A. (ed) *Earthworm ecology*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 13-49.

- Brown, G.G., Pashanasi, B., Villenave, C., Patron, J.C., Senapati, B.K., Giri, S., Barois, I., Lavelle, P., Blanchart, E., Blakemore, R.J., Spain, A.V. & Boyer, J.** (1999) Effects of earthworms on plant production in the tropics. In Lavelle, P., Brussaard, L., Hendrix, P. (eds) *The management of earthworms in tropical agroecosystems*. CAB International, Wallingford, pp. 87-148.
- Brussaard, L.** (1999) On the mechanisms of interactions between earthworms and plants. *Pedobiologia*, **43**, 880–885.
- Busam, G., Junghanns, K.T., Kneusel, R.E., Kassemeyer, H.H. & Matern, U.** (1997) Characterization and Expression of Caffeoyl-Coenzyme A 3-O-Methyltransferase Proposed for the Induced Resistance Response of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiol.*, **115**, 1039-1048.
- Businelli, M., Perucci, P., Patumi, M. & Giusquiani, P.** (1984) Chemical composition and enzymic activity of some worm casts. *Plant and Soil*, **80**, 417-422.

-C-

- Caesar-TonThat, T.C., Caesar, A.J., Gaskin, J.F., Sainju, U.M. & Busscher, W.J.** (2007) Taxonomic diversity of predominant culturable bacteria associated with microaggregates from two different agroecosystems and their ability to aggregate soil in vitro. *Appl. Soil Ecol.*, **36**, 10-21.
- Campbell, J.N., Conn, K., Sorlic, L. & Cook, F.O.** (1986) Inhibition of growth in canola seedlings caused by an opportunistic *Pseudomonas* sp. under laboratory and field conditions. *Can. J. Microb.*, **32**, 201-207.
- Canellas, L.P., Dantas, D.J., Aguiar, N.O., Peres, L.E.P., Zsögön, A., Olivares, F.L., Dobbss, L.B., Façanha, A.R., Nebbioso, A. & Piccolo, A.** (2011) Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. *Ann. Appl. Biol.*, **159**, 202-211.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Facanha, A.L. & Facanha, A.R.** (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.*, **130**, 1951-1957.

- Cartieaux, F., Thibaud, M.-C., Zimmerli, L., Lessard, P., Sarrobert, C., David, P., Gerbaud, A., Robaglia, C., Somerville, S. & Nussaume, L.** (2003) Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. *The Plant Journal*, **36**, 177-188.
- Castellanos, D., Cubillos, R. & Argüello, H.** (2009) Selección de Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal (Ácido Indol Acético) a partir de Muestras de Suelo Rizosferico, como Primera Etapa en el Desarrollo de un Biofertilizante. *Rev. Bras. de Agroecologia*, **4**, 1720-1723.
- Celis Bautista, L.X. & Gallardo, I.R.** (2008) Estandarizacion de metodos de deteccion para promotores de crecimiento vegetal (acido indol acetico y giberelinas) en cultivos microbianos *Facultad de Ciencias Microbiologia agricola y veterinaria*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, pp. 140.
- Chan, K.Y., Mead, J.A., Roberts, W.P. & Wong, P.T.W.** (1989) The effect of soil compaction and fumigation on poor early growth of wheat under direct drilling. *Austr. J. Agr. Res.*, **42**, 221-228.
- Chaouch, S., Queval, G. & Noctor, G.** (2012) AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **69**, 613-627.
- Chaoui, H., Edwards, C.A., Brickner, M., Lee, S. & Arancon, N.Q.** (2002) Suppression of the plant diseases *Pythium*, *Rhizoctonia*, and *Verticillium* by vermicompost. *Proc Brighton Crop Prot Conf Pests Dis*, **2**, 711-715.
- Chapon, A., Guillerm, A.Y., Delalande, L., Lebreton, L. & Sarniguet, A.** (2002) Dominant Colonisation of Wheat Roots by *Pseudomonas fluorescens* Pf29A and Selection of the Indigenous Microflora in the Presence of the Take-all Fungus. *Eur. J. Plant Pathol.*, **108**, 449-459.
- Clapperton, M.J., Lee, N.O., Binet, F. & Conner, R.L.** (2001) Earthworms indirectly reduce the effects of take-all (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) on soft white spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Fielder). *Soil Biol. Biochem.*, **33**, 1531-1538.
- Cook, R.J.** (2003) Take-all of wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **62**, 73-86.

- Crowe, M.L., Serizet, C., Thareau, V., Aubourg, S.b., Rouzé, P., Hilson, P., Beynon, J., Weisbeek, P., van Hummelen, P., Reymond, P., Paz-Ares, J., Nietfeld, W. & Trick, M.** (2003) CATMA: a complete Arabidopsis GST database. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 156-158.
- Curry, J.P. & Byrne, D.** (1992) The role of earthworms in straw decomposition and nitrogen turnover in arable land in Ireland. *Soil Biol. Biochem.*, **24**, 1409-1412.
- Curry, J.P. & Schmidt, O.** (2007) The feeding ecology of earthworms – A review. *Pedobiologia*, **50**, 463-477.

-D-

- Darwin, C.** (1881) *The formation of vegetable mould, through the action of worms: with observations on their habits*. Murray, London.
- Daval, S., Lebreton, L., Gazengel, K., Boutin, M., Guillerm-Erckelboudt, A.-Y. & Sarniguet, A.** (2011) The biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp strain affects the pathogenesis-related gene expression of the take-all fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on wheat roots. *Mol. Plant Pathol.*, **12**, 839-854.
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V. & Guern, J.** (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta*, **198**, 532-541.
- Depuydt, S. & Hardtke, Christian S.** (2011) Hormone Signalling Crosstalk in Plant Growth Regulation. *Curr. Biol.*, **21**, R365-R373.
- Dharmasiri, S., Swarup, R., Mockaitis, K., Dharmasiri, N., Singh, S.K., Kowalchuk, M., Marchant, A., Mills, S., Sandberg, G., Bennett, M.J. & Estelle, M.** (2006) AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science*, **312**, 1218-1220.
- Dielen, A.S., Badaoui, S., Candresse, T. & German-Retana, S.** (2010) The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: a never-ending hide-and-seek game. *Mol. Plant Pathol.*, **11**, 293-308.

- Dimkpa, C.O., Svatos, A., Dabrowska, P., Schmidt, A., Boland, W. & Kothe, E.** (2008) Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. *Chemosphere*, **74**, 19-25.
- Dobereiner, J. & Pedrosa, F.A.** (1981) *Nitrogen fixing bacteria in non-leguminous plants*. Science Tech, Madison, WI, USA.
- Doran, J.W., Jones, A.J. & America, S.S.S.o.** (1996) *Methods for assessing soil quality*. Soil Science Society of America.
- Durbak, A., Yao, H. & McSteen, P.** (2012) Hormone signaling in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **15**, 92-96.

-E-

- Edwards, C.A.** (2004) *Earthworm ecology*. CRC Press.
- Edwards, C.A. & Bohlen, P.J.** (1995) *Biology and Ecology of Earthworms*. Springer.
- Elmer, W.H.** (2009) Influence of Earthworm Activity on Soil Microbes and Soilborne Diseases of Vegetables. *Plant Dis.*, **93**, 175-179.
- Endlweber, K., Krome, K., Welzl, G., Schäffner, A.R. & Scheu, S.** (2011) Decomposer animals induce differential expression of defence and auxin-responsive genes in plants. *Soil Biol. Biochem.*, **43**, 1130-1138.
- Engelberth, J., Contreras, C.F. & Viswanathan, S.** (2012) Transcriptional Analysis of Distant Signaling Induced by Insect Elicitors and Mechanical Wounding in *Zea mays*. *PLoS ONE*, **7**, e34855.

-F-

- Frankenberger, W.T. & Arshad, M.** (1995) *Phytohormones in soils : Microbial production and function*. Marcel Dekker, New York.
- Freeman, J. & Ward, E.** (2004) *Gaeumannomyces graminis*, the take-all fungus and its relatives. *Mol. Plant Pathol.*, **5**, 235-252.

Fu, X. & Harberd, N.P. (2003) Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, **421**, 740-743.

-G-

Gardner, J., Chandler, J. & Feldman, A. (1984) Growth promotion and inhibition by antibiotic-producing fluorescent pseudomonads on citrus roots. *Plant and Soil*, **77**, 103-113.

Gavrilov, K. (1963) Earthworms, producers of biologically active substances. *Zh. Obshch. Biol.*, **24**, 149-154.

Glazebrook, J. (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **43**, 205-227.

Gobat, J.M., Aragno, M. & Matthey, W. (2010) *Le sol vivant: Bases de pédologie, Biologie des sols*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes.

Gómez-Gómez, L. & Boller, T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.*, **7**, 251-256.

Govrin, E.M. & Levine, A. (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.*, **10**, 751-757.

Govrin, E.M., Rachmilevitch, S., Tiwari, B.S., Soloman, M. & Levine, A. (2006) An elicitor from *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* and other plants and promotes the gray mold disease. *Phytopathology*, **96**, 299-307.

Guilleroux, M. & Osbourn, A. (2004) Gene expression during infection of wheat roots by the 'take-all' fungus *Gaeumannomyces graminis*. *Mol. Plant Pathol.*, **5**, 203-216.

Guo, F.Q., Wang, R. & Crawford, N.M. (2002) The *Arabidopsis* dual affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is regulated by auxin in both shoots and roots. *J. Exp. Bot.*, **53**, 835-844.

-H-

- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. & Ahmed, I.** (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.*, **60**, 579-598.
- Heil, M.** (1999) Systemic acquired resistance: available information and open ecological questions. *J. Ecol.*, **87**, 341-346.
- Himmelbauer, M.L., Loiskandl, W. & Kastanek, F.** (2004) Estimating length, average diameter and surface area of roots using two different Image analyses systems. *Plant and Soil*, **260**, 111-120.
- Hirsch, A.M., Fang, Y., Asad, S. & Kapulnik, Y.** (1997) The role of phytohormones in plant-microbe symbioses. *Plant and Soil*, **194**, 171-184.
- Hobbie, L. & Estelle, M.** (1995) The axr4 auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *The Plant Journal*, **7**, 211-220.
- Hobbie, L.J.** (2006) Auxin and cell polarity: the emergence of AXR4. *Trends Plant Sci.*, **11**, 517-518.
- Hontzeas, N., Zoidakis, J., Glick, B.R. & Abu-Omar, M.M.** (2004) Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, **1703**, 11-19.
- Hooykaas, P.J.J., Hall, M.A. & Libbenga, K.R.** (1999) *Biochemistry and molecular biology of plant hormones*. Elsevier.
- Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A.** (2008) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protocols*, **4**, 44-57.
- Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A.** (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1-13.

-I-

- Ingham, R.E., Trofymow, J.A., Ingham, E.R. & Coleman, D.C.** (1985) Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecol. Monogr.*, **55**, 119-140.
- Ioio, R.D., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P. & Sabatini, S.** (2008) A Genetic Framework for the Control of Cell Division and Differentiation in the Root Meristem. *Science*, **322**, 1380-1384.

-J-

- James, S.W.** (1991) Soil, nitrogen, phosphorus, and organic-matter processing by earthworms in tallgrass prairie. *Ecology*, **72**, 2101-2109.
- Jameson, P.E.** (2000) Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions - An overview. *Plant Growth Regul.*, **32**, 369-380.
- Jana, U., Barot, S., Blouin, M., Lavelle, P., Laffray, D. & Repellin, A.** (2010) Earthworms influence the production of above- and belowground biomass and the expression of genes involved in cell proliferation and stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Soil Biol. Biochem.*, **42**, 244-252.
- Jones, C.G., Lawton, J.H. & Shachak, M.** (1994) Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, **69**, 373-386.

-K-

- Karlen, D.L., Mausbach, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F. & Schuman, G.E.** (1997) Soil quality: A concept, definition, and framework for evaluation. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **61**, 4-10.
- Kloek, A.P., Verbsky, M.L., Sharma, S.B., Schoelz, J.E., Vogel, J., Klessig, D.F. & Kunkel, B.N.** (2001) Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *The Plant Journal*, **26**, 509-522.

- Kloepper, J.W. & Schroth, M.N.** (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, I. (ed) *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Angers, France, pp. 879–882.
- Kombrink, A., Sánchez-Vallet, A. & Thomma, B.P.H.J.** (2011) The role of chitin detection in plant–pathogen interactions. *Microbes Infect.*, **13**, 1168-1176.
- Kremer, R.** (2006) Deleterious Rhizobacteria - Plant-Associated Bacteria. In Gnanamanickam, S. (ed). Springer Netherlands, pp. 335-357.
- Krome, K., Rosenberg, K., Dickler, C., Kreuzer, K., Ludwig-Müller, J., Ullrich-Eberius, C., Scheu, S. & Bonkowski, M.** (2010) Soil bacteria and protozoa affect root branching via effects on the auxin and cytokinin balance in plants. *Plant and Soil*, **328**, 191-201.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., Zazimalova, E., Benkova, E., Nacry, P. & Gojon, A.** (2010) Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Dev. Cell*, **18**, 927-937.
- Kuzyakov, Y. & Domanski, G.** (2000) Carbon input by plants into the soil. Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science/Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **163**, 421-431.

-L-

- Laossi, K.-R., Ginot, A., Noguera, D., Blouin, M. & Barot, S.** (2010) Earthworm effects on plant growth do not necessarily decrease with soil fertility. *Plant and Soil*, **328**, 109-118.
- Lattaud, C., Locati, S., Mora, P., Rouland, C. & Lavelle, P.** (1998a) The diversity of digestive systems in tropical geophagous earthworms. *Appl. Soil Ecol.*, **9**, 189-195.
- Lattaud, C., Mora, P., Garvin, M., Locati, S., Rouland, C., Diaz Cosin, D.J., Jesus, J.B., Trigo, D. & Garvin, M.H.** (1998b) Enzymatic digestive capabilities in geophagous earthworms - origin and activities of cellulolytic enzymes. *Pedobiologia*, **43**, 842-850.

- Lavelle, P.** (2002) Functional domains in soils. *Ecol. Res.*, **17**, 441-450.
- Lavelle, P., Bignell, D., Lepage, M., Wolters, V., Roger, P., Ineson, P., Heal, O.W. & Dhillon, S.** (1997) Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *Eur J Soil Biol*, **33**, 159-193.
- Lavelle, P., Decaëns, T., Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., Margerie, P., Mora, P. & Rossi, J.P.** (2006) Soil invertebrates and ecosystem services. *Eur J Soil Biol*, **42**, Supplement 1, S3-S15.
- Lavelle, P., Lattaud, C., Trigo, D. & Barois, I.** (1995) Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and Soil*, **170**, 23-33.
- Lavelle, P., Rouland, C., Binet, F., Diouf, M. & Kersanté, A.** (2004) Regulation of microbial activities by roots and soil invertebrates. In Buscot, F., Varma, A. (eds) *Regulation of Microbial Activities*. Springer Verlag, Berlin.
- Lavelle, P., Schaefer, R. & Zaidi, Z.** (1989) Soil ingestion and growth in *Millsonia anomala*, a tropical earthworm, as influenced by the quality of the organic-matter ingested. *Pedobiologia*, **33**, 379-388.
- Lavelle, P. & Spain, A.V.** (2001) *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers.
- Le Bayon, R.C., Moreau, S., Gascuel-Odoux, C. & Binet, F.** (2002) Annual variations in earthworm surface-casting activity and soil transport by water runoff under a temperate maize agroecosystem. *Geoderma*, **106**, 121-135.
- Lehmann, T., Hoffmann, M., Hentrich, M. & Pollmann, S.** (2010) Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: A widely distributed way of indole-3-acetic acid production? *Eur. J. Cell Biol.*, **89**, 895-905.
- León, S.T.** (2003) Resistencia sistémica inducida con caldos microbianos de rizosfera para control de gota (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) en agroecosistemas de papa. *Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos*. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, pp. 256.
- Lewis, D.R., Negi, S., Sukumar, P. & Muday, G.K.** (2011) Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development*, **138**, 3485-3495.

