



**HAL**  
open science

# Histoire évolutive des Poaceae et relations avec la communauté bactérienne rhizosphérique

Marie-Lara Bouffaud

► **To cite this version:**

Marie-Lara Bouffaud. Histoire évolutive des Poaceae et relations avec la communauté bactérienne rhizosphérique. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10341 . tel-01002644

**HAL Id: tel-01002644**

**<https://theses.hal.science/tel-01002644>**

Submitted on 6 Jun 2014

**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.

**THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE EVOLUTION ECOSYSTEMES MICROBIOLOGIE MODELISATION

**DIPLOME DE DOCTORAT**

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 12 décembre 2011

par

**Marie-Lara BOUFFAUD**

---

**Histoire évolutive des *Poaceae* et relations avec la  
communauté bactérienne rhizosphérique**

---

**JURY :**

Wafa ACHOUAK, Chargée de Recherche, CNRS  
Philippe LEMANCEAU, Directeur de Recherche, INRA  
Yves VIGOUROUX, Chargé de Recherche, IRD  
Maria FERNANDEZ, Professeur, Université Lyon 1  
Daniel MULLER, Maître de Conférences, Université Lyon 1  
Yvan MOËNNE-LOCCOZ, Professeur, Université Lyon 1

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Co-directeur de thèse  
Directeur de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

**M. A. Bonmartin**

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur D. Simon

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Secrétaire Général

M. G. Gay

## *COMPOSANTES SANTE*

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie  
Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

## *COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE*

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De Marchi

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. P. Fournier

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. Pignault

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. Bernard



## Résumé

Depuis l'apparition de la vie sur terre, les pressions de sélection liées aux interactions biotiques et abiotiques ont généré une forte diversité des formes de vie. Ainsi, chaque espèce eucaryote coévolue avec sa communauté microbienne associée. Dans le cas des plantes, la diversité génétique se traduit au niveau de multiples traits phénotypiques (exsudation de substrats carbonés, architecture racinaire, densité et aération du sol, acidification, etc.) susceptibles d'influer sur les interactions avec les populations microbiennes du sol, et donc sur la composition et le fonctionnement de la communauté microbienne rhizosphérique. Notre hypothèse est que les différences entre communautés bactériennes rhizosphériques sont proportionnelles aux distances évolutives entre partenaires végétaux. L'objectif de cette thèse était donc de déterminer l'importance, dans le cas des Poacées et notamment du maïs, de l'histoire évolutive de la plante dans la capacité de sélection des communautés bactériennes de la rhizosphère. Les analyses faites à l'aide d'une puce à ADN taxonomique 16S indiquent que la composition de la communauté rhizobactérienne dépend du groupe génétique de maïs mais n'est pas liée aux marqueurs microsatellites de diversité du maïs. Par contre, à l'échelle des Poacées, une corrélation a été trouvée entre la phylogénie végétale et la composition de la communauté bactérienne (voire la prévalence de taxons bactériens particuliers). Cette corrélation n'était pas significative quand l'étude était limitée à l'effectif, le niveau de transcription de *nifH* ou la diversité du groupe fonctionnel des bactéries fixatrices d'azote. En conclusion, l'histoire évolutive du partenaire végétal à l'échelle des Poacées (mais pas à celle du maïs) est un facteur conditionnant les interactions avec les groupes bactériens taxonomiques (mais pas nécessairement fonctionnels) de la rhizosphère.

Mots clés : Histoire évolutive, *Zea mays*, *Poaceae*, Rhizosphère, Puce à ADN taxonomique 16S, (RT) PCR quantitative en temps réel, bactéries fixatrices d'azote.