- Linkohr, B.I., Williamson, L.C., Fitter, A.H. & Leyser, H.M.O.** (2002) Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of Arabidopsis. *The Plant Journal*, **29**, 751-760.
- Liu, H., Coulthurst, S.J., Pritchard, L., Hedley, P.E., Ravensdale, M., Humphris, S., Burr, T., Takle, G., Brurberg, M.B., Birch, P.R.J., Salmond, G.P.C. & Toth, I.K.** (2008) Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *Plos Pathogens*, **4**.
- Loper, J.E. & Schroth, M.N.** (1986) Influence of bacterial sources of indole-3-acetic-acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, **76**, 386-389.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J.C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L.I. & Valencia-Cantero, E.** (2007) *Bacillus megaterium* Rhizobacteria Promote Growth and Alter Root-System Architecture Through an Auxin- and Ethylene-Independent Signaling Mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe In.*, **20**, 207-217.
- Lynch, J.M. & Whipps, J.M.** (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, **129**, 1-10.
- M-**
- Ma, W. & Berkowitz, G.A.** (2011) Ca²⁺ conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades. *New Phytol.*, **190**, 566-572.
- Macdonald, A. & Gutteridge, R.** (2012) Effects of take-all (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) on crop N uptake and residual mineral N in soil at harvest of winter wheat. *Plant and Soil*, **350**, 253-260.
- Mackay, A.D., Springett, J.A., Syers, J.K. & Gregg, P.E.H.** (1983) Origin of the effect of earthworms on the availability of phosphorus in a phosphate rock. *Soil Biol. Biochem.*, **15**, 63-73.
- Mandryck, M.** (1969) Frenching of tobacco in Australian soils and in soil leachates. *Austr. J. Agr. Res.*, **20**, 709-717.

- Martens, D.A. & Frankenberger, W.T.** (1994) Assimilation of exogenous 2'-14C-indole-3-acetic acid and 3'-14C-tryptophan exposed to the roots of three wheat varieties *Plant and Soil*, **166**, 281-290.
- Milleret, R., Le Bayon, R.C., Lamy, F., Gobat, J.M. & Boivin, P.** (2009) Impact of roots, mycorrhizas and earthworms on soil physical properties as assessed by shrinkage analysis. *J. Hydrol.*, **373**, 499-507.
- Minnich, J.** (1977) *The earthworm book: how to raise and use earthworms for your farm and garden*. Rodale Press.
- Morsomme, P. & Boutry, M.** (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1465**, 1-16.
- Muday, G.K., Rahman, A. & Binder, B.M.** (2012) Auxin and ethylene: collaborators or competitors? *Trends Plant Sci.*, **17**, 181-195.
- Murashige, T. & Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, **15**, 473-497.
- Muscolo, A., Bovalo, F., Gionfriddo, F. & Nardi, S.** (1999) Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biol. Biochem.*, **31**, 1303-1311.
- Muscolo, A., Cutrupi, S. & Nardi, S.** (1998) IAA detection in humic substances. *Soil Biol. Biochem.*, **30**, 1199-1201.

-N-

- Nardi, S., Arnoldi, G. & Dellagnola, G.** (1988) Release of the hormone-like activities from *Allolobophora rosea* (sav) and *Allolobophora caliginosa* (sav) feces. *Can. J. Soil Sci.*, **68**, 563-567.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A. & Vianello, A.** (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. Biochem.*, **34**, 1527-1536.

- Nardi, S., Pizzeghello, D., Reniero, F. & Rascio, N.** (2000) Chemical and Biochemical Properties of Humic Substances Isolated from Forest Soils and Plant Growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **64**, 639-645.
- Nehl, D.B., Allen, S.J. & Brown, J.F.** (1996) Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Appl. Soil Ecol.*, **5**, 1-20.
- Nielson, R.L.** (1965) Presence of Plant Growth Substances in Earthworms demonstrated by Paper Chromatography and the Went Pea Test. *Nature*, **208**, 1113-1114.
- Noguera, D., Laossi, K.R., Lavelle, P., de Carvalho, M.H.C., Asakawa, N., Botero, C. & Barot, S.** (2011) Amplifying the benefits of agroecology by using the right cultivars. *Ecol. Appl.*, **21**, 2349-2356.

-O-

- Oades, J.** (1984) Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant and Soil*, **76**, 319-337.

-P-

- Parkin, T.B. & Berry, E.C.** (1999) Microbial nitrogen transformations in earthworm burrows. *Soil Biol. Biochem.*, **31**, 1765-1771.
- Parmelee, R.W. & Crossley, D.A.J.** (1988) Earthworm production and role in the nitrogen cycle of a no-tillage agroecosystem on the Georgia Piedmont. *Pedobiologia*, **32**, 353-361.
- Patten, C.L. & Click, B.R.** (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microb.*, **42**, 207-220.
- Peleg, Z. & Blumwald, E.** (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **14**, 290-295.
- Peng, X., Wood, C., Blalock, E., Chen, K., Landfield, P. & Stromberg, A.** (2003) Statistical implications of pooling RNA samples for microarray experiments. *BMC Bioinformatics*, **4**, 26.

- Perkins, J.H.** (1997) *Geopolitics and the Green Revolution: Wheat, Genes, and the Cold War*. Oxford University Press, USA.
- Persello-Cartieaux, F., David, P., Sarrobert, C., Thibaud, M.C., Achouak, W., Robaglia, C. & Nussaume, L.** (2001) Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root-associated *Pseudomonas*. *Planta*, **212**, 190-198.
- Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L. & Robaglia, C.** (2003) Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. *Plant, Cell & Environment*, **26**, 189-199.
- Pickett, F.B., Wilson, A.K. & Estelle, M.** (1990) The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol*, **94**, 1462-1466.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. & Van Wees, S.C.M.** (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 308-316.
- Ping, L. & Boland, W.** (2004) Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.*, **9**, 263-266.
- Pížl, V., Elhottová, D., Koubová, A. & Kahounová, L.** (2012) The effects of earthworms on microbial communities: comparison of soil and cave populations of *Aporrectodea rosea* XVI *International Colloquium on Soil Zoology*, Coimbra, Portugal.
- Podile, A. & Kishore, G.** (2006) Plant growth-promoting rhizobacteria - Plant-Associated Bacteria. In Gnanamanickam, S. (ed). Springer Netherlands, pp. 195-230.
- Pollmann, S., Dückting, P. & Weiler, E.W.** (2009) Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. *Phytochemistry*, **70**, 523-531.
- Probanza, A., Lucas, J.A., Acero, N. & Gutierrez Mañero, F.J.** (1996) The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. *Plant and Soil*, **182**, 59-66.
- Puga-Freitas, R., Abbad, S., Gigon, A., Garnier-Zarli, E. & Blouin, M.** (2012) Control of Cultivable IAA-Producing Bacteria by the Plant *Arabidopsis thaliana* and the Earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Appl. Env. Soil Sci.*, **2012**, 4.

Puga-Freitas, R., Barot, S., Taconnat, L., Renou, J.-P. & Blouin, M. (accepted) Signal molecules mediate the impact of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* on growth, development and defence of the plant *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, **X**, XXX-XXX.

Pulleman, M.M., Six, J., Uyl, A., Marinissen, J.C.Y. & Jongmans, A.G. (2005) Earthworms and management affect organic matter incorporation and microaggregate formation in agricultural soils. *Appl. Soil Ecol.*, **29**, 1-15.

-Q-

Quaggiotti, S., Ruperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V. & Nardi, S. (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.*, **55**, 803-813.

-R-

Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A. & Grill, E. (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci.*, **15**, 395-401.

Rahman, A., Amakawa, T., Goto, N. & Tsurumi, S. (2001) Auxin is a Positive Regulator for Ethylene-Mediated Response in the Growth of *Arabidopsis* Roots. *Plant Cell Physiol.*, **42**, 301-307.

Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D. & Handelsman, J. (2004) METAGENOMICS: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annu. Rev. Genet.*, **38**, 525-552.

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. & Jones, J.D.G. (2011) Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **49**, 317-343.

Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R. & Jones, J.D.G. (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **10**, 372-379.

Rodríguez, H. & Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.*, **17**, 319-339.

Ronald, P.C. & Beutler, B. (2010) Plant and Animal Sensors of Conserved Microbial Signatures. *Science*, **330**, 1061-1064.

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 Physiol*, **134**, 1017-1026.

Ryu, C.-M., Farag, M.A., Hu, C.-H., Reddy, M.S., Wei, H.-X., Paré, P.W. & Kloepper, J.W. (2003) Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 4927-4932.

-S-

Sarwar, M. & Kremer, R.J. (1995) Enhanced suppression of plant-growth through production of L-tryptophan derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant and Soil*, **172**, 261-269.

Scheu, S. (2003) Effects of earthworms on plant growth: patterns and perspectives: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002. *Pedobiologia*, **47**, 846-856.

Schippers, B., Bakker, A.W. & Bakker, P. (1987) Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **25**, 339-358.

Schroth, M.N. & Hancock, J.G. (1982) Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*, **216**, 1376-1381.

Segarra, S., Mir, R., Martinez, C. & Leon, J. (2010) Genome-wide analyses of the transcriptomes of salicylic acid-deficient versus wild-type plants uncover Pathogen and Circadian Controlled 1 (PCC1) as a regulator of flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.*, **33**, 11-22.

Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A. & De Bolle, M.F.C. (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.*, **46**, 941-950.

- Shipitalo, M.J. & Le Bayon, R.C.** (2004) Quantifying the effects of earthworms on soil aggregation and porosity. In Edwards, C.A. (ed) *Earthworm ecology*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 183-200.
- Shipitalo, M.J. & Protz, R.** (1988) Factors influencing the dispersibility of clay in worm casts. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **52**, 764-769.
- Shipitalo, M.J. & Protz, R.** (1989) Chemistry and micromorphology of aggregation in earthworm casts. *Geoderma*, **45**, 357-374.
- Shuster, W.D., Subler, S. & McCoy, E.L.** (2002) The influence of earthworm community structure on the distribution and movement of solutes in a chisel-tilled soil. *Appl. Soil Ecol.*, **21**, 159-167.
- Sims, R.W., Gerard, B.M., London, L.S.o., Estuarine & Association, B.-W.S.** (1985) *Earthworms: Keys and Notes for the Identification and Study of the Species*. Linnean Society of London and the Estuarine and Brackish-Water Sciences Association.
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S. & Denef, K.** (2004) A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research*, **79**, 7-31.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R.** (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**, 425-448.
- Stepanova, A.N., Yun, J., Likhacheva, A.V. & Alonso, J.M.** (2007) Multilevel Interactions between Ethylene and Auxin in Arabidopsis Roots. *The Plant Cell Online*, **19**, 2169-2185.
- Stephens, P.M. & Davoren, C.W.** (1995) Effect of the lumbricid earthworm *Aporrectodea trapezoides* on wheat grain yield in the field, in the presence or absence of *Rhizoctonia solani* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Soil Biol. Biochem.*, **28**, 561-567.
- Stephens, P.M. & Davoren, C.W.** (1997) Influence of the earthworms *Aporrectodea trapezoides* and *A. rosea* on the disease severity of *Rhizoctonia solani* on subterranean clover and ryegrass. *Soil Biol. Biochem.*, **29**, 511-516.
- Stephens, P.M., Davoren, C.W., Doube, B.M. & Ryder, M.H.** (1994) Ability of the lumbricid earthworms *Aporrectodea rosea* and *Aporrectodea trapezoides* to reduce the

- severity of take-all under greenhouse and field conditions. *Soil Biol. Biochem.*, **26**, 1291-1297.
- Stephens, P.M., Davoren, C.W., Doube, B.M., Ryder, M.H., Bengner, A.M. & Neate, S.M.** (1993) Reduced severity of rhizoctonia solani disease on wheat seedlings associated with the presence of the earthworm *aporrrectodea trapezoides* (lumbriidae). *Soil Biol. Biochem.*, **25**, 1477-1484.
- Stotz, H.U., Jikumaru, Y., Shimada, Y., Sasaki, E., Stingl, N., Mueller, M.J. & Kamiya, Y.** (2011) Jasmonate-Dependent and COI1-Independent Defense Responses Against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*: Auxin is Part of COI1-Independent Defense Signaling. *Plant Cell Physiol.*, **52**, 1941-1956.
- Surette, M.A., Sturz, A.V., Lada, R.R. & Nowak, J.** (2003) Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and Soil*, **253**, 381-390.
- Suslow, T.V. & Schroth, M.N.** (1982) Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology*, **72**, 111-115.
- Swarup, R., Kargul, J., Marchant, A., Zadik, D., Rahman, A., Mills, R., Yemm, A., May, S., Williams, L., Millner, P., Tsurumi, S., Moore, I., Napier, R., Kerr, I.D. & Bennett, M.J.** (2004) Structure-function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease AUX1. *Plant Cell*, **16**, 3069-3083.
- Syers, J.K., Sharpley, A.N. & Keeney, D.R.** (1979) Cycling of nitrogen by surface-casting earthworms in a pasture ecosystem. *Soil Biol. Biochem.*, **11**, 181-185.

-T-

- Taiz, L. & Zeiger, E.** (2010) *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Incorporated.
- Team, R.D.C.** (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Temme, N. & Tudzynski, P.** (2009) Does *Botrytis cinerea* Ignore H₂O₂-Induced Oxidative Stress During Infection? Characterization of *Botrytis* Activator Protein 1. *Mol. Plant Microbe In.*, **22**, 987-998.

- Teplitski, M., Robinson, J.B. & Bauer, W.D.** (2000) Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviour in associated bacteria. *Mol Plant–Microbe Interact*, **13**, 637–648.
- Thatcher, L.F., Manners, J.M. & Kazan, K.** (2009) *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **58**, 927-939.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A. & Broekaert, W.F.** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 15107-15111.
- Tiwari, S.C., Tiwari, B.K. & Mishra, R.R.** (1989) Microbial populations, enzyme activities and nitrogen-phosphorus-potassium enrichment in earthworm casts and in the surrounding soil of a pineapple plantation. *Biol. Fertil. Soils*, **8**, 178-182.
- Tomati, U., Grappelli, A. & Galli, E.** (1988) The hormone-like effect of earthworm casts on plant growth. *Biol. Fertil. Soils*, **5**, 288-294.
- Torres, M.A., Dangl, J.L. & Jones, J.D.G.** (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 517-522.
- Trevisan, S., Botton, A., Vaccaro, S., Vezzaro, A., Quaggiotti, S. & Nardi, S.** (2011) Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Env. Exp. Bot.*, **74**, 45-55.
- Troxler, J., Svercel, M., Natsch, A., Zala, M., Keel, C., Moënné-Loccoz, Y. & Défago, G.** (2012) Persistence of a biocontrol *Pseudomonas* inoculant as high populations of culturable and non-culturable cells in 200-cm-deep soil profiles. *Soil Biol. Biochem.*, **44**, 122-129.
- Truman, W.M., Bennett, M.H., Turnbull, C.G.N. & Grant, M.R.** (2010) Arabidopsis auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. *Plant Physiol*, **152**, 1562–1573.

Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A., Botina, S.G. & Netrusov, A.I. (2007) Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol. Res.*, **162**, 69-76.

-V-

van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. & Pieterse, C.M.J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **36**, 453-483.

van Loon, L.C., Geraats, B.P.J. & Linthorst, H.J.M. (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.*, **11**, 184-191.

van Wees, S.C., van der Ent, S. & Pieterse, C.M. (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **11**, 443-448.

van Wees, S.C.M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L.C. & Pieterse, C.M.J. (1999) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol. Biol.*, **41**, 537-549.

Varet, A., Hause, B., Hause, G., Scheel, D. & Lee, J. (2003) The *Arabidopsis* *NHL3* gene encodes a plasma membrane protein and its overexpression correlates with increased resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Plant Physiol.*, **132**, 2023-2033.

Verhagen, B.W.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.-S., van Loon, L.C. & Pieterse, C.M.J. (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe In.*, **17**, 895-908.

von Bodman, S.B., Bauer, W.D. & Coplin, D.L. (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **41**, 455-482.

-W-

- Wang, Y., Ohara, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y. & Mayama, S.** (2005) Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe In.*, **18**, 385-396.
- Weiss, D. & Ori, N.** (2007) Mechanisms of Cross Talk between Gibberellin and Other Hormones. *Plant Physiol*, **144**, 1240-1246.
- Wi, S.J., Ji, N.R. & Park, K.Y.** (2012) Synergistic Biosynthesis of Biphasic Ethylene and Reactive Oxygen Species in Response to Hemibiotrophic *Phytophthora parasitica* in Tobacco Plants. *Plant Physiol*, **159**, 251-265.
- Wilkinson, S., Kudoyarova, G.R., Veselov, D.S., Arkhipova, T.N. & Davies, W.J.** (2012) Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *J. Exp. Bot.*, **63**, 3499-3509.
- Williams, P.** (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, **153**, 3923-3938.
- Wolfarth, F., Schrader, S., Oldenburg, E., Weinert, J. & Brunotte, J.** (2011) Earthworms promote the reduction of *Fusarium* biomass and deoxynivalenol content in wheat straw under field conditions. *Soil Biol. Biochem.*, **43**, 1858-1865.
- Wu, F., Wan, Judy Hon C., Wu, S. & Wong, M.** (2012) Effects of earthworms and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on availability of nitrogen, phosphorus, and potassium in soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, **175**, 423-433.
- Wurst, S.** (2010) Effects of earthworms on above- and belowground herbivores. *Appl. Soil Ecol.*, **45**, 123-130.
- X-**
- Xie, H., Pasternak, J.J. & Glick, B.R.** (1996) Isolation and characterization of mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic-acid. *Curr. Microbiol.*, **32**, 67-71.

Xu, X.P., Chen, C.H., Fan, B.F. & Chen, Z.X. (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell*, **18**, 1310-1326.

-Z-

Zaller, J.G. (2007) Vermicompost in seedling potting media can affect germination, biomass allocation, yields and fruit quality of three tomato varieties. *Eur J Soil Biol*, **43**, S332-S336.

Zarea, M.J., Ghalavand, A., Goltapeh, E.M., Rejali, F. & Zamaniyan, M. (2009) Effects of mixed cropping, earthworms (*Pheretima* sp.), and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus mosseae*) on plant yield, mycorrhizal colonization rate, soil microbial biomass, and nitrogenase activity of free-living rhizosphere bacteria. *Pedobiologia*, **52**, 223-235.

Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P.W. & Forde, B.G. (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 6529-6534.

Zhang, H., Kim, M.-S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M., Ryu, C.-M., Allen, R., Melo, I. & Paré, P. (2007a) Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in Arabidopsis. *Planta*, **226**, 839-851.

Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P.E., Wang, M., Zhu, Y. & He, Z. (2007b) Dual Regulation Role of GH3.5 in Salicylic Acid and Auxin Signaling during Arabidopsis-Pseudomonas syringae Interaction. *Plant Physiol.*, **145**, 450-464.

Zheng, Z., Qamar, S.A., Chen, Z. & Mengiste, T. (2006) Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, **48**, 592-605.

Annexes

**Annexe 1 : Tableau supplémentaire 1 de la publication du
Chapitre 4 :**

Take-all disease involves hypersensitive response and hormonal control of wheat by the pathogenic fungus *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, which can be depleted in the presence of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*

Supplementary table 1. List of the genes of *Triticum aestivum* differentially expressed in the presence/absence of the pathogen *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in comparison to control treatment (Ggt vs C).

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
Up-regulated genes				
<i>Oxidation reduction (16.45%)</i>				
Monothiol glutaredoxin-S2	Ta.60367	At5g18600	57.39	2.65E-03
Laccase-17	Ta.4048	At5g60020	32.02	4.03E-02
Laccase-5	Ta.47228	At2g40370	25.28	1.03E-02
Probable rhamnose biosynthetic enzyme 1	Ta.25823	At1g78570	22.60	1.73E-02
Peroxidase 3	Ta.14580	At1g05260	21.54	3.94E-03
At2g37790	Ta.332	At2g37790	18.97	4.69E-02
Ferredoxin-1	Ta.8020	At1g10960	18.59	3.00E-02
Temperature-sensitive omega-3 fatty acid desaturase	Ta.701	At5g05580	16.21	2.38E-03
At1g02205	Ta.10382	At1g02205	16.15	4.03E-03
Cytochrome P450 84A1	Ta.55317	At2g34770	15.71	9.86E-03
Peroxidase 67	Ta.38418	At5g58390	14.28	1.48E-02
Peroxidase 52	Ta.54713	At5g05340	10.88	3.77E-02
12-oxophytodienoate reductase 1	Ta.9073	At1g76680	9.86	2.31E-02
Peroxidase 12	Ta.13307	At1g71695	9.36	2.95E-03
At3g61880	Ta.15927	At3g61880	9.16	1.81E-02
At5g32450	Ta.9074	At5g32450	8.29	7.76E-03
At5g24530	Ta.20360	At5g24530	8.01	1.95E-02
Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1	Ta.44854	At5g04140	7.26	2.75E-02
Probable polyamine oxidase 4	Ta.8976	At1g65840	6.70	1.90E-02
Putative basic blue protein	Ta.55458	At2g02850	6.65	2.52E-03
At5g23990	Ta.10673	At5g23990	6.52	1.39E-03
Leucoanthocyanidin reductase	Ta.40162	At1g61720	6.11	6.21E-03
At4g20760	Ta.20522	At4g20760	6.04	3.23E-02
Flavonoid 3'-monooxygenase	Ta.8802	At5g07990	5.78	9.95E-03
Catalase-3	Ta.27917	At5g36940	5.47	1.72E-02
At1g24470	Ta.12277	At1g24470	5.26	3.05E-02
At2g46960	Ta.57301	At2g46960	4.92	1.50E-02
At2g29290	Ta.22286	At2g29290	4.91	3.53E-02
At5g14760	Ta.48645	At5g14760	4.89	9.60E-03
At4g14890	Ta.19705	At4g14890	4.89	2.36E-02
Putative dihydrodipicolinate reductase 3	Ta.33315	At5g52100	4.88	2.92E-02
Ribulose biphosphate carboxylase small chain 1A	Ta.447	At1g67090	4.87	2.17E-02
Peroxidase 63	Ta.4713	At5g40150	4.86	6.59E-03
Laccase-7	Ta.31798	At3g09220	4.76	4.53E-04
At5g50600	Ta.6892	At5g50600	4.74	4.52E-02
At2g38240	Ta.25763	At2g38240	4.01	2.36E-03
At3g58670	Ta.31850	At3g58670	3.81	3.82E-02
Peroxidase 16	Ta.24255	At2g18980	3.75	3.16E-04

Supplementary table 1. Continued from preceding page

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
Glutamyl-tRNA reductase 1	Ta.55653	At1g58290	3.70	3.72E-03
Glutamate dehydrogenase 1	Ta.5091	At5g18170	3.61	6.30E-03
At4g39330	Ta.24122	At4g39330	3.61	2.09E-02
At1g66540	Ta.56402	At1g66540	3.56	3.47E-03
Protoporphyrinogen oxidase	Ta.5948	At4g01690	3.49	3.64E-02
Gibberellin 20 oxidase 1	Ta.48793	At4g25420	3.44	1.01E-02
Alcohol dehydrogenase-like 6	Ta.1744	At5g24760	3.39	6.65E-03
Cytokinin dehydrogenase 7	Ta.4850	At5g21482	3.32	4.50E-02
Putative L-ascorbate peroxidase 4	Ta.488	At4g09010	3.21	4.97E-02
At1g65560	Ta.32602	At1g65560	3.20	2.17E-02
Respiratory burst oxidase homolog protein F	Ta.7051	At1g64060	3.10	3.78E-03
Uncharacterized protein At4g01050	Ta.22819	At4g01050	3.06	2.77E-02
Response to abiotic stimulus and defense response (15.13 %)				
Germin-like protein subfamily 3 member 3	Ta.30673	At5g20630	185.52	2.42E-02
Expansin-A1	Ta.54937	At1g69530	116.72	3.07E-04
Germin-like protein subfamily 2 member 1	Ta.7885	At1g09560	45.80	5.22E-03
Glutathione S-transferase ERD13	Ta.22191	At2g30870	33.74	1.83E-02
ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 5	Ta.29834	At1g45249	16.86	3.75E-02
Dehydration-responsive element-binding protein 1C	Ta.67273	At4g25470	12.00	3.26E-02
Alpha	Ta.48678	At1g78580	8.55	7.53E-03
Rac-like GTP-binding protein ARAC7	Ta.7476	At4g28950	8.26	3.74E-02
At3g20470	Ta.24667	At3g20470	8.25	3.98E-03
Aquaporin PIP2-1	Ta.48798	At3g53420	7.28	3.25E-02
Uncharacterized protein At5g02240	Ta.33427	At5g02240	7.04	6.06E-04
Glutathione synthetase	Ta.41136	At5g27380	6.88	1.01E-02
At5g04590	Ta.19092	At5g04590	6.49	4.98E-03
Probable calcium-binding protein CML25	Ta.13803	At1g24620	6.42	3.61E-03
Phosphopantetheine adenylyltransferase	Ta.32581	At2g18250	6.30	1.71E-02
Vesicle transport v-SNARE 11	Ta.22789	At5g39510	6.21	5.94E-03
At4g08950	Ta.11836	At4g08950	6.00	2.32E-03
3-ketoacyl-CoA synthase 17	Ta.4398	At1g04220	5.70	8.96E-03
At3g55990	Ta.27021	At3g55990	5.22	3.10E-02
3-ketoacyl-CoA synthase 1	Ta.38008	At1g01120	5.12	9.10E-03
Chalcone synthase	Ta.55798	At5g13930	5.09	2.25E-03
MLO-like protein 12	Ta.280	At2g39200	5.05	3.75E-02
Auxin transporter protein 1	Ta.49842	At2g38120	4.76	4.24E-03
At5g57170	Ta.40496	At5g57170	4.61	7.42E-03
3-ketoacyl-CoA synthase 19	Ta.20041	At5g43760	4.60	1.81E-02
Acyl carrier protein	Ta.38188	At4g25050	4.52	2.11E-02
Maltose excess protein 1	Ta.5092	At5g17520	4.32	9.81E-03
LOB domain-containing protein 40	Ta.34590	At1g67100	4.18	3.44E-02

Supplementary table 1. Continued from preceding page

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
Multiprotein-bridging factor 1c	Ta.12225	At3g24500	4.13	5.11E-03
Tubulin beta-6 chain	Ta.55336	At5g12250	3.95	3.67E-03
Nitrate/chlorate transporter	Ta.21127	At1g12110	3.95	1.42E-02
At3g54890	Ta.58292	At3g54890	3.74	2.37E-02
Beta-amylase	Ta.3983	At5g65700	3.68	1.77E-03
Putative glucan endo-1	Ta.48826	At2g27500	3.62	3.82E-02
Carbonic anhydrase 2	Ta.54374	At5g14740	3.58	3.36E-03
At2g26740	Ta.33182	At2g26740	3.56	1.68E-03
Cellulose synthase A catalytic subunit 1 [UDP-forming]	Ta.54424	At4g32410	3.49	4.30E-02
Glutamate receptor 3.4	Ta.45975	At1g05200	3.34	3.56E-02
At3g60750	Ta.53918	At3g60750	3.30	4.06E-03
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	Ta.49788	At5g17920	3.29	3.52E-02
At5g20270	Ta.36946	At5g20270	3.16	2.76E-02
Root phototropism protein 2	Ta.21258	At2g30520	3.15	2.90E-02
At1g67280	Ta.28068	At1g67280	3.10	2.23E-02
Transcription factor AS1	Ta.37433	At2g37630	3.09	3.17E-02
At4g35920	Ta.28022	At4g35920	3.06	3.25E-02
Actin-depolymerizing factor 4	Ta.5577	At5g59890	3.00	3.56E-03
<i>Proteolysis (5.92 %)</i>				
At4g15160	Ta.42424 /// Ta.58575	At4g15160	497.06	7.92E-04
At3g54400	Ta.21787	At3g54400	69.05	1.36E-02
Serine carboxypeptidase-like 11	Ta.42224	At2g22970	57.69	4.33E-03
Metacaspase-1	Ta.57077	At1g02170	57.19	5.27E-03
At4g10550	Ta.408	At4g10550	12.10	4.41E-03
Serine carboxypeptidase-like 27	Ta.40327	At3g07990	10.73	6.36E-03
Xylem cysteine proteinase 1	Ta.55562	At4g35350	9.10	5.80E-03
Serine carboxypeptidase-like 26	Ta.53984	At2g35780	7.60	3.47E-03
At2g04160	Ta.46799	At2g04160	6.65	6.56E-03
Serine carboxypeptidase-like 34	Ta.8076	At5g23210	4.94	1.16E-02
At1g35340	Ta.43429	At1g35340	4.06	1.20E-02
At5g10770	Ta.25381	At5g10770	4.04	5.85E-03
At2g45270	Ta.56775	At2g45270	3.71	1.67E-02
Serine carboxypeptidase-like 49	Ta.54265	At3g10410	3.41	3.64E-02
Methionine aminopeptidase 1D	Ta.44814	At4g37040	3.17	1.78E-02
Serine carboxypeptidase-like 5	Ta.25320	At1g73290	3.07	3.91E-03
At3g26085	Ta.537	At3g26085	3.04	4.58E-02
At4g17740	Ta.23662	At4g17740	3.01	2.75E-02

Supplementary table 1. Continued from preceding page

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
<i>Metabolism (30.92%)</i>				
At1g65870	Ta.25384	At1g65870	144.61	4.07E-03
At5g64570	Ta.18225	At5g64570	29.99	2.03E-02
At3g57030	Ta.32597	At3g57030	28.20	2.88E-03
Beta-amylase	Ta.137	At4g15210	24.91	4.18E-03
Tubulin beta-4 chain	Ta.3723	At5g44340	24.68	9.55E-03
At2g33590	Ta.9686	At2g33590	21.08	1.02E-02
At3g53620	Ta.54569	At3g53620	18.23	1.94E-02
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1	Ta.66570	At1g06520	17.53	7.32E-03
Quercetin 3-O-methyltransferase 1	Ta.4350 /// Ta.67275	At5g54160	17.45	1.47E-02
Probable glycerophosphoryl diester phosphodiesterase 1	Ta.25428	At5g55480	17.13	4.69E-02
Probable inactive receptor kinase At1g48480	Ta.18480	At1g48480	15.18	1.59E-02
GDSL esterase/lipase At5g45910	Ta.47129	At5g45910	14.10	2.91E-02
Histone H2B.11	Ta.54247	At5g59910	12.45	4.95E-03
At2g42960	Ta.11367	At2g42960	11.43	3.00E-02
At5g41040	Ta.30226	At5g41040	11.23	2.66E-02
Serine/threonine-protein kinase Nek5	Ta.18537	At3g44200	11.08	3.19E-02
Nicotianamine synthase 3	Ta.37977	At1g09240	10.02	1.92E-02
Anthocyanin 5-O-glucosyltransferase	Ta.14645	At4g14090	9.88	2.86E-02
Putative clathrin assembly protein At2g01600	Ta.10702	At2g01600	9.81	3.97E-02
GDSL esterase/lipase EXL1	Ta.9046	At1g75880	9.30	1.58E-02
At5g37180	Ta.45463	At5g37180	9.18	2.48E-04
Endoglucanase 8	Ta.10331	At1g70710	9.16	4.22E-02
Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 32	Ta.32123	At2g36870	8.68	1.78E-03
At5g47435	Ta.50678	At5g47435	8.49	2.51E-02
Ribonuclease 1	Ta.55477	At2g02990	8.14	3.64E-02
Acidic endochitinase	Ta.8271	At5g24090	7.53	1.69E-02
Phospholipase D alpha 2	Ta.17890	At1g52570	7.46	1.93E-03
Tubulin alpha-3/alpha-5 chain	Ta.52479	At5g19770	7.37	2.97E-02
GDSL esterase/lipase LIP-4	Ta.39282	At1g56670	6.56	8.35E-04
Wall-associated receptor kinase-like 14	Ta.47029	At2g23450	6.51	7.67E-03
Probable protein phosphatase 2C 22	Ta.10098	At2g25620	6.47	2.89E-03
At2g25220	Ta.10233	At2g25220	6.33	3.55E-02
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	Ta.17243	At4g11820	6.16	7.38E-03
At2g38650	Ta.19569	At2g38650	6.00	3.27E-02
Probable inactive receptor kinase At2g26730	Ta.67957	At2g26730	5.99	2.04E-02
GDSL esterase/lipase At1g09390	Ta.8094	At1g09390	5.90	1.42E-02
At1g23360	Ta.8003	At1g23360	5.73	2.89E-02
Uroporphyrinogen decarboxylase 1	Ta.498	At3g14930	5.61	2.74E-02
Histone H3.2	Ta.8296	At3g27360	5.49	9.68E-04
At2g46860	Ta.55123	At2g46860	5.48	6.69E-03
24-methylenesterol C-methyltransferase 2	Ta.10402	At1g20330	5.48	2.01E-04