## Abstract

Since the emergence of life on earth, the selection pressures related to biotic and abiotic interactions generated a high diversity of life forms. Thus, each eukaryotic species co-evolved with its associated microbial community. In the case of plants, genetic diversity is reflected in many phenotypic traits (exudation of carbon substrates, root architecture, soil density, aeration, acidification, etc.), and may influence interactions with soil microbial populations and hence the composition and functioning of the rhizosphere microbial community. Our hypothesis is that the differences between rhizosphere bacterial communities are proportional to evolutionary distances between plants partners. The objective of this thesis was to determine the importance, in the case of *Poaceae* and in particular of maize, of the evolutionary history of plant in the selection of bacterial communities in the rhizosphere. Analyses performed using a 16S taxonomic microarray indicated that the composition of the rhizobacterial community depends on the genetic group of maize but is not linked to microsatellite diversity of maize. Conversely, across the *Poaceae*, a correlation was found between plant phylogeny and the composition of the bacterial community (and the prevalence of specific bacterial taxa). This correlation was not significant when the study was limited to the size, the level of transcription or *nifH* diversity of the functional group of nitrogen-fixing bacteria. In conclusion, the evolutionary history of the plant partner across the *Poaceae* (but not maize) is a factor conditioning interactions with bacterial taxonomic groups (but not necessarily functional groups) in the rhizosphere.

Keywords: Evolutionary history, *Zea mays*, *Poaceae*, Rhizosphere, 16S rDNA taxonomic microarray, Real time quantitative (RT) PCR, Nitrogen-fixing bacteria.





## Remerciements

J'adresse mes remerciements à Wafa Achouak, Philippe Lemanceau et Yves Vigouroux d'avoir accepté de juger ce travail, et à Maria Fernandez d'avoir présidé le jury de soutenance.

Je témoigne toute ma reconnaissance à Yvan Moëgne-Loccoz et à Daniel Muller pour leurs conseils tout au long de la thèse, leur encadrement, et leurs corrections apportées aux différents manuscrits. Ces quatre années à leurs côtés m'ont appris beaucoup, et même si nous n'étions pas d'accord certaines fois (notamment lors de discussions sur la génétique végétale), une bonne entente a toujours été présente, et je les en remercie.

Je remercie également Claire Prigent-Combaret, Frank Poly, Xavier Nesme et Florence Wisniewski-Dyé pour leurs discussions scientifiques et les conseils qu'ils m'ont donné au long de cette thèse. Je tiens aussi à remercier Marie-Andrée Poirier et Jacqueline Haurat pour leur aide technique. Enfin, je remercie tous les membres du laboratoire d'Ecologie Microbienne d'avoir été à mes côtés, dans les bons et les moins bons moments qui jalonnent une thèse.

Je remercie mes voisins de bureau, Corinne, Danis et Daniel, qui m'ont permis d'avoir une super ambiance de travail, même et surtout lors d'interminables journées avec R. Merci à Corinne pour ses bons gâteaux, à Danis pour ses conseils de geek, et bien sûr à Daniel, qui a été un voisin plein de blagues (parfois difficiles à suivre !) et de choccos, et qui a été un super compagnon de voyage en Australie, en plus d'être un bon chef.

Je remercie de tout mon cœur tous les étudiants et post-docs du laboratoire pour la bonne humeur, l'amitié, la rigolade et les soirées qu'on a pu partager ensemble. Je tiens particulièrement à remercier mes bucks, Step et Jeanne. Les filles, sans vous ma vie à Lyon n'aurait pas été si sympa, vous avez toujours été un soutien primordial pour moi, et pour une fois j'ai l'occasion de vraiment vous remercier sans me faire engueuler, alors merci d'être comme vous êtes ! Je voudrais aussi remercier Tony, qui a été un fort bon soutien de promo, toujours là pour bouger en week end (même si j'ai eu de belles frayeurs et frissons...) et pour discuter, souvent autour d'un verre ! Merci à la triloc, Fred, Oliv et Vincent, pour les soirées mémorables chez eux, et tous les bons moments passés en leur compagnie. Moults remerciement à tous les étudiants ou assimilés pour les formidables moments que nous avons

partagé ensemble pendant 4 années, dans les salles de manip ou autres : Benoit, Juliana, David, Vincent, Arnaud, Laurine, Béné et Loïc, Martina, Nikita, Antho, Maxime, Arnault, Marie, Florent, Chouquette, Lulu, etc.

Je remercie évidemment ma famille, ma maman et mes grands-mères, qui ont toujours cru en moi, bien avant moi-même en fait, qui m'ont soutenu toute ma vie, et qui m'ont permis d'être là où j'en suis. Merci à toute ma famille pour leur soutien, leur amour, et leur sympathie ! Merci également à Thibaut, qui a été à mes côtés toutes ces années d'études, a cru en moi, m'a aidé à tenir le coup, et m'a montré que je pouvais faire de grandes choses.