Supplementary table 1. Continued from preceding page

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
At1g30520	Ta.39480	At1g30520	5.45	2.75E-02
At4g00960	Ta.23296	At4g00960	5.19	2.61E-02
At3g14110	Ta.37190	At3g14110	5.18	7.49E-03
At2g47240	Ta.55894	At2g47240	5.04	9.58E-03
N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	Ta.27412	At1g07780	4.95	3.31E-03
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 5	Ta.17342	At3g11430	4.52	4.39E-02
GDSL esterase/lipase At1g28670	Ta.5035	At1g28670	4.49	3.09E-02
Pyruvate kinase	Ta.55666	At1g32440	4.48	6.87E-03
Putative glycosyltransferase 2	Ta.14249	At4g02500	4.36	2.08E-02
At5g38250	Ta.48353	At5g38250	4.36	1.40E-02
Phytosulfokine receptor 1	Ta.36197	At2g02220	4.36	4.64E-03
Putative clathrin assembly protein At5g35200	Ta.10500	At5g35200	4.24	7.59E-04
At2g48010	Ta.50575	At2g48010	4.10	5.47E-03
At3g59110	Ta.36439	At3g59110	4.08	3.11E-02
At5g52110	Ta.57507	At5g52110	3.92	1.41E-02
At3g55360	Ta.28682	At3g55360	3.84	5.02E-03
At3g62760	Ta.24150	At3g62760	3.82	9.79E-03
Shikimate kinase	Ta.8618	At2g21940	3.82	4.23E-02
At1g61590	Ta.30723	At1g61590	3.78	2.46E-02
At3g18660	Ta.46082	At3g18660	3.76	3.92E-02
At3g23470	Ta.7943	At3g23470	3.75	1.99E-02
At1g27440	Ta.54746	At1g27440	3.71	1.43E-02
At2g37090	Ta.39318	At2g37090	3.68	3.22E-02
Probable FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 4	Ta.67990	At4g39710	3.64	1.26E-02
Probable 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	Ta.48340	At4g15560	3.64	1.26E-02
Cellulose synthase A catalytic subunit 7 [UDP-forming]	Ta.48845	At5g17420	3.60	2.99E-02
Probable alpha	Ta.30416	At1g06410	3.56	2.75E-04
Aspartokinase 3	Ta.48650	At3g02020	3.51	7.27E-03
Probable inactive receptor kinase At5g10020	Ta.1441	At5g10020	3.50	3.78E-02
At3g25585	Ta.37441	At3g25585	3.47	8.54E-03
Arogenate dehydratase/prephenate dehydratase 2	Ta.38877	At3g07630	3.45	3.24E-02
Calcium-dependent protein kinase 7	Ta.4580	At5g12480	3.43	1.31E-02
Histone H2A	Ta.54850	At4g27230	3.41	4.16E-02
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP37	Ta.32292	At3g15520	3.41	2.06E-02
Mitogen-activated protein kinase 20	Ta.25413	At2g42880	3.39	1.17E-02
At5g38710	Ta.3696	At5g38710	3.35	1.01E-02
At3g10670	Ta.5630	At3g10670	3.34	4.27E-04
CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 4	Ta.39499	At4g14580	3.34	4.18E-02
At1g14000	Ta.30049	At1g14000	3.32	7.67E-04
At5g24080	Ta.41843	At5g24080	3.31	4.83E-02
3-ketoacyl-CoA thiolase 2	Ta.22683	At2g33150	3.31	2.88E-03
At1g63000	Ta.35121	At1g63000	3.24	4.80E-02

Supplementary table 1. Continued from preceding page

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
At3g47650	Ta.3171	At3g47650	3.20	1.75E-02
Probable FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 7	Ta.37200	At5g13410	3.15	2.49E-02
At5g54590	Ta.11795	At5g54590	3.12	4.47E-03
At1g75690	Ta.55358	At1g75690	3.11	2.03E-02
At5g44520	Ta.10715	At5g44520	3.10	3.74E-02
Triacylglycerol lipase 2	Ta.57335	At5g14180	3.08	3.39E-02
At3g53180	Ta.9416	At3g53180	3.08	2.42E-02
Wall-associated receptor kinase 2	Ta.51527	At1g21270	3.07	1.37E-02
At4g25080	Ta.25436	At4g25080	3.06	4.82E-03
Basic endochitinase B	Ta.54078	At3g12500	3.04	8.85E-03
At2g17530	Ta.45528	At2g17530	3.04	3.32E-02
Transcription / translation (11.84%)				
At4g39250	Ta.49215	At4g39250	67.95	7.65E-05
At2g21650	Ta.4022	At2g21650	34.36	2.49E-03
NAC domain-containing protein 102	Ta.45251	At5g63790	18.15	5.05E-03
At5g46910	Ta.33469	At5g46910	11.74	7.74E-03
50S ribosomal protein L12-3	Ta.35314	At3g27850	9.68	7.13E-03
Scarecrow-like protein 6	Ta.18627	At4g00150	7.88	1.86E-04
At1g71930	Ta.38484	At1g71930	7.11	2.18E-04
At2g01060	Ta.39746	At2g01060	7.05	4.46E-02
Transcription factor bHLH81	Ta.16792	At4g09180	5.86	1.43E-03
Transcription factor bHLH137	Ta.3446	At5g50915	5.42	4.89E-02
At2g02740	Ta.35853	At2g02740	5.42	1.82E-02
Auxin-responsive protein IAA3	Ta.41052	At1g04240	5.02	2.05E-02
50S ribosomal protein L4	Ta.18148	At1g07320	4.92	7.42E-03
At4g28500	Ta.8999	At4g28500	4.76	9.86E-03
At3g08740	Ta.18149	At3g08740	4.69	1.92E-02
50S ribosomal protein L18	Ta.1452	At1g48350	4.48	5.23E-03
50S ribosomal protein L9	Ta.14183	At3g44890	4.17	1.36E-02
Ethylene-responsive transcription factor RAP2-7	Ta.24445	At2g28550	3.82	3.89E-02
Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3	Ta.27144	At3g16770	3.81	4.01E-02
Peptide deformylase 1A	Ta.48455	At1g15390	3.75	2.56E-02
At4g27270	Ta.55650	At4g27270	3.73	3.09E-02
50S ribosomal protein L28	Ta.37223	At2g33450	3.70	6.58E-03
Transcription factor bHLH80	Ta.40553	At1g35460	3.61	4.41E-04
Nuclear transcription factor Y subunit B-2	Ta.49807	At5g47640	3.40	3.13E-03
50S ribosomal protein L24	Ta.55532	At5g54600	3.36	9.84E-03
Transcription factor bHLH49	Ta.25394	At1g68920	3.33	2.14E-02
50S ribosomal protein L11	Ta.12746	At1g32990	3.32	1.54E-02
30S ribosomal protein S31	Ta.9419	At2g38140	3.29	1.67E-02
30S ribosomal protein S17	Ta.13258	At1g79850	3.27	1.65E-02
Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 16	Ta.36576	At1g25440	3.11	9.17E-03

Supplementary table 1. Continued from preceding page

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
Peptidyl-tRNA hydrolase	Ta.30586	At1g18440	3.11	8.86E-03
At5g56840	Ta.8661	At5g56840	3.09	2.20E-02
30S ribosomal protein S9	Ta.621	At1g74970	3.07	9.66E-03
Ribosome-recycling factor	Ta.7780	At3g63190	3.02	2.23E-02
30S ribosomal protein S13	Ta.9666	At5g14320	3.01	3.79E-02
30S ribosomal protein S10	Ta.54494	At3g13120	3.00	1.41E-02
Unclassified / unknown functions (19.74%)				
Expansin-B4	Ta.48590	At2g45110	163.86	4.50E-03
At2g39890	Ta.37294	At2g39890	144.82	1.24E-04
Pectinesterase/pectinesterase inhibitor 3	Ta.32661	At3g14310	139.22	1.68E-02
At1g12090	Ta.58580	At1g12090	63.71	1.79E-02
Putative expansin-B2	Ta.10186 /// Ta.57929	At1g65680	58.13	6.22E-03
At2g45180	Ta.60521	At2g45180	44.60	2.87E-03
At5g18280	Ta.8298	At5g18280	27.98	3.16E-02
Non-symbiotic hemoglobin 1	Ta.12893	At2g16060	24.91	1.21E-02
Putative vesicle-associated membrane protein 726	Ta.48162	At1g04760	21.06	3.47E-02
Peptide transporter PTR2	Ta.1231	At2g02040	15.71	2.95E-02
At1g76550	Ta.46806	At1g76550	15.25	1.05E-03
At5g63530	Ta.50473	At5g63530	14.63	1.94E-02
Protein tyrosine phosphatase-like protein PASTICCINO 2	Ta.4141	At5g10480	11.70	8.76E-04
At5g49630	Ta.34645	At5g49630	11.68	7.88E-03
At4g24350	Ta.1617	At4g24350	11.57	6.35E-06
At4g14680	Ta.47512	At4g14680	10.87	1.12E-03
Sugar transport protein 1	Ta.34809	At1g11260	10.70	8.51E-03
At5g28646	Ta.55575	At5g28646	10.44	4.94E-02
At3g48140	Ta.55927	At3g48140	9.95	6.21E-04
Putative fructokinase-5	Ta.47677	At4g10260	9.22	3.42E-03
Fasciclin-like arabinogalactan protein 16	Ta.1839	At2g35860	9.07	1.95E-02
At1g77380	Ta.37918	At1g77380	9.02	3.94E-04
At5g50200	Ta.5174	At5g50200	7.25	1.81E-02
At1g32540	Ta.6594	At1g32540	6.76	6.22E-03
Boron transporter 1	Ta.5402	At2g47160	6.61	1.01E-02
At3g22600	Ta.7847	At3g22600	5.67	1.72E-02
At1g11190	Ta.26286	At1g11190	5.50	5.58E-03
Probable beta-1	Ta.11241	At1g05170	5.37	4.19E-02
At5g08030	Ta.5569	At5g08030	5.27	3.59E-02
Probable xyloglucan glycosyltransferase 12	Ta.41750	At4g07960	4.83	1.75E-02
Protein PINHEAD	Ta.6427	At5g43810	4.81	3.31E-02
Probable purine permease 11	Ta.6159	At1g44750	4.50	7.05E-03
At5g54780	Ta.10379	At5g54780	4.43	1.47E-02
At2g34420	Ta.46841	At2g34420	4.26	5.04E-03

Supplementary table 1. Continued from preceding page

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
At1g45474	Ta.40115	At1g45474	4.20	2.30E-02
Photosystem II reaction center PSB28 protein	Ta.8061	At4g28660	4.18	3.03E-02
At5g23760	Ta.11432	At5g23760	4.14	1.20E-02
Phosphoglycerate mutase	Ta.46512	At1g22170	4.13	4.97E-02
At5g14910	Ta.1381	At5g14910	3.95	7.09E-03
Secretory carrier-associated membrane protein 4	Ta.22618	At1g32050	3.94	4.61E-02
At4g05190	Ta.7152	At4g05190	3.85	4.54E-02
Profilin-4	Ta.28801	At2g19770	3.85	2.83E-02
Putative phosphate transporter 1	Ta.1006	At3g23430	3.82	3.35E-03
At4g25640	Ta.38042	At4g25640	3.75	4.04E-03
Formin-like protein 1	Ta.40227	At3g25500	3.54	3.06E-02
At1g14150	Ta.32603	At1g14150	3.47	3.15E-02
Oligopeptide transporter 4	Ta.8599	At5g64410	3.46	2.40E-03
At1g51340	Ta.45537	At1g51340	3.41	5.27E-03
At5g62680	Ta.33217	At5g62680	3.39	2.70E-02
PsbP-like protein 1	Ta.17009	At3g55330	3.37	8.70E-03
GDP-mannose 3	Ta.54342	At5g28840	3.26	2.79E-04
Sugar transporter ERD6-like 4	Ta.42153	At1g19450	3.26	4.91E-03
At1g68290	Ta.39961	At1g68290	3.22	9.72E-03
Nudix hydrolase 2	Ta.11685	At5g47650	3.22	1.44E-04
Glucan endo-1	Ta.8414	At5g61130	3.22	8.32E-03
At5g53970	Ta.4977	At5g53970	3.20	9.18E-03
At3g05490	Ta.13863	At3g05490	3.19	2.17E-02
At1g01790	Ta.3907	At1g01790	3.06	2.51E-02
Pyridoxal biosynthesis protein PDX2	Ta.6847	At5g60540	3.06	1.89E-03
At3g16910	Ta.47069	At3g16910	3.04	2.07E-02

Down-regulated genes*Oxidation reduction (17.53%)*

Malic enzyme	Ta.5728	At2g19900	-204.60	2.70E-02
At5g50600	Ta.14366	At5g50600	-136.75	6.07E-04
At5g01670	Ta.14516	At5g01670	-54.07	1.60E-02
At3g03080	Ta.55242	At3g03080	-38.36	8.88E-04
At2g19590	Ta.16226	At2g19590	-36.18	2.38E-03
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-2	Ta.29951	At1g24180	-32.31	3.30E-03
At1g02205	Ta.55309	At1g02205	-19.32	5.27E-03
Aldehyde dehydrogenase family 7 member B4	Ta.40235	At1g54100	-18.24	3.62E-03
Alpha-amino adipic semialdehyde synthase	Ta.48369	At4g33150	-15.96	7.90E-03
Thioredoxin-like 1	Ta.15182	At1g08570	-14.02	3.76E-03
Inositol oxygenase 1	Ta.53897	At1g14520	-12.82	1.01E-02
Homogentisate 1	Ta.57082	At5g54080	-12.10	5.76E-03
Cytokinin dehydrogenase 7	Ta.4850	At5g21482	-11.39	2.96E-03

Supplementary table 1. Continued from preceding page

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	Ta.9107	At1g05010	-11.18	2.81E-03
Probable sarcosine oxidase	Ta.28584	At2g24580	-10.06	3.62E-02
Peroxidase 12	Ta.55410	At1g71695	-7.89	2.96E-03
At3g26770	Ta.35751	At3g26770	-7.86	7.15E-04
At4g25310	Ta.16556	At4g25310	-7.75	9.74E-04
Peroxidase 71	Ta.35361	At5g64120	-7.69	2.10E-03
1-Cys peroxiredoxin PER1	Ta.67690	At1g48130	-7.36	4.03E-02
Uricase	Ta.5480	At2g26230	-5.82	4.02E-04
At4g25650	Ta.31507	At4g25650	-5.69	2.01E-02
Catalase-2	Ta.54384	At4g35090	-5.53	2.28E-02
Peroxiredoxin-2E	Ta.6127	At3g52960	-4.96	3.06E-03
Electron transfer flavoprotein subunit alpha	Ta.7134	At1g50940	-4.93	1.07E-02
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 12A1	Ta.54560	At5g62530	-4.46	9.47E-03
Betaine aldehyde dehydrogenase 1	Ta.2585	At1g74920	-4.32	3.59E-03
Electron transfer flavoprotein subunit beta	Ta.5881	At5g43430	-4.05	1.18E-02
At1g17010	Ta.46446	At1g17010	-3.92	2.45E-02
At4g21580	Ta.48735	At4g21580	-3.91	1.24E-02
At2g37770	Ta.10389	At2g37770	-3.86	2.75E-03
At4g39330	Ta.6747	At4g39330	-3.80	1.25E-02
Abscisic-aldehyde oxidase	Ta.6172	At2g27150	-3.78	7.12E-03
Succinate-semialdehyde dehydrogenase	Ta.50488	At1g79440	-3.77	1.71E-02
Probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	Ta.7605	At4g20930	-3.68	9.05E-03
Pyrroline-5-carboxylate reductase	Ta.591	At5g14800	-3.58	4.05E-03
At3g07690	Ta.46244	At3g07690	-3.24	2.68E-02
Respiratory burst oxidase homolog protein B	Ta.43905	At1g09090	-3.23	7.03E-03
At3g22400	Ta.8097	At3g22400	-3.22	1.48E-02
Isovaleryl-CoA dehydrogenase	Ta.27596	At3g45300	-3.18	1.25E-02
Deoxyhypusine hydroxylase	Ta.2495	At3g58180	-3.15	1.48E-02
At4g34890	Ta.27265	At4g34890	-3.11	3.95E-02
At2g43400	Ta.6971	At2g43400	-3.08	3.38E-02
Lipoxygenase 1	Ta.54661	At1g55020	-3.04	2.88E-02