Enfin, je dédie cette thèse à mon papa, qui n'a pas pu la voir, mais sans qui elle n'aurait pas eu lieu. Il a été la personne qui m'a intéressé à la science, et m'a encouragé à trouver ce qui me plaisait vraiment. J'aurai aimé qu'il me voit soutenir cette thèse, et qu'il soit fier de moi.

# Table des matières

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique : Influence de l'évolution sur les interactions biotiques .....</b>	<b>11</b>
Introduction .....	12
I/ Évolution et coévolution entre organismes .....	14
I.1 La coévolution proie/prédateur.....	14
I.2 La coévolution hôte/pathogène.....	21
I.3 La coévolution hôte-symbiote .....	23
II. Cas particulier de coévolution : les interactions plantes-bactéries phyto-bénéfiques.....	27
II.1 L'histoire évolutive des plantes .....	28
II.2 Impact de l'histoire évolutive végétale sur les étapes de la colonisation racinaire par les microorganismes .....	32
II.2.1 La chimioattraction.....	32
II.2.2 La colonisation .....	32
II.3 Les symbioses mutualistes .....	33
II.3.1 Les symbioses mycorhiziennes .....	33
II.3.2 Les symbioses plantes-bactéries .....	35
II.4 Les symbioses associatives .....	39
II.4.1 Les PGPR phytostimulatrices .....	40
II.4.2 Les PGPR phytoprotectrices.....	41
II.4.3 Bilan.....	41
III/ Impact de l'évolution des plantes sur les communautés microbiennes de la rhizosphère....	42
III.1 Hôte et communauté microbienne .....	43
III.1.1 Notion espèce, population et communauté .....	44
III.1.2 Outils d'étude de la communauté.....	44
III.1.3 Impact de l'histoire évolutive.....	46
III.2 Impact de l'histoire évolutive végétale sur la diversité microbienne du sol.....	48
III.2.1 Les communautés microbiennes endophytes .....	48
III.2.2 Les communautés microbiennes rhizosphériques .....	49
III.3 Impact de l'histoire évolutive végétale sur le fonctionnement microbien.....	50
Communautés fonctionnelles phyto-bénéfiques.....	51
Conclusion.....	53

**Partie expérimentale 1 : Influence de l'histoire évolutive du maïs sur la sélection bactéries du sol dans la rhizosphère ..... 55**

Introduction ..... 56

Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots ? ..... 56

    Abstract ..... 59

    Introduction..... 60

    Materials and methods ..... 62

        Selection of maize genotypes ..... 62

        Greenhouse experiment..... 62

        Microarray analysis of rhizosphere samples ..... 63

        Analysis of microarray data ..... 63

        Quantitative PCR..... 64

        Comparison of genetic distance between maize inbred lines with rhizobacterial community molecular data ..... 65

    Results..... 67

        Genetic comparison of maize groups ..... 67

        16S Microarray analysis of the rhizosphere effect of seedlings ..... 70

        Effect of maize groups on rhizobacterial community ..... 70

        Validation of selected microarray results by qPCR and sequencing ..... 73

        Relation between maize diversity and rhizobacterial diversity based on distance analyses73

    Discussion..... 75

    Acknowledgement ..... 78

    Data Accessibility : ..... 78

    Supporting Information..... 79

    References..... 85

**Partie expérimentale 2 : Influence de l'évolution des céréales (Poaceae) sur la composition de la communauté bactérienne rhizosphérique..... 91**

Introduction ..... 92

Significance of the evolution of *Zea mays* and other Poaceae for rhizobacterial community composition ..... 94

Abstract..... 95

Introduction..... 96

Materials and methods ..... 98

    Plant genotypes ..... 98

    Greenhouse experiment..... 99

    Extraction and labeling of soil DNA..... 99

    Microarray analysis ..... 100

    Data analysis ..... 101

Results..... 101

    Bacterial community composition ..... 101

    Rhizosphere and plant genotype effects..... 102

    Effect of field management and plant growth stage on the rhizosphere effect ..... 104