Response to abiotic stimulus and defense response (19.52%)

Dehydrin Xero 1	Ta.2704	At3g50980	-223.96	6.96E-05
Transcription repressor MYB4	Ta.48459	At4g38620	-123.65	6.00E-03
At3g60750	Ta.5904	At3g60750	-69.40	2.30E-03
Putative desiccation-related protein LEA14	Ta.54408	At1g01470	-69.18	1.01E-03
Dehydrin Rab18	Ta.29352	At5g66400	-54.40	1.44E-05
Probable protein phosphatase 2C 78	Ta.60923	At5g59220	-29.95	1.66E-04
At1g17870	Ta.33333	At1g17870	-28.09	4.15E-02
Serine/threonine-protein kinase SRK2C	Ta.2551	At1g78290	-20.59	2.78E-03
Beta-amylase	Ta.4494	At3g23920	-18.03	4.81E-03
At4g25000	Ta.10281	At4g25000	-14.70	1.20E-02

Supplementary table 1. Continued from preceding page

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 1	Ta.1432	At1g09780	-12.65	2.05E-02
At1g54050	Ta.12076	At1g54050	-12.65	3.19E-02
Protein phosphatase 2C 77	Ta.26201	At5g57050	-12.25	2.42E-02
Annexin D1	Ta.54599	At1g35720	-10.60	3.87E-03
Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	Ta.48429	At3g47340	-9.40	2.63E-04
Serine/threonine-protein kinase SRK2E	Ta.5236	At4g33950	-9.40	3.93E-03
Hexokinase-2	Ta.39662	At2g19860	-8.90	1.90E-02
At3g22840	Ta.106	At3g22840	-8.72	5.06E-04
At3g46230	Ta.27661	At3g46230	-8.03	5.35E-03
At3g17800	Ta.28319	At3g17800	-7.42	6.79E-03
At5g46180	Ta.12337	At5g46180	-7.17	1.57E-02
At4g27670	Ta.201	At4g27670	-6.72	8.33E-05
HVA22-like protein d	Ta.57877	At4g24960	-6.51	5.15E-03
Serine/threonine-protein kinase SRK2A	Ta.57483	At1g10940	-6.10	6.32E-03
Heat shock protein 81-1	Ta.55629	At5g52640	-5.87	2.92E-02
At1g52920	Ta.7258	At1g52920	-5.81	7.91E-03
MADS-box protein SOC1	Ta.340	At2g45660	-5.74	1.08E-02
Dehydration-responsive protein RD22	Ta.54067	At5g25610	-5.29	1.43E-02
At1g16970	Ta.43049	At1g16970	-5.22	1.57E-02
Arginase	Ta.25547	At4g08900	-5.13	2.85E-02
Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	Ta.162	At3g48330	-5.11	3.24E-03
RING-H2 finger protein ATL2B	Ta.30884	At2g17730	-4.95	2.99E-02
At1g80680	Ta.31196	At1g80680	-4.87	3.58E-02
At5g40770	Ta.14391	At5g40770	-4.77	2.01E-02
At2g33380	Ta.9830	At2g33380	-4.53	9.23E-03
At2g32120	Ta.33888	At2g32120	-4.05	3.90E-03
COP9 signalosome complex subunit 1	Ta.25874	At3g61140	-3.91	2.56E-02
Cysteine proteinase inhibitor 1	Ta.55164	At5g12140	-3.73	3.38E-02
At1g28330	Ta.53978	At1g28330	-3.56	7.48E-04
Probable gibberellin receptor GID1L3	Ta.5616	At5g27320	-3.45	8.60E-03
Uncharacterized protein At5g10860	Ta.32601	At5g10860	-3.43	2.27E-03
At3g12580	Ta.178	At3g12580	-3.37	3.59E-02
Syntaxin-61	Ta.6548	At1g28490	-3.29	8.37E-03
At1g27320	Ta.8903	At1g27320	-3.22	3.36E-02
Splicing factor U2af small subunit A	Ta.5818	At1g27650	-3.20	3.14E-03
Actin-related protein 4	Ta.6395	At1g18450	-3.17	5.38E-04
At5g58070	Ta.2791	At5g58070	-3.15	3.87E-02
At4g21320	Ta.2822	At4g21320	-3.04	7.25E-03
Heat stress transcription factor A-7a	Ta.32642	At3g51910	-3.02	3.63E-03

Supplementary table 1. Continued from preceding page

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
<i>Proteolysis (4.78 %)</i>				
At3g12700	Ta.19581	At3g12700	-13.54	2.98E-02
Vacuolar-processing enzyme gamma-isozyme	Ta.44230	At4g32940	-9.21	1.37E-02
At5g53540	Ta.6506	At5g53540	-5.09	4.31E-02
At4g17510	Ta.54600	At4g17510	-4.38	1.21E-02
At5g65760	Ta.8093	At5g65760	-4.37	6.50E-03
Coronatine-insensitive protein 1	Ta.8471	At2g39940	-3.99	1.15E-03
At3g57680	Ta.10909	At3g57680	-3.93	3.58E-02
F-box protein PP2-A13	Ta.14513	At3g61060	-3.60	9.24E-03
Vacuolar-processing enzyme beta-isozyme	Ta.14496	At1g62710	-3.42	1.80E-02
Serine carboxypeptidase-like 49	Ta.31965	At3g10410	-3.41	1.65E-02
At4g33090	Ta.5246	At4g33090	-3.16	1.64E-02
SKP1-like protein 4	Ta.38342	At1g20140	-3.15	2.13E-02
<i>Metabolism (21.91 %)</i>				
Probable caffeoyl-CoA O-methyltransferase At4g34050	Ta.39255	At4g34050	-139.97	1.71E-04
At4g22220	Ta.6120	At4g22220	-64.45	7.73E-03
Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 12	Ta.36522	At5g57530	-54.70	4.45E-02
At1g64660	Ta.11526	At1g64660	-53.93	6.84E-03
ATPase 11	Ta.9832	At5g62670	-52.64	3.41E-03
Protein phosphatase 2C 3	Ta.43823	At1g07430	-33.49	1.39E-03
Branched-chain-amino-acid aminotransferase	Ta.39007	At1g10070	-18.51	1.78E-02
Probable protein phosphatase 2C 24	Ta.10207	At2g29380	-18.14	3.54E-02
At4g02280	Ta.11152	At4g02280	-15.58	1.42E-04
Histone H1.1	Ta.54562	At1g06760	-13.63	1.85E-02
At3g43190	Ta.93	At3g43190	-13.48	5.08E-03
Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-3	Ta.54463	At3g17820	-12.19	1.06E-02
Probable glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit	Ta.2797	At2g21590	-10.32	9.55E-04
CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 5	Ta.33482	At5g10930	-9.57	7.28E-05
Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 2	Ta.50525	At1g27680	-9.05	2.93E-03
At4g37070	Ta.34636	At4g37070	-9.00	4.52E-02
GDSL esterase/lipase At3g26430	Ta.5834	At3g26430	-8.34	1.60E-02
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain	Ta.30569	At4g34030	-7.01	1.00E-03
At2g26560	Ta.9588	At2g26560	-6.12	2.17E-02
AMP deaminase	Ta.5150	At2g38280	-5.99	2.08E-02
NADH kinase	Ta.47672	At1g78590	-5.66	4.99E-03
At2g38670	Ta.45795	At2g38670	-5.24	8.60E-03
At3g08943	Ta.6282	At3g08943	-4.92	5.48E-03
At3g46920	Ta.25379	At3g46920	-4.81	3.64E-02
At2g29630	Ta.48442	At2g29630	-4.74	8.45E-03
Probable histone H2AXb	Ta.54675	At1g54690	-4.44	3.92E-02

Supplementary table 1. Continued from preceding page

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
At4g12130	Ta.5840	At4g12130	-4.20	6.78E-03
At3g06850	Ta.12252	At3g06850	-4.09	2.02E-02
Probable protein phosphatase 2C 60	Ta.9362	At4g31860	-4.05	2.14E-03
At3g09010	Ta.6407	At3g09010	-3.94	3.06E-02
At3g12990	Ta.4996	At3g12990	-3.63	1.27E-02
Probable protein phosphatase 2C 22	Ta.50720	At2g25620	-3.57	2.47E-03
Galactokinase	Ta.1938	At3g06580	-3.54	6.53E-03
At1g18800	Ta.1219	At1g18800	-3.52	2.77E-02
At5g37830	Ta.2005	At5g37830	-3.48	1.31E-02
CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 12	Ta.10097	At4g18700	-3.47	3.36E-03
Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 27	Ta.7839	At2g01850	-3.46	2.33E-05
At1g36160	Ta.33534	At1g36160	-3.46	4.70E-02
Sucrose synthase 2	Ta.54398	At1g80070	-3.27	2.16E-02
V-type proton ATPase subunit B2	Ta.9647	At4g38510	-3.27	7.07E-03
Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	Ta.48764	At1g31220	-3.22	1.79E-03
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha	Ta.48602	At1g03090	-3.18	1.01E-02
At1g03520	Ta.36652	At1g03520	-3.16	2.44E-02
At1g18270	Ta.2708	At1g18270	-3.16	2.91E-03
At1g76150	Ta.9392	At1g76150	-3.15	3.01E-04
At3g25570	Ta.9063	At3g25570	-3.05	1.03E-02
At4g29010	Ta.54359	At4g29010	-3.04	1.19E-02
At5g43280	Ta.35136	At5g43280	-3.04	3.79E-02
At3g18680	Ta.36665	At3g18680	-3.00	6.87E-03
At5g58540	Ta.36296	At5g58540	-3.00	1.89E-03

Transcription / translation (14.34 %)

Heat stress transcription factor C-1	Ta.25627	At3g24520	-46.42	6.97E-06
Zinc finger CCCH domain-containing protein 20	Ta.56459 /// Ta.9361	At2g19810	-30.85	1.73E-03
At1g66230	Ta.47066	At1g66230	-19.97	9.09E-04
NAC domain-containing protein 29	Ta.41933	At1g69490	-13.20	2.25E-02
Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-2	Ta.57849	At1g12920	-11.15	3.52E-06
Pre-mRNA-splicing factor SF2	Ta.57609	At1g02840	-10.62	1.15E-03
Agamous-like MADS-box protein AGL12	Ta.26215	At1g71692	-6.27	2.22E-02
Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	Ta.19906	At5g56740	-6.18	3.20E-03
At5g51940	Ta.1797	At5g51940	-5.60	9.67E-05
At5g03530	Ta.56969	At5g03530	-5.34	4.45E-03
Protein arginine N-methyltransferase 5	Ta.35725	At4g31120	-5.17	9.50E-03
At5g56840	Ta.46193	At5g56840	-4.60	5.62E-04
At3g12977	Ta.5127	At3g12977	-4.40	1.69E-02
RNA polymerase II transcriptional coactivator KIWI	Ta.9409	At5g09250	-4.15	8.81E-03
At3g11220	Ta.58427	At3g11220	-4.13	1.07E-02
At4g25340	Ta.9572	At4g25340	-4.13	3.53E-02

Supplementary table 1. Continued from preceding page

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
T-complex protein 1 subunit epsilon	Ta.26074	At1g24510	-4.10	1.98E-02
Chaperone protein dnaJ 3	Ta.54682	At3g44110	-4.05	8.80E-03
At5g14520	Ta.2464	At5g14520	-3.99	4.31E-03
At1g74250	Ta.1471	At1g74250	-3.85	1.72E-02
At4g12750	Ta.33970	At4g12750	-3.76	1.79E-02
DNA-directed RNA polymerase	Ta.31478	At5g60040	-3.73	5.29E-03
tRNA wybutosine-synthesizing protein 2/3/4	Ta.32954	At4g04670	-3.72	1.69E-02
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	Ta.56575	At3g57150	-3.66	3.51E-02
Probable prefoldin subunit 4	Ta.28556	At1g08780	-3.64	1.40E-02
At5g06360	Ta.14408	At5g06360	-3.63	7.41E-03
At5g66540	Ta.27666	At5g66540	-3.63	4.24E-03
NAC domain-containing protein 78	Ta.54707	At5g04410	-3.61	5.59E-04
At1g48920	Ta.39940	At1g48920	-3.60	1.63E-02
At4g27490	Ta.56346	At4g27490	-3.57	1.36E-03
At1g19485	Ta.50639	At1g19485	-3.49	1.33E-02
At3g21540	Ta.33580	At3g21540	-3.45	7.37E-03
At1g29940	Ta.55834	At1g29940	-3.43	4.41E-03
At3g46210	Ta.9596	At3g46210	-3.43	1.88E-02
At1g60080	Ta.8558	At1g60080	-3.40	1.27E-02
At2g24590	Ta.11828	At2g24590	-3.20	1.56E-02
At3g49080	Ta.3190	At3g49080	-3.14	4.08E-02
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2-like protein	Ta.4810	At5g08180	-3.05	2.75E-02
At1g24240	Ta.6063	At1g24240	-3.02	5.79E-03
Unclassified / unknown functions (21.91%)				
At3g15670	Ta.727	At3g15670	-657.03	1.04E-03
At4g16160	Ta.5829	At4g16160	-330.28	2.30E-04
At4g28390	Ta.33822	At4g28390	-165.21	5.24E-03
Oxygen-evolving enhancer protein 3-1	Ta.53955 /// Ta.56315	At4g21280	-88.61	2.93E-03
Actin-depolymerizing factor 3	Ta.18239	At5g59880	-80.46	8.48E-04
At3g22490	Ta.5916	At3g22490	-71.29	4.66E-03
Thiosulfate sulfurtransferase	Ta.57500 /// Ta.60110	At5g66040	-62.11	8.77E-05
Sugar transporter ERD6-like 4	Ta.42153	At1g19450	-40.50	1.23E-02
At5g66170	Ta.1022	At5g66170	-33.28	3.95E-05
At3g18280	Ta.66324	At3g18280	-28.90	3.66E-03
At1g15520	Ta.4821	At1g15520	-19.70	1.82E-03
At2g41190	Ta.26177	At2g41190	-16.50	2.57E-04
At5g23810	Ta.56503	At5g23810	-13.98	5.98E-03
At3g16910	Ta.47069	At3g16910	-12.19	3.47E-02
6-phosphofructokinase 2	Ta.35195	At5g47810	-11.92	1.54E-03
At3g10020	Ta.35642	At3g10020	-11.91	3.59E-03
At4g24220	Ta.35298	At4g24220	-11.30	4.14E-02