    Relationship between maize/Poaceae evolution and rhizobacterial community ..... 106

Discussion ..... 110

References..... 124

## **Partie expérimentale 3 : Influence de l'évolution des céréales (Poaceae) sur un groupe fonctionnel phytobénéfique ..... 131**

Introduction .....	132
Did plant evolutionary history shaped diazotroph diversity and <i>nifH</i> expression in the rhizosphere ?.....	134
Abstract.....	135
Introduction.....	136
Materials and methods .....	138
Plant genotypes and greenhouse experiment .....	138
Extraction of soil DNA and RNA .....	138
cDNA synthesis by reverse transcription .....	139
Quantitative PCR and quantitative RT-PCR.....	139
T-RFLP analysis.....	140
Statistics .....	140
Results.....	142
Size of diazotroph communities.....	142
<i>nifH</i> transcript levels in diazotroph communities .....	144
Diversity of diazotroph communities.....	144
Relationship between Poaceae phylogeny and diazotroph community .....	147
Relationship between plant development and diazotroph community.....	147
Discussion .....	149
References.....	151
Données supplémentaires : Cinétique de la taille de la communauté des microorganismes fixateurs d'azote .....	157

## **Discussion générale et perspectives ..... 159**

Influence de l'histoire évolutive sur la diversité bactérienne rhizosphérique.....	161
Influence de l'histoire évolutive sur les communautés bactériennes phytobénéfiques .....	164
Conclusion.....	167

## **Références bibliographiques ..... 169**

## **Annexe ..... 207**

---

# Introduction générale

---



Depuis l'apparition des toutes premières formes de vie il y a environ 4 milliards d'années, la biosphère et la géosphère ont évolué conjointement (Line 2002 ; Newman et Banfield 2002). La vie a colonisé tous les milieux et s'est adaptée progressivement aux environnements chimiques présents, ce qui a conduit à une très grande biodiversité. Ainsi, les microorganismes procaryotes actuels présentent une très grande diversité de métabolismes jouant des rôles clefs dans les cycles biogéochimiques, tels que les cycles de l'azote ou du carbone (Falkowski *et al.* 2008). Parallèlement aux interactions abiotiques, les microorganismes se sont diversifiés en coévoluant avec des organismes eucaryotes, développant des interactions délétères ou bénéfiques (Zilber-Rosenberg et Rosenberg 2008). Ainsi les communautés de microorganismes influent le développement et/ou la santé des organismes supérieurs avec lesquels elles interagissent (Richardson *et al.* 2009 ; Raaijmakers *et al.* 2009 ; Chaucheyras-Durand et Durand 2010). Parmi ces interactions procaryotes - eucaryotes, celles entre bactéries et plantes sont particulièrement nombreuses, du fait d'une grande diversité des partenaires et des processus de coévolution (Lambers *et al.* 2009).

Les plantes ont colonisé les milieux terrestres il y a environ 500 millions d'années (Gensel 2008), et leur évolution a conduit à la formation des dicotylédones et des monocotylédones incluant les *Poaceae* (Magallón et Castillo 2009). Cette thèse s'intéresse plus particulièrement aux *Poaceae*, dont les différentes espèces ont divergé il y a 65 millions d'années (Paterson *et al.* 1995). Les *Poaceae* ont ensuite évolué rapidement, il y a environ 13000 ans, suite au passage de sociétés de chasseurs-cueilleurs à des sociétés sédentaires pratiquant l'agriculture. Cette transition sociétale s'est accompagnée de la domestication d'espèces notamment végétales, afin de limiter les risques de famine liés à des variations environnementales erratiques (Diamond 2002 ; Purugganan et Fuller 2009). La domestication a entraîné des changements phénotypiques importants permettant une culture plus aisée des plantes. Dans le cas des céréales, cette domestication a notamment été effectuée en sélectionnant les plantes ayant (i) des grains plus gros, qui contenaient de plus grandes ressources nutritives et donnaient à leur tour des plantes plus grandes, et (ii) des épis dont les grains ne se détachaient pas, afin de pouvoir tous les récolter au même moment et les stocker (Purugganan et Fuller 2009). Ces deux modifications morphologiques, bien qu'ayant été mises en place en 500 à 1000 ans pour la taille des grains et en 1000 à 2000 ans pour l'absence de dispersion des grains (Fuller 2007), sont considérées comme rapides à l'échelle de l'histoire évolutive des plantes.