Supplementary table 1. Continued from preceding page

Annotations	UniGene ID	AGI ID	Fold-change ratio	P-value
At1g77380	Ta.27343	At1g77380	-8.09	2.74E-02
At1g63260	Ta.40025	At1g63260	-7.72	2.82E-02
At5g50200	Ta.5174	At5g50200	-6.62	2.72E-03
At3g15150	Ta.7328	At3g15150	-5.96	4.88E-03
Peptide transporter PTR2	Ta.54663	At2g02040	-5.65	3.91E-02
At5g27740	Ta.39070	At5g27740	-5.33	1.09E-03
Probable plastidic glucose transporter 3	Ta.57510	At1g79820	-4.50	2.48E-03
Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase 4	Ta.40142	At2g43980	-4.45	1.67E-03
At1g09815	Ta.3510	At1g09815	-4.40	3.12E-03
Beta-fructofuranosidase	Ta.9641	At3g13790	-4.32	2.33E-02
Probable nucleolar GTP-binding protein 1	Ta.54221	At1g50920	-4.19	1.71E-02
At1g42440	Ta.5107	At1g42440	-4.18	5.88E-03
At2g34570	Ta.21240	At2g34570	-3.99	1.06E-02
Inner membrane protein ALBINO3	Ta.25745	At2g28800	-3.87	4.91E-02
At2g21800	Ta.7074	At2g21800	-3.84	3.02E-02
At4g33540	Ta.16802	At4g33540	-3.84	2.13E-03
At3g25120	Ta.8994	At3g25120	-3.80	1.17E-02
At5g27395	Ta.6807	At5g27395	-3.80	3.75E-03
Metallothionein-like protein 2A	Ta.13600	At3g09390	-3.77	4.06E-03
At4g24490	Ta.36809	At4g24490	-3.71	9.06E-03
At5g62440	Ta.6030	At5g62440	-3.54	1.48E-02
At3g30390	Ta.37008	At3g30390	-3.54	1.83E-02
Tonoplast dicarboxylate transporter	Ta.41264	At5g47560	-3.52	2.29E-02
At2g20900	Ta.3876	At2g20900	-3.52	9.66E-03
At5g13680	Ta.5780	At5g13680	-3.50	1.83E-02
Meiotic recombination protein SPO11-2	Ta.48988	At1g63990	-3.47	1.75E-04
At4g21800	Ta.5068	At4g21800	-3.43	1.03E-02
At3g15290	Ta.55949	At3g15290	-3.39	2.37E-02
At1g72820	Ta.10466	At1g72820	-3.30	6.34E-03
At5g11710	Ta.4092	At5g11710	-3.23	9.10E-04
At3g20290	Ta.10232	At3g20290	-3.18	1.42E-04
At5g23070	Ta.13390	At5g23070	-3.18	6.36E-03
Probable ADP-ribosylation factor	Ta.54953	At4g17890	-3.18	6.06E-03
6-phosphofructokinase 7	Ta.67010	At5g56630	-3.17	3.06E-04
At1g73030	Ta.7679	At1g73030	-3.15	2.18E-02
Putative potassium transporter 12	Ta.38640	At1g60160	-3.13	2.01E-02
Ribosome biogenesis regulatory protein homolog	Ta.42067	At2g37990	-3.12	2.48E-02
At4g12460	Ta.40739	At4g12460	-3.06	1.61E-02

The annotation column is corresponding to the identified function, the UniGene ID column is corresponding to the identification given by Affymetrix. The AGI ID column is corresponding to the annotation on the Arabidopsis thaliana genome by comparison with RefSeq proteins of the cluster transcripts of the UniGene ID. The fold change ratio column is corresponding to the Log₂ of the ratio of transcript abundance in the treatment reported to the transcript abundance in the control, the P-value column is corresponding to the p-value obtained in a paired t-test performed on the log-ratio, adjusted by the Bonferroni method.

Annexe 2 : Article publié dans *Functional Plant Biology* :

Combined effects of contrast between poor and rich patches and overall nitrate concentration on *Arabidopsis thaliana* root system structure

Combined effects of contrast between poor and rich patches and overall nitrate concentration on *Arabidopsis thaliana* root system structure

Manuel Blouin^{A,B} and Ruben Puga-Freitas^A

^AEquipe Ibios, UMR Bioemco, Université Paris-Est, 61 Avenue du Général De Gaulle, 94010 Créteil, France.

^BCorresponding author. Email: blouin@u-pec.fr

The law of correlative inhibition states that roots in a richer environment develop more intensively if other roots of the same plant are in a poorer environment. This probably occurs only when the cost of emitting these roots in the rich patch is compensated by the advantage of having more roots, i.e. in situations where the difference in concentration between rich and poor patches is strong or the overall nutrient amount in the environment is low. For the first time, we tested root system response to combined gradients of contrast between poor and rich patches and of overall NO_3^- concentration in agar gels. We set up a factorial *in vitro* experiment crossing contrast (null, weak, strong heterogeneity) with overall NO_3^- concentration (deficient, optimal, excessive). We observed an increase in ramification density with increasing heterogeneity in deficient situations; but a decrease with increasing heterogeneity in excessive situations. The interaction between overall NO_3^- concentration and heterogeneity had a significant effect on root ramification density and the distribution of root length in diameter classes. The overall nutrient status of the soil has to be considered to understand the effect of heterogeneity on plant development at the morphological as well as at the molecular level.

Additional keywords: correlative inhibition law, heterogeneity, NO_3^- , root development and morphology, root length and ramification.

M. Blouin and R. Puga-Freitas

Contrast and nutrient effect on root system

Introduction

Plant species possess several strategies to increase nutrient capture in heterogeneous soils, including root emission into nutrient patches (Robinson 1994b; Hodge 2006). The study of lateral root (LR) emission in environments where NO_3^- is distributed heterogeneously teaches us that (i) it exists a local stimulatory control, recently proved to be due to the ion NO_3^- itself (Zhang *et al.* 1999; Remans *et al.* 2006), (ii) an increase in LR emission in the rich patches is often associated with an inhibition of LR proliferation in the poor patches (Gersani & Sachs 1992; Robinson 1994b), and (iii) high overall NO_3^- concentration in the environment inhibits LR response (e.g. Zhang and Forde, 1999). In this experiment, we tested the fact that root system response to heterogeneity is dependent on overall NO_3^- concentration in the environment.

Lateral root (LR) proliferation has been observed in nutrient rich patches for a variety of soil nutrients, including NO_3^- , but also NH_4^+ , and PO_4^{2-} (Drew 1975; Robinson & Rorison 1983; Robinson 1994b). Localized NO_3^- treatments were found to stimulate both initiation and elongation of lateral

roots (Hackett 1972; Drew & Goss 1973; Granato & Raper 1989). The study of Gersani & Sachs (1992) brought new insight concerning LR emission: the local development of LR is not dependent on the absolute nutrient concentration in the patch, but more on the relative concentration of nutrient in the rich patch with regard to the poor one. They proposed the *law of correlative inhibition*: roots in a given environment develop more intensively if the other roots of the same plant are in a poorer than in richer environment.

In his Tansley Review on the responses of plants to non-uniform supplies of nutrient, Robinson (1994) tested this correlative inhibition law on a data set of more than 100 results. He found that the correlative inhibition law was explaining less than half of the results, probably due to the fact that other factors than nutrient distribution controlled LR emission (Robinson 1994b).

Kotliar et al. (1990) have proposed an additional principle to the law of correlative inhibition for explaining root system response to patchy environments. It states that the difference between nutrient concentration in poor (or background soil) and rich patches, also called the degree of contrast (Kotliar & Weins 1990; Lamb *et al.* 2004) or degree of heterogeneity in our study, should be strong enough to lead to a benefit that overcomes the cost of emitting lateral roots in the patch (Kotliar & Weins 1990). However, an experiment dedicated to test this hypothesis showed that plants did not respond to the differences in contrast between nutrient in the rich patch and the surrounding background (Lamb *et al.* 2004). These authors concluded that “there is some threshold value necessary to trigger an increased response (possibly a combination of factors such as patch value and overall nutrient status) that was not reached”. This was supported by the fact that high NO_3^- amount inhibit the LR response (e.g. Zhang and Forde, 1999), which suggests the existence of a systemic inhibitory control of LR development due to plant internal N status, itself positively correlated with NO_3^- availability in the environment. However, as it is known that high nitrate concentration can have a local stimulatory effect in heterogeneous environment (e.g. Zhang and Forde, 1999), it is surprising that the stimulation of growth throughout the root system, unrelated to any locally available nutrients, has received so few comments (Robinson 1994b). Because of the view that plants rarely encounter soil nutrient concentrations leading to toxicity, only low nutrient availability conditions have been studied. Considering a wide range of overall nutrient concentrations is even necessary to develop a general theory for plant response to variations in resource availability in the environment. A synthetic conceptual model has been proposed by de Kroon et al. (2009): plant foraging for resources in heterogeneous environments must involve (1) plasticity at the level of individual modules in reaction to localized environmental signals and the potential for modification of these responses either, (2) signals received from connected modules that may be exposed to different conditions (law of correlative inhibition), or (3) signals reflecting the overall resource status of the plant, explaining the negative feedbacks in excess nutrient conditions. Straightforward predictions from this conceptual model are that a local response to resource abundance will be enhanced when many other integrated

modules are growing under conditions of resource shortage, and that the whole plant itself experiences a nutrient shortage, and that this will result in elevated resource uptake at a local scale (de Kroon *et al.* 2009). Conversely, the local response will be reduced when foraging efforts are unlikely to improve an already favourable plant resource status (Lamb *et al.* 2004). We propose as an additional prediction that LR emission could even decrease when NO_3^- is in excess and becomes toxic, as a way to reduce root system surface area and the exposure of cells to the toxic ion.

In an *in vitro* experiment with a 3x3 factorial design, we study LR emission of *Arabidopsis thaliana* along a gradient of NO_3^- distribution heterogeneity (null, weak or strong heterogeneity) crossed with an overall gradient of NO_3^- amounts in the environment (deficit, optimal or excess) to determine if LR density and root length were affected by (i) the level of heterogeneity of NO_3^- distribution, (ii) the overall N amount in the soil, and (iii) the interaction between heterogeneity and the overall N amount in the soil.

Materials and Methods

Microcosms

Our experimental design was set up to study the effect of the global N concentration in the environment and the heterogeneity of its distribution. We applied localised NO_3^- treatments to *Arabidopsis thaliana* with the segmented agar plate set-up accordingly to Zhang and Forde (1998), except that we used square transparent boxes instead of circular Petri dishes, what permits to have equal gel volume in the top, middle and down patches and makes the vertical positioning easier. Gels were made of a 9 g l⁻¹ gelrite, which represents a relatively high gel strength close to what plants can experiment in soils, with a classical Murashige and Skoog medium (Murashige & Skoog 1962) with micronutrients and vitamins at standard concentrations. Macronutrient concentrations were kept standard for $\text{CaCl}_2 = 2.99$ mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1.25$ mM and $\text{MgSO}_4 = 1.50$ mM. NO_3^- was brought at a basal level as $\text{NH}_4\text{NO}_3 = 10\mu\text{M}$ (instead of 20.61mM in MS medium). The KNO_3 concentration was adapted according to the treatment, and the K concentration was kept constant by adding KCl, which has no effect on root system structure (Zhang *et al.* 1999). Gels with different KNO_3 concentrations were prepared, cut in bands (width: 10 cm, height: 2 cm, thickness: 1 cm, i.e. 20 ml per band) and placed in new boxes with a small plastic grid with a 1 mm mesh size between two bands to avoid direct contact and KNO_3 diffusion. The overall NO_3^- concentration (or amount, since volume was constant) in the whole culture medium (called N_{ext} hereafter) presented three levels (Fig. 1): (A) the deficit treatment with 0.5 mM of NO_3^- in 60 ml, i.e. $3 \cdot 10^{-5}$ moles, (B) the optimal treatment with 5 mM in 60 ml, i.e. $3 \cdot 10^{-4}$ moles and (C) the excess treatment with 50 mM in 60 ml, i.e. $3 \cdot 10^{-3}$ moles. Heterogeneity corresponded to the difference in concentration/amount of NO_3^- between the poor bands (a and c) and the rich band (b). This factor presented also three levels (Fig. 1): (0) the null heterogeneity corresponded to a situation where the a, b and c bands had a identical NO_3^- amount

equal to 2/6 of the overall NO_3^- amount, (1) the weak heterogeneity to a situation where the a and c bands had a NO_3^- amount equal to 1/6 and the b band equal to 4/6, and (2) the strong heterogeneity to a situation where the a and c bands had a NO_3^- amount equal to 0/6 and the b band equal to 6/6. There were 9 different treatments, each replicated 5 times.

Plant culture

Seeds of *Arabidopsis thaliana* cv Columbia were sterilized for 10 minutes in Teepol HB7 (Sigma Aldrich, Germany) and 10 minutes in 90° ethanol. They were sown in MS medium at 0.5 mM, the NO_3^- concentration used in the deficit homogeneous treatment A0. After 15 days, 45 similar seedlings with a seminal root 2.3-2.5 cm long were transferred in the experimental set-up by positioning the root between the gel and the box. The end of the root (0.3-0.5 cm) was placed behind the b band, whereas the major part (2 cm) was behind the a band. The pre-treatment was essential to obtain seedlings with a main root of 2.3 to 2.5 cm, to put the root in contact with the second band. If seeds were directly set in the experimental device, it is probable that some will not develop enough to reach the second band, leading to the absence of heterogeneity effects (Zhang & Forde 1998). After the transfer, the concentrations experienced by plants were different in the three heterogeneity treatments at a given N_{ext} concentration. This was the only way to keep the same overall N concentration independently of the heterogeneity. Plants were grown for 26 days in an *in vitro* culture chamber at 18°C, with a 12-hours photoperiod (light intensity: 200 $\mu\text{mol photons s}^{-1}$).

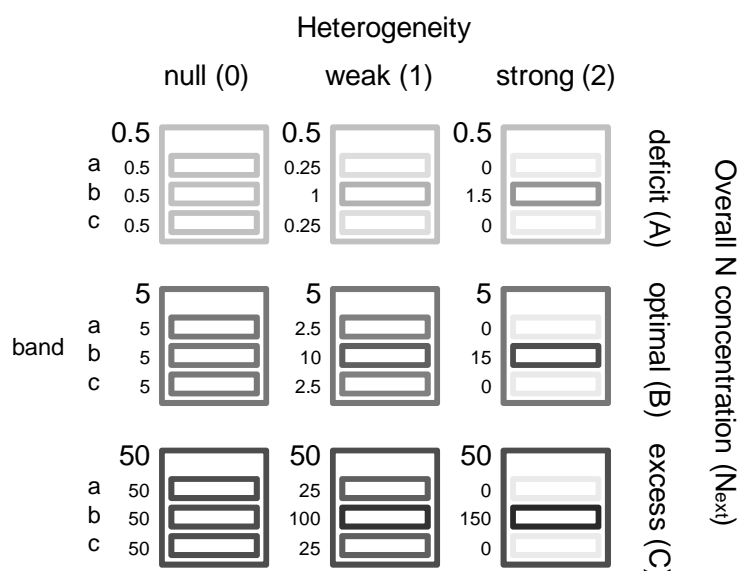


Fig. 1. Experimental set-up. Culture medium consisted in square transparent boxes (10 × 10 × 1.5 cm), vertically oriented, divided in three 2 cm high agar bands (called 'a', 'b' and 'c', from the top down to the bottom), separated with a 1 mm thick plastic grid with a 2 mm mesh size allowing roots to cross, with a 3.7 cm space free for plant aboveground development. Experimental design consisted in a 3 × 3 factorial experiment with the overall NO_3^- concentration in the gel crossed with heterogeneity in NO_3^- distribution. The value at the upper left corner is corresponding to the overall NO_3^- concentration (mM), and the three values below to the concentration (mM) of each one of the three bands.

Root system analysis

Each root system was analysed with a digital scanner (EPSON Expression 10000 XL, Epson America Inc., USA) coupled with the WinRHIZO software (WinRHIZO, version 2007 pro, Regent Instrument, Quebec, Canada). As advised by sensitivity analyses of this material and software (Bouma *et al.* 2000; Himmelbauer *et al.* 2004), we used a double light system, at a resolution of 16 p mm⁻¹ (400 dpi), with the automatic transformation threshold option which optimizes the distinction of pixels considered as root or background according to their relative contrast. Eleven equal diameter classes were defined: from 0-100 to 800-900 and >900 µm. After root system analysis, both above and below-ground organs were dried for 2 days at 45°C and weighted.