Suite à leur domestication, les différentes espèces végétales ont été disséminées à travers le monde, de façon plus au moins étendue selon l'espèce étudiée (Dubreuil *et al.*

2006), conduisant à la formation et la sélection de nouvelles variétés mieux adaptées aux conditions environnementales locales. Les agriculteurs cherchant en permanence à améliorer le rendement et le pouvoir nutritionnel de ces plantes, cette évolution dirigée par l'homme a continué pour ces différentes variétés pendant des millénaires, structurant alors de nouveaux groupes génotypiques, sous-espèces et/ou espèces végétales, dérivées d'un même ou de plusieurs ancêtres communs (Salamini *et al.* 2002). Ainsi, à partir de la domestication d'une téosinte (*Zea mays ssp. parviglumis*) au Mexique (Doebley 2004), cinq groupes génétiques principaux de maïs répartis à travers le monde se sont formés (Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006). De même, pour le riz (*Oryza sativa*) deux sous-espèces : *indica* et *japonica* ont été générées à partir de *O. rufipogon* (Vaughan *et al.* 2008). Enfin, plusieurs espèces de blé (*Triticum*) dérivées de *T. urartu*, *T. boeoticum* et *T. dicoccoides* sont retrouvées de nos jours (Salamini *et al.* 2002). Les plantes ont donc fortement évolué suite à leur domestication, ce qui a conduit à une variation de propriétés phénotypiques selon les différentes variétés d'une même plante.

Parmi ces modifications phénotypiques, un certain nombre concerne le système racinaire, par exemple au niveau de sa morphologie et ou de la composition des exsudats racinaires (Czarnota *et al.* 2003 ; de Dorlodot *et al.* 2007 ; Comas et Eissenstat 2009). Or, certaines de ces modifications vont moduler l'impact des racines sur les propriétés (porosité, substrats carbonés exsudés, minéraux, pH, potentiel redox, etc.) du sol situé immédiatement au contact de la plante, c'est-à-dire la rhizosphère (Hiltner 1904 ; Callot *et al.* 1982 ; Lynch et Whipps 1990 ; Gransee et Wittenmayer 2000 ; Hartmann *et al.* 2008 ; Hinsinger *et al.* 2009). La rhizosphère comprend une grande diversité de microorganismes, notamment au niveau du sol rhizosphérique (Kyselková *et al.* 2009 ; Gomes *et al.* 2010 ; Somenahally *et al.* 2011), qui peut contenir jusqu'à  $10^{10}$  bactéries par gramme de sol (Gans *et al.* 2005 ; Roesch *et al.* 2007). Les racines peuvent donc influencer directement sur les communautés microbiennes eucaryotes et procaryotes présentes dans le sol (Siciliano *et al.* 1998 ; Bais *et al.* 2006 ; van Overbeek et van Elsas 2008 ; Inceoglu *et al.* 2010). En effet, la rhizosphère est une zone fortement active où ont lieu de nombreux dialogues entre la plante et les bactéries (Somers *et al.* 2004 ; Bais *et al.* 2006 ; Cooper 2007 ; Pothier *et al.* 2007 ; Badri *et al.* 2009). Les interactions qui en découlent peuvent avoir plusieurs conséquences. La plante peut tirer profit de ces interactions, en termes de croissance et/ou de santé (Raaijmakers *et al.* 2009 ; Richardson *et al.* 2009), et en parallèle les microorganismes vont bénéficier des substrats présents dans les exsudats (Gransee et Wittenmayer 2000 ; Badri et Vivanco 2009). Ces interactions peuvent également être délétères pour la plante, lorsqu'il s'agit de microorganismes phytopathogènes

(Raaijmakers *et al.* 2009), et/ou pour les microorganismes quand les plantes exsudent des composés antimicrobiens (Brigham *et al.* 1999 ; Bais *et al.* 2006 ; González-Lamothe *et al.* 2009). Enfin, de nombreuses interactions entre plante et microorganismes du sol n'ont pas au final de conséquences marquées et correspondent donc à des interactions neutres.

Bien que les microorganismes du sol puissent influencer sur la croissance et la santé des plantes, depuis une centaine d'années la révolution agricole des pays développés, aussi appelée révolution verte, a amélioré les rendements agricoles sans prendre en compte cette dimension microbienne. La révolution verte passe d'une part par le développement d'hybrides issus du croisement de lignées ayant des particularités phénotypiques d'intérêt agronomique (Khush 2001). Ainsi, depuis 50 ans déjà, plus de 80% du maïs cultivé aux États-Unis correspond à des hybrides (Labate *et al.* 2003). D'autre part, une hausse du rendement agricole est obtenue grâce à des intrants chimiques, tels que des fertilisants et des pesticides (FAO 2003). Leur impact sur l'environnement est important (Matson *et al.* 1997), car ils peuvent conduire à la pollution des nappes phréatiques via le lessivage de nitrate ou de pesticides (Gregory *et al.* 2002 ; Almasri et Kaluarachchi 2007 ; Nouri *et al.* 2008), à l'émission de gaz à effet de serre (Gregory *et al.* 2002 ; Philippot *et al.* 2009), à la contamination des eaux de surface par ruissellement (Gregory *et al.* 2002 ; Ribbe *et al.* 2008), à l'accumulation de résidus de pesticides dans les plantes (González-Rodríguez *et al.* 2008 ; Amvrazi et Albanis 2009 ; Neamtu *et al.* 2010), et même dans certains cas à une diminution de la diversité microbienne du sol (Baxter et Cummings 2008 ; Hussain *et al.* 2009). Aussi, de nouvelles approches d'intensification écologique sont actuellement considérées (Richardson *et al.* 2009 ; Weyens *et al.* 2009, Compant *et al.* 2010), afin d'aboutir à ce que Den Herder et collègues (2010) qualifient de nouvelle révolution verte. Ceci passe par exemple par l'utilisation de plantes ayant une architecture racinaire permettant d'optimiser l'acquisition des nutriments, et également par le développement de biofertilisants tels que des microorganismes phytobénéfiques afin de diminuer les quantités d'intrants (Lugtenberg et Kamilova 2009 ; Meyer *et al.* 2010 ; Saharan et Nehra 2011).

Parmi les relations bénéfiques existant entre les plantes et les microorganismes, deux types d'interactions symbiotiques peuvent être distinguées. La première, la symbiose mutualiste, est considérée comme une interaction forte entre les deux partenaires, et dans le cas des microorganismes associés aux plantes elle implique souvent une différenciation morphologique chez l'un ou les deux partenaires (Provorov et Vorobyov 2009 ; Kucho *et al.* 2010 ; Hocher *et al.* 2011). Les symbioses mutualistes les plus étudiées impliquent des bactéries fixatrices d'azote telles *Rhizobium* ou autres (et des *Fabaceae*), ou *Frankia* (et des

plantes actinorhiziennes) (Giraud *et al.* 2007 ; Normand *et al.* 2007 ; Pawlowski et Sprent 2008 ; Franche *et al.* 2009 ; Masson-Boivin *et al.* 2009 ; Hocher *et al.* 2011), ainsi que les champignons mycorhiziens et la plupart des espèces végétales (Marmeisse *et al.* 2004 ; Guidot *et al.* 2005 ; Parniske 2008). Le second type de symbiose correspond à la symbiose de type associative, ou coopération, et est considérée comme une interaction facultative entre les deux partenaires. Cette symbiose implique des microorganismes fongiques ou bactériens stimulateurs de la croissance des plantes (appelés dans le second cas des *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* ou PGPR ; Raaijmakers *et al.* 2009 ; Richardson *et al.* 2009 ; Saharan et Nehra 2011), et ils peuvent présenter deux types d'activités phytobénéfiques, à savoir la phytostimulation (appelée quelquefois aussi biofertilisation) et la phytoprotection (Couillerot *et al.* 2009 ; Lugtenberg et Kamilova 2009 ; Raaijmakers *et al.* 2009). Les PGPR phytostimulatrices ont un effet direct sur la croissance de la plante, par exemple via la fixation de l'azote atmosphérique (nutrition azotée), la synthèse de phytohormones ou en interférant avec le métabolisme de l'éthylène (croissance racinaire ; voir Chapitre I ; El Zemrany *et al.* 2006 ; Herridge *et al.* 2008 ; Prigent-Combaret *et al.* 2008 ; Bashan et de-Bashan 2010). Les PGPR phytoprotectrices agissent directement sur la plante en induisant une résistance systémique chez cette dernière, ou indirectement en inhibant la croissance ou l'activité de phytoparasites microbiens ou végétaux, via la synthèse d'antimicrobiens (Couillerot *et al.* 2009 ; Kinkel *et al.* 2011). Certaines PGPR présentent à la fois des activités phytostimulatrices et phytoprotectrices (Blaaha *et al.* 2006 ; Spaepen *et al.* 2007).