Numerous variables characterising root systems can be obtained with image analysis. We were specifically interested with the emission of lateral roots. The number of lateral roots in each band can be considered a good indicia of the emission of lateral roots. But because the number of ramifications is correlated with root system size, it was reported to the root biomass for each band to obtain the ramification number per unit biomass, hereafter called “ramification density”. This variable was more relevant to our research question than the ramification number per unit length; in fact, we investigated a wide range of nitrogen concentrations, which could have an impact on the tissue density. This change in tissue density was not taken into account in the ramification number per unit length, but in the ramification number per unit biomass. We were also interested in the length of lateral roots, which could respond differently than the emission of lateral roots to the different experimental factors. We thus analysed the length per diameter classes.

Results

Plant biomasses

Belowground, aboveground and total dry biomasses were significantly affected by the overall N concentration in the culture medium (N_{ext}) but not by heterogeneity, neither by the interaction between N_{ext} and heterogeneity (Table 1). Shoot:root ratio was affected by N_{ext} , and less significantly by heterogeneity (Table 1). Total, below and aboveground biomasses were slightly increased at the “optimal” N_{ext} as compared with the “deficit” N_{ext} , but the difference was not significant (Fig. 2). However, root biomass was significantly decreased in “excess” N_{ext} as compared with “optimal” and “deficit” N_{ext} . A significant increase in the shoot:root ratio was detected from the deficit to the excess N_{ext} treatment.

Table 1. Impact of overall NO_3^- concentration in the environment (N_{ext}), contrast in NO_3^- concentration between poor and rich patches (heterogeneity) and their interaction on biomass production (F -tests)
Df, degrees of freedom

Parameter	Aboveground dry biomass			Belowground dry biomass			Total dry biomass			Shoot : root ratio		
	Df	F	P-value	Df	F	P-value	Df	F	P-value	Df	F	P-value
N_{ext}	2	4.36	0.02	2	13.85	<0.001	2	5.46	0.008	2	12.50	<0.001
Heterogeneity	2	0.16	0.85	2	1.91	0.16	2	0.046	0.96	2	3.00	0.06
$N_{\text{ext}} \times$ heterogeneity	4	1.15	0.35	4	0.89	0.48	4	1.094	0.37	4	0.42	0.79
Residuals	36	–	–	36	–	–	36	–	–	36	–	–

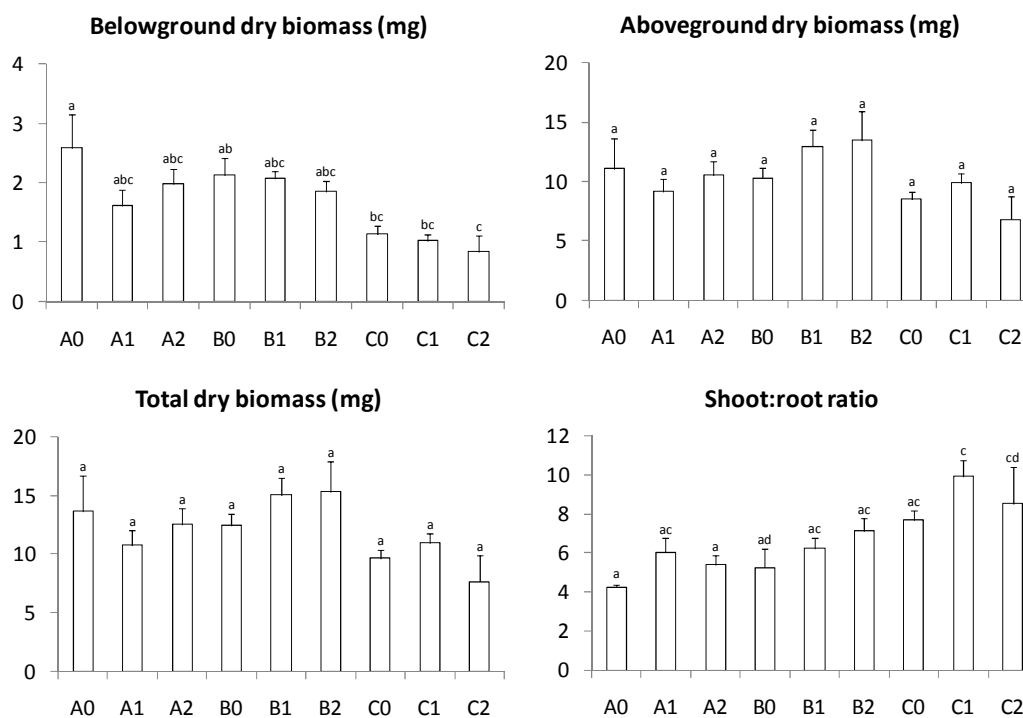


Fig. 2. Biomass production of *Arabidopsis thaliana* in the different treatments. A, B and C are correspond, respectively, to the three levels of overall N concentrations in the gel (deficit, optimal and excess), and 0, 1 and 2 to the three levels of heterogeneity (null, weak or strong). Means \pm s.e, $n = 5$ per treatment. Significant differences among all the treatments are marked with different letters (Tukey HSD tests).

Root system structure

Root system parameters were analysed band per band (cf Materials and Methods section), because the local N concentration was not the same in each band (the rich band was always the middle band called “b”, whereas the top band “a” and down band “c” were equally poor). A three way ANOVA with the factors “overall N concentration in the environment” (N_{ext}), “heterogeneity” and “band” was realised to detect a potential effect of N_{ext} , heterogeneity or their interaction on root system structure, with band as a cofactor explaining variations due to the age of the roots. First, the “band” factor had a significant effect on all parameters describing root system structure (length, ramification number, ramification density...); moreover, the interaction between band and N_{ext} was also significant for these parameters. This result justified the fact to add this factor in the analysis, to be able to detect the effect of other factors. The number of ramifications was significantly affected by the factor N_{ext} (P

= $2.13 \cdot 10^{-12}$) but not by heterogeneity ($P = 0.69$), nor by the interaction between N_{ext} x heterogeneity ($P = 0.41$). The ramification number per unit biomass, hereafter called “ramification density” was integrating the fact that root system size and/or tissue density could differ between treatments (see Materials and Methods section for more details). Ramification density (Table 2) was significantly affected by N_{ext} ($P = 9.38 \cdot 10^{-5}$), and also by heterogeneity ($P = 0.028$) and the interaction heterogeneity x N_{ext} ($P = 0.015$). This was more significant for the second and superior ramification orders than for the first one (results not shown).

Table 2. Impact of overall NO_3^- concentration in the environment (N_{ext}), contrast in NO_3^- concentration between poor and rich patches (heterogeneity), and the cofactor position of the band (band) and their interactions on the number of ramifications per unit of root dry biomass (F-tests)

Significance differences: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; Df, degrees of freedom

Parameter	Df	Sum of squares	Mean square	F-value	P-value	Significance
N_{ext}	2	92651	46326	10.06	<0.001	***
Heterogeneity	2	34089	17045	3.70	0.028	*
Band	2	98164	49082	10.66	<0.001	***
$N_{\text{ext}} \times$ Heterogeneity	4	59232	14808	3.22	0.015	*
$N_{\text{ext}} \times$ band	4	96499	24125	5.24	<0.001	***
Heterogeneity \times band	4	80150	20037	4.35	0.003	**
$N_{\text{ext}} \times$ heterogeneity \times band	8	42107	5263	1.14	0.34	–
Residuals	108	497189	4604	–	–	–

We reported ramification density according to the different treatments of overall N concentration and heterogeneity levels in Fig. 3. On this figure, it can be noticed that the highest level of ramifications per unit biomass was reached in the treatment A1c (deficit of N, weak level of heterogeneity, bottom band) and the lowest in the C2a and C2c (excess of N, strong heterogeneity, bands a and c respectively). A general trend was an increase in ramification density with the position of the band (from a to c), probably due to the fact that young root in the c band were finer and more responsive to environmental heterogeneity than older roots from bands a and b; this is typical from a developmental effect (Robinson 1994b). The variation of ramification density between the three bands of one experimental unit was small in the null heterogeneity treatment (heterogeneity = 0), but strong in the weak and strong heterogeneity treatments (heterogeneity = 1 and 2) (Fig. 3). Concerning the direction of these variations, all treatments with a deficit in overall N concentration ($N_{\text{ext}} = A$) exhibited an increase in ramification density between the bands a and b and between the bands b and c. The treatments with an optimal overall N concentration ($N_{\text{ext}} = B$) exhibited the same pattern, except the null heterogeneity treatment (B0) where the NO_3^- amount in the band a was already high (see Fig. 1). The treatments with an excess in overall N concentration ($N_{\text{ext}} = C$) exhibited a pattern of variation dependant on the level of heterogeneity: a constant ramification density at null heterogeneity (C0), an increase from a to c at weak heterogeneity (C1) and a decrease from bands b to c at high heterogeneity (C2). The interaction between N_{ext} and heterogeneity was clear when comparing the three overall N concentrations ($N_{\text{ext}} = A, B$ and C) at strong heterogeneity (heterogeneity = 2). It can thus be observed

that heterogeneity can induce opposite effects on ramification density according to the overall amount of N in the environment.

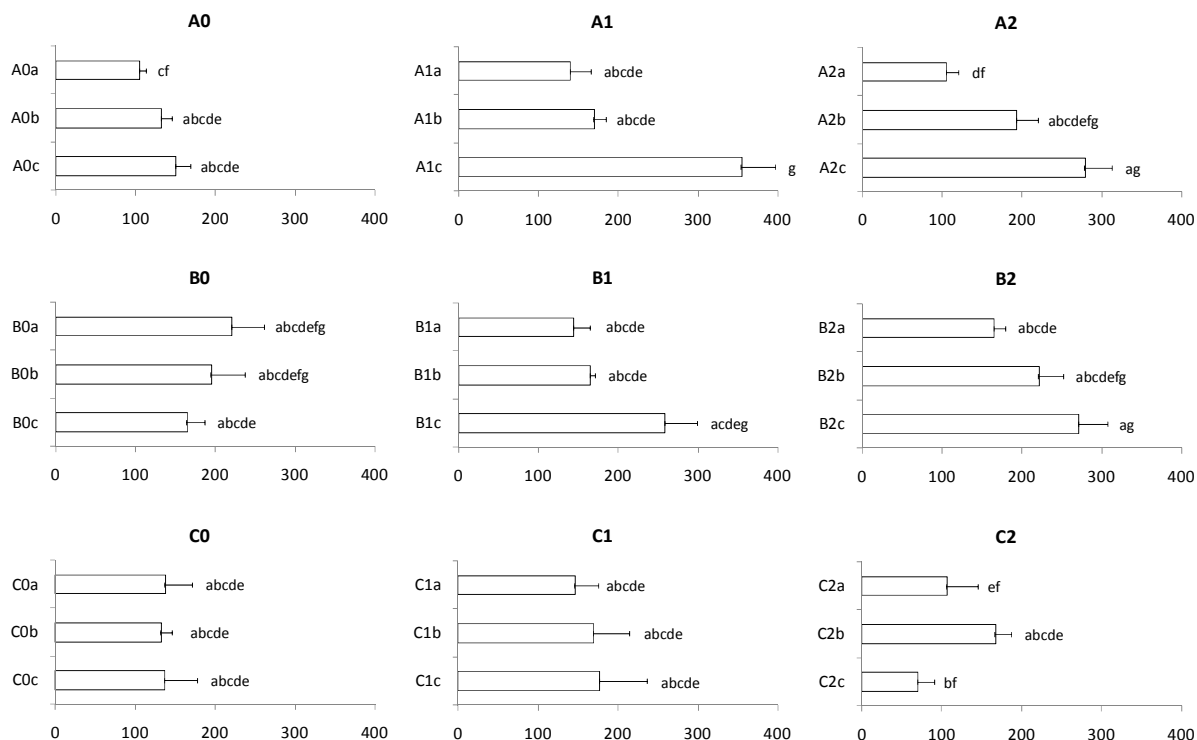


Fig. 3. Ramification density (number of ramification per gram of dry root biomass) in each band. A, B and C are corresponding respectively to the three levels of overall N concentrations in the gel (deficit, optimal and excess), and 0, 1 and 2 to the three levels of heterogeneity (null, weak or strong). Means \pm s.e., $n = 5$ per treatment, significant differences among all the treatments are marked with different letters (Tukey HSD tests).

Root system structure was also analysed in term of length percentage per diameter class, with diameter classes with a range of 100 μm , from 0 to 900 μm . By analysing the result for each one of the 9 classes in a three way ANOVA with N_{ext} and heterogeneity as factors and band as cofactor, we observed that N_{ext} affected significantly all diameter classes (with a $P < 0.0001$), that heterogeneity affected significantly the classes 0-100 ($P < 0.05$), 100-200 ($P < 0.10$), 400-500 ($P < 0.001$) and 500-600 μm ($P < 0.10$), and that the interaction between N_{ext} and heterogeneity affected significantly the classes 0-100 ($P < 0.0001$), 100-200 ($P < 0.05$), 200-300 ($P < 0.10$), 300-400 ($P < 0.05$), 500-600 μm ($P < 0.10$) and 600-700 μm ($P < 0.10$). It can be noted that the interaction between N_{ext} and heterogeneity was significantly affecting more root diameter classes than the heterogeneity by itself. These lengths per diameter classes are reported on Fig. 4. The first graph with the absolute length shows that treatments B1 and B2 were those with the longest roots in all classes, whereas treatments with excess overall N amount (C) were those with the smallest length. On the second graph, these data were reported on the total root system length to analyse qualitative changes. All treatments with an excess N_{ext} (C0, C1 and C2) and the treatment B0 exhibited a development divergent from the other

treatments: the length percentage of fine roots (from 0 to 300 μm) was smaller, whereas the length percentage of coarse roots (from 400 to 700 μm) was higher than in other treatments.

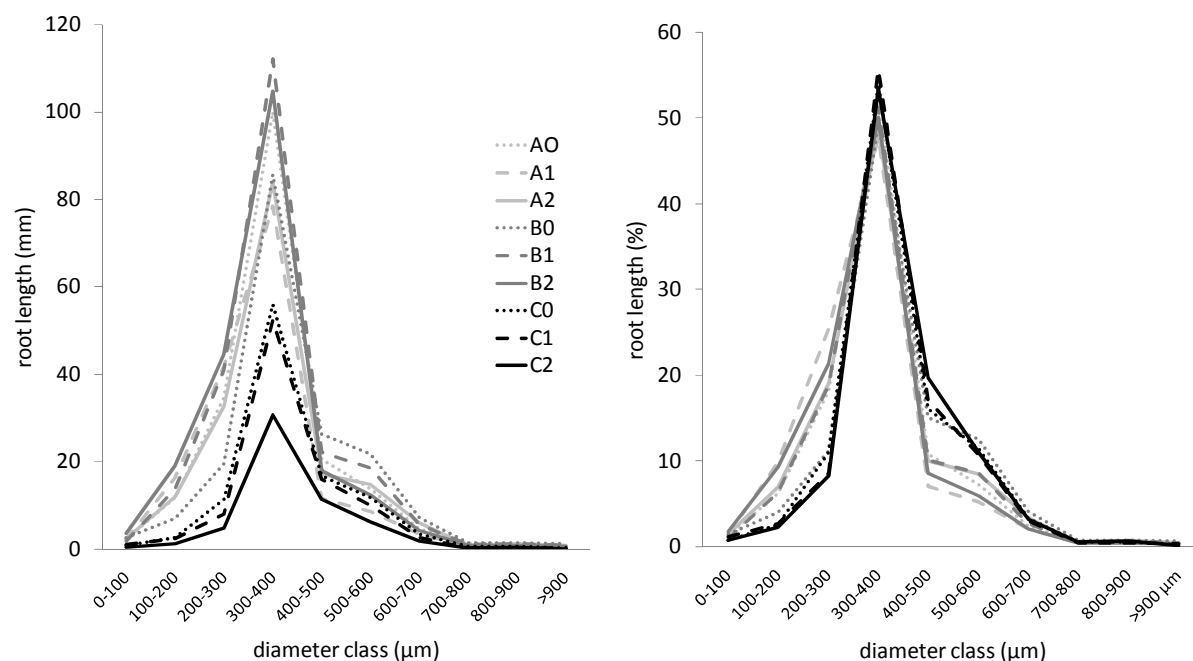


Fig. 4. Root length distribution in diameter classes of *Arabidopsis thaliana* either in absolute value (mm) or in relative value (%) according to the different treatments. A, B and C are corresponding respectively to the three levels of overall N concentrations in the gel (deficit, optimal and excess), and 0, 1 and 2 to the three levels of heterogeneity (null, weak or strong). Means \pm s.e, $n = 5$ per treatment.