Les bactéries se sont différenciées au cours de l'évolution, jusqu'à former une multitude de taxons interagissant avec des plantes, et dont certains sont constitués ou contiennent des PGPR. Les plantes ont de leur côté développé des spécificités, et nous pouvons penser que l'évolution des plantes a entraîné des pressions de sélection sur les bactéries du sol qui sont variables selon le génotype végétal. C'est peut-être un facteur important pour le recrutement de bactéries bénéfiques dans la rhizosphère. Néanmoins, très peu d'études ont visé à décrypter l'influence de l'évolution végétale sur les partenaires bactériens. Connaître l'impact de l'histoire évolutive des plantes sur le recrutement bactérien dans le sol permettrait de mieux comprendre et d'améliorer le fonctionnement des deux partenaires de l'interaction. C'est le fonctionnement de la communauté microbienne rhizosphérique totale -c'est à dire l'association d'un grand nombre d'interactions bénéfiques ou délétères- qui influence le développement des plantes. Or, seules des coévolutions plante-symbiote fixateur d'azote ont été analysées pour des genres bactériens spécifiques (Parker et Spoerke 1998 ; Martínez-Romero 2009 ; Popovici *et al.* 2010). Tandis que des études récentes

suggèrent une relation entre les groupes phylogénétiques ou espèces d'hôtes eucaryotes animaux et la composition des communautés bactériennes associées, dans le cas des communautés bactériennes en interaction avec des mammifères (Ley *et al.* 2008a) ou des insectes (Chen *et al.* 1999; Moran *et al.* 2008), aucune analyse portant sur l'impact de l'histoire évolutive des plantes sur leur communauté bactérienne rhizosphérique associée n'existe. Les bactéries associées aux hôtes animaux, qui ont un rôle dans le mode d'alimentation ou la santé de l'hôte, résultent d'une spécificité d'interaction au niveau cellulaire, aussi appelée coévolution au niveau moléculaire (Pazos et Valencia 2008). Des mécanismes comparables d'interaction cellulaire ont été mis en place au cours de l'évolution par les plantes pour le recrutement des bactéries du sol, comme cela a été démontré dans le cas d'interactions hôte-pathogènes (Stahl et Bishop 2000 ; Anderson *et al.* 2010 ; Schulze-Lefert et Panstruga 2011), et ils pourraient concerner l'ensemble de la communauté bactérienne. Il est connu que différentes variétés d'une même espèce de plante peuvent sélectionner des communautés bactériennes différentes (Siciliano *et al.* 1998 ; Knauth *et al.* 2005 ; van Overbeek et van Elsas 2008 ; Aira *et al.* 2010 ; Inceoglu *et al.* 2010). De même, le génotype de plante influe sur le recrutement de groupes fonctionnels de bactéries au niveau de leur abondance (Picard et Bosco 2006 ; Coelho *et al.* 2009 ; Meyer *et al.* 2010), diversité (Engelhard *et al.* 2000 ; Knauth *et al.* 2005 ; Coelho *et al.* 2009 ; Meyer *et al.* 2010) et/ou activité (Okubara et Bonsall 2008 ; Abi-Ghanem *et al.* 2010). Toutefois, le rôle de l'histoire évolutive des plantes dans ces différences de recrutement des bactéries du sol reste inconnu. On peut donc se demander si l'histoire évolutive des végétaux va jouer sur certaines populations bactériennes particulières ou sur l'ensemble de la communauté, et à quel niveau taxonomique des plantes cet impact va se manifester.