The distribution of length among all diameter classes taken together was analysed in a MANOVA (Table 3). Significant effects were observed for N_{ext} and heterogeneity as well as for the $N_{\text{ext}} \times \text{heterogeneity}$ interaction, confirming the fact that the effect of heterogeneity was dependant on the overall N amount in the environment. Here again, it can be noted that the effect of the $N_{\text{ext}} \times \text{heterogeneity}$ interaction was stronger than that of heterogeneity, as shown by the value of the Pillai-M. S. Bartlett trace test statistics (respectively 0.72 and 0.32) and the p-value (respectively 0.00005 and 0.01).

Table 3. Impact of overall NO_3^- concentration in the environment (N_{ext}), contrast in NO_3^- concentration between poor and rich patches (heterogeneity), and the cofactor position of the band (band) and their interactions on root length distribution in diameter classes from 0–100 μm to >900 μm (F -tests)

Significance differences: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; Df , degrees of freedom

MANOVA model	Df	Pillai	Approx. F	Num Df	Den Df	Pr ($>F$)	Significance
N_{ext}	2	0.749	5.989	20	200	<0.001	***
Heterogeneity	2	0.319	1.902	20	200	0.013	*
Band	2	1.075	11.629	20	200	<0.001	***
$N_{\text{ext}} \times \text{heterogeneity}$	4	0.716	2.226	40	408	<0.001	***
$N_{\text{ext}} \times \text{band}$	4	0.715	2.22	40	408	<0.001	***
Heterogeneity \times band	4	0.333	0.926	40	408	0.601	—
$N_{\text{ext}} \times \text{heterogeneity} \times \text{band}$	8	0.621	0.892	80	848	0.734	—
Residuals	108	—	—	—	—	—	—

Discussion

This study was dedicated to investigate root system structure along a gradient of overall NO_3^- concentrations crossed with a gradient of NO_3^- heterogeneity distribution. The dicotyledon species *A. thaliana* has a root system developing from one main root, the radicle. A split root system with two equivalent root system parts grown in vertical agar bands was thus not appropriate. Consequently, agar bands were oriented horizontally (Zhang & Forde 1998) and plant roots were reaching the different horizontal bands at different ages and development stages. As a result, one major effect observed in our experiment was a “band” effect (Tables 2 and 3), strongly correlated with root age. As in several previous studies, we observed a lateral root response not strictly localised in the rich patch. This “time-dependant responses” have been reviewed by Robinson (1994); for example, when NO_3^- is applied to a discrete location in soil with wheat plants that had already begun ear development, roots did proliferate, but throughout the root system, not just around the point of NO_3^- application (Robinson 1994a). Younger plants did respond as one might expect (Robinson 1991). This effect of age made the results more complex (Fig. 2 and 3), but it can be considered as a covariable in ANOVA to estimate the significance of factors such as N_{ext} , heterogeneity and $N_{\text{ext}} \cdot \text{heterogeneity}$ which is discussed below.

Overall N concentration affected significantly root system structure in our experiment (Tables 1, 2 and 3). It was difficult to observe a general trend in a 3x3 factorial design; this was probably due to the age effect discussed above and to the pre-treatment at 0.5 mM for the germination of all seeds, before their removal in the experimental units with different nitrogen concentrations. However, it can be perceived that the number of ramifications per root biomass unit was constant from deficient to optimal N_{ext} , whereas it was decreasing from optimal to excessive N_{ext} (Fig. 3). Root length was increasing from deficient to optimal N_{ext} and then decreasing from optimal to excessive N_{ext} (Fig. 4). This is in accordance with the fact that in high nutrient concentration situations, the general trend is a decrease in root length and number of ramification at excessive nutrient supply. The most common response to an increase in nitrate and ammonium concentration in the environment is a decrease in root:shoot ratio (Boxman *et al.* 1991; Wang & Below 1996; Bauer & Berntson 1999) and a decrease in fine:coarse root ratio (Haynes & Goh 1978; Boxman *et al.* 1991; Britto & Kronzucker 2006), as observed here.

The degree of heterogeneity in nutrient distribution, also called the degree of contrast or the difference in nutrient availability between the patch and the background soil (Kotliar & Weins 1990; Lamb *et al.* 2004), has received little research attention. Models examining nutrient uptake from heterogeneous soils predict an increase in the root proliferation and in the biomass of adapting plants when contrast increases (Jackson & Taylor 1996; Fransen *et al.* 1999). To our knowledge, experimental testing of this theory is limited to the studies by Wijesinghe and Hutchings (1994) and

Lamb *et al.* (2004). In an experiment with the plant *Abutilon theophrasti* Medic., neither root and shoot biomasses nor root proliferation was affected by patch/background contrast (Lamb *et al.* 2004). Authors interpreted this as a potential consequence of “some threshold value necessary to trigger an increased response (possibly a combination of factors such as patch value and overall nutrient status) that was not reached”. They concluded that “Validation of this model will require similar experiments using a much wider range of contrasts and total nutrient availability” (Lamb *et al.* 2004). In the other experiment, the clonal herb *Glechoma hederacea*, a species that benefits strongly from heterogeneous soil (Birch & Hutchings 1994), increasingly concentrates root biomass in rich patches as contrast increases, while total shoot biomass is similar between contrast treatments (Wijesinghe & Hutchings 1999). In the same way, in our experiment, we observed a significant effect of heterogeneity on ramification density and root length per diameter classes (Tables 2 and 3). This effect of heterogeneity was associated with an increase in total biomass only in the optimal overall N concentration (Fig. 1). It is likely that in the study of Lamb *et al.* (2004) the contrast was not strong enough, or that the effect of overall N concentration was compensating the effect of contrast. In the study of Wijesinghe and Hutchings (1999), the contrast was strong enough to observe changes in root proliferation, but the overall N concentration was probably not appropriate to observe a change in plant biomass.

Finally, the most important result of our study was that root system response to heterogeneity depended on the overall NO_3^- concentration in the environment, as shown by the significant effect of the $\text{N}_{\text{ext}} \times \text{heterogeneity}$ interaction on ramification density and root length (Tables 2 and 3, Fig. 3 and 4). The effect of the $\text{N}_{\text{ext}} \times \text{heterogeneity}$ interaction was even more significant than the effect of heterogeneity itself (Tables 2 and 3). Heterogeneity had a positive effect on ramification density when the overall NO_3^- amount in the environment was limiting or optimal, but a negative effect when NO_3^- was in excess. This can be interpreted as a way to maximize the root surface area when a nutrient is limiting, and to minimize it when it becomes toxic.

The significant interaction between overall NO_3^- concentration in the environment and the degree of heterogeneity could explain why so few studies reviewed by Robinson (1994) seem to follow the law of correlative inhibition. If authors were systematically mentioning the overall nutrient amount in the environment in addition to the contrast between poor and rich patches, it should be easier to overcome the apparent contradiction between experiments.

Acknowledgements

We thank Danielle Benest for technical and the “Ingénierie Ecologique” program of the CNRS “Institut Ecologie et Environnement” for funding this study.

References

- Bauer GA, Berntson GM (1999) Ammonium and nitrate acquisition by plants in response to elevated CO₂ concentration: The roles of root physiology and architecture. *Tree Physiology* **21**, 137-144.
- Birch CPD, Hutchings MJ (1994) Exploitation of patchily distributed soil resources by the clonal herb *Glechoma hederacea*. *Journal of Ecology* **82**, 653-664.
- Bouma TJ, Nielsen KL, Koutstaal B (2000) Sample preparation and scanning protocol for computerised analysis of root length and diameter. *Plant Soil* **218**, 185-196.
- Boxman AW, Krabbendam H, Bellemakers MJS, Roelofs JGM (1991) Effects of ammonium and aluminium on the development and nutrition of *Pinus nigra* in hydroculture. *Environmental Pollution* **73**, 119-136.
- Britto DT, Kronzucker HJ (2006) Futile cycling at the plasma membrane: a hallmark of low-affinity nutrient transport. *Trends in Plant Science* **11**, 529-534.
- de Kroon H, Visser EJW, Huber H, Mommer L, Hutchings MJ (2009) A modular concept of plant foraging behaviour: the interplay between local responses and systemic control. *Plant, Cell and Environment* **32**, 704-712.
- Drew MC (1975) Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. *New Phytologist* **75**, 479-490.
- Drew MC, Goss M (1973) Effect of soil physical factors on root growth. *Chemistry and Industry* **14**, 679-684.
- Fransen B, De Kroon H, De Kovel CGF, Van den Bosch F (1999) Disentangling the effects of root foraging and inherent growth rate on plant biomass accumulation in heterogeneous environments: A modelling study. *Annals of Botany* **84**, 305-311.
- Gersani M, Sachs T (1992) Developmental correlations between roots in heterogeneous environments. *Plant, Cell and Environment* **15**, 463-469.
- Granato TC, Raper CDJ (1989) Proliferation of maize (*Zea mays* L.) roots in response to localized supply of nitrate. *Journal of Experimental Botany* **40**, 263-275.

- Hackett C (1972) A method of applying nutrients locally to roots under controlled conditions, and some morphological effects of locally applied nitrate on the branching of wheat roots. *Australian Journal of Biological Sciences* **25**, 1169-1180.
- Haynes RJ, Goh KM (1978) Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biological Reviews* **53**, 465-510.
- Himmelbauer ML, Loiskandl W, Kastanek F (2004) Estimating length, average diameter and surface area of roots using two different Image analyses systems. *Plant Soil* **260**, 111-120.
- Hodge A (2006) Plastic plants and patchy soils. *Journal of Experimental Botany* **57**, 401-411.
- Jackson AO, Taylor CB (1996) Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *Plant Cell* **8**, 1651-1668.
- Kotliar NB, Weins JA (1990) Multiple scales of patchiness and patch structure: a hierarchical framework for the study of heterogeneity. *Oikos* **59**, 253-260.
- Lamb EG, Haag JJ, Cahill JFJ (2004) Patch-background contrast and patch density have limited effects on root proliferation and plant performance in *Abutilon theophrasti*. *Functional Ecology* **18**, 836-843.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Filleur S, Diatloff E, Mounier E, Tillard P, Forde BG, Gojon A (2006) The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 19206-19211.
- Robinson D (1991) The efficiency of crop root-systems in nutrient uptake. In 'Scottish Crop Research Institute Annual Report 1991.' pp. 49-51. (Scottish Crop Research Institute: Dundee)
- Robinson D (1994a) Resource capture by single roots. In 'Resource capture by crops.' (Eds JL Monteith, RK Scott and MH Unsworth) pp. 53-76. (Nottingham University Press: Nottingham)
- Robinson D (1994b) The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytologist* **127**, 635-674.

- Robinson D, Rorison IH (1983) A comparison of the responses of *Lolium perenne* L., *Holcus lanatus* L. and *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin. to a localised supply of nitrogen. *New Phytologist* **94**, 263-273.
- Wang XT, Below FE (1996) Cytokinins in enhanced growth and tillering of wheat induced by mixed nitrogen source. *Crop Science* **36**, 121-126.
- Wijesinghe DK, Hutchings MJ (1999) The effects of environmental heterogeneity on the performance of *Glechoma hederacea*: the interactions between patch contrast and patch scale. *Journal of Ecology* **87**, 860-872.
- Zhang H, Forde BG (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**, 407-409.
- Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde BG (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6529-6534.

Effet du ver de terre *Aporrectodea caliginosa* sur la croissance des plantes, leur développement et leur résistance aux pathogènes: réponse physiologique et moléculaire de la plante à l'émission de molécules-signal

Les plantes se développent et évoluent en interaction avec les organismes du sol. L'impact des vers de terre sur la croissance des plantes, généralement positif, a été attribué à des modifications physiques, chimiques ou biochimiques du sol, souvent sans démonstration rigoureuse. Dans ce travail, les techniques développées en sciences du végétal (culture *in vitro*, utilisation de mutants et transcriptomique) ont été utilisées afin de comprendre les mécanismes à l'origine de l'effet des vers de terre sur les plantes. Nos résultats apportent de nouvelles connaissances fondamentales: (1) la production de molécules-signal à l'intérieur des déjections de vers de terre a un impact significatif sur la croissance d'*Oryza sativa* et *Lolium perenne*. (2) Ces molécules agissent sur la voie de signalisation fortement liée à l'auxine, comme suggéré par l'effet significatif du ver de terre sur la croissance du double mutant d'*A. thaliana aux1-7;axr4-2*. (3) L'abondance de ces molécules-signal en présence de vers de terre pourrait être liée à la stimulation de certaines populations bactériennes capables de synthétiser de l'auxine. (4) Le ver de terre induit une accumulation de transcrits pour des gènes sous contrôle de l'acide jasmonique et de l'éthylène. Ces hormones sont notamment impliquées dans un mécanisme de résistance systémique induite (ISR), connu pour être induit par certaines rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes. Enfin, (5) Le piétin échaudage, maladie due à un champignon pathogène, déclenche chez le blé (*Triticum aestivum*) une réaction d'hypersensibilité et une modification de la signalisation hormonale, qui sont considérées comme des mécanismes de contrôle du métabolisme de la plante qui facilitent l'infection du pathogène. La sévérité de cette maladie est réduite en présence de vers de terre. La synthèse de ces résultats indique que les vers de terre, comme d'autres organismes du sol, modifient l'équilibre hormonal de la plante. L'homéostasie hormonale apparaît comme un élément incontournable pour prédire l'issue des interactions multiples que les plantes entretiennent avec les organismes du sol.

Mots-clés : *Aporrectodea caliginosa* ; *Arabidopsis thaliana* ; bactéries promotrices de la croissance des plantes ; hormones végétales ; molécules-signal ; piétin échaudage ; résistance systémique ; rhizosphère ; transcriptomique ; vers de terre

Impact of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* on plant growth, development and resistance against pathogens: physiological and molecular plant response to the emission of signal molecules

Plants develop and evolve in interaction with soil organisms. The impact of earthworms, likely positive, has been attributed to modifications of physical, chemical or biochemical soil properties, without rigorous demonstration. In this work, techniques developed in plant science (*in vitro* culture, use of mutant plants and transcriptomic analysis) were used to understand the mechanism involved in the effect of earthworms on plants. Our results bring new fundamental knowledge: (1) production of signal-molecules within earthworm dejections has a positive impact on the growth of *Oryza sativa* and *Lolium perenne*. (2) These molecules act on auxin signaling, as suggested by the positive impact of the earthworm on the growth of *A. thaliana* double mutant *aux1-7;axr4-2*. (3) The abundance of these signal-molecules in presence of the earthworms could be related to the stimulation of bacterial communities able to produce auxin. (4) Earthworms induce an accumulation of gene transcripts known to be under control of jasmonic acid and ethylene. These two hormones are most notably involved in the defense mechanism called induced systemic resistance (ISR), known to be induced by plant growth promoting rhizobacteria. Finally, (5) Take-all disease, due to a pathogenic fungus, induced in wheat (*Triticum aestivum*) a hypersensitive response and a modification on hormone signaling, which are known as manipulations of plant metabolism in a way that facilitates pathogen infection. The severity of take-all disease was alleviated in the presence of earthworms. Synthesis of these results showed that earthworms, like other soil organisms, modify the hormone balance in the plant. Hormone homeostasis appeared to be an important element to predict the issue of the multiple interactions that plants established with soil organisms.

Keywords : *Aporrectodea caliginosa* ; *Arabidopsis thaliana* ; earthworms ; plant hormones ; plant growth promoting rhizobacteria ; rhizosphere ; signal molecules ; take-all ; transcriptomic ; systemic resistance