Notre hypothèse de travail est que les phénomènes de coévolution entre un hôte végétal et les communautés bactériennes associées sont importants. Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse était de caractériser l'impact de l'histoire évolutive des plantes, et plus particulièrement celle des *Poaceae*, sur la communauté bactérienne rhizosphérique. Cet objectif se subdivise en deux objectifs particuliers, qui concernent les deux modes de définition des communautés microbiennes.

D'une part, une communauté bactérienne peut être considérée en termes taxonomiques, c'est-à-dire au niveau de la composition en taxons (espèces, genres, etc.). Dans ce cas, des techniques de biologie moléculaire ciblant le gène codant la petite sous-unité de l'ARN ribosomal, l'ADNr 16S, sont le plus souvent utilisées (Armougom et Raoult 2009 ; Kyselková *et al.* 2009 ; Sanguin *et al.* 2009 ; Caporaso *et al.* 2010), car elles permettent de

s'affranchir d'étapes de culture (qui ne permettent de retrouver que 0,1 à 1% des bactéries présentes dans le sol ; Torsvik et Øvreås 2002). De plus, ce gène est ubiquiste et relativement conservé chez toutes les bactéries, sa longueur (1500 pb) permet d'obtenir suffisamment d'informations pour des études phylogénétiques, et les distances entre les séquences d'ADNr 16S reflètent largement les distances évolutives entre les organismes (Woese 1987), même si des transferts horizontaux sont possibles (Schouls *et al.* 2003).

D'autre part, la communauté bactérienne peut être considérée au niveau des différentes communautés ou groupes fonctionnels qui la composent. A chaque fonction biologique va correspondre un groupe fonctionnel d'organismes, qui appartiennent généralement à des taxons différents (Poly *et al.* 2001 ; Spaepen *et al.* 2007 ; Prigent-Combaret *et al.* 2008) et donc les relations entre groupes fonctionnels et groupes taxonomiques sont souvent rares. Certains gènes codant une fonction donnée sont suffisamment conservés chez les différents taxons impliqués pour permettre une étude de la totalité de la communauté fonctionnelle, les parties plus variables du gène pouvant quelquefois être utilisées pour la caractérisation taxonomique des membres du groupe. L'étude d'une communauté fonctionnelle permet de considérer les organismes possédant cette fonction (copies du gène), la fraction active de cette communauté et son fonctionnement (expression du gène), et procure ainsi une vision des processus biogéochimiques ou des interactions biotiques correspondants (Patra *et al.* 2006 ; Niboyet *et al.* 2011 ; Uroz *et al.* 2011).

Dans ce contexte, le premier objectif de la thèse était de déterminer si l'histoire évolutive des *Poaceae* avait un impact sur la composition taxonomique de la communauté bactérienne rhizosphérique totale, en se plaçant à la fois au niveau infraspécifique (entre lignées de maïs) et interspécifique chez les *Poaceae*. Pour cela, la communauté bactérienne rhizosphérique totale a été analysée grâce à une puce à ADN taxonomique développée au laboratoire (Sanguin *et al.* 2006 ; Kyselková *et al.* 2009) et ciblant l'ARNr 16S. Les résultats de composition de la communauté bactérienne ont ensuite été comparés à la structuration génétique des plantes, ainsi qu'aux distances (phylo)génétiques entre lignées ou espèces végétales.

Le deuxième objectif de la thèse était de déterminer si l'histoire évolutive des *Poaceae* influençait le recrutement et le fonctionnement d'une communauté fonctionnelle de bactéries. Le groupe fonctionnel choisi est celui des bactéries fixatrices d'azote, car il a un rôle important dans le développement de la plante (Franche *et al.* 2009) et correspond majoritairement (mais pas uniquement ; Lugtenberg et Kamilova 2009 ; Richardson *et al.* 2009) à un groupe de PGPR. En effet, l'azote est une ressource minérale essentielle mais

limitante pour le développement des plantes (Herridge *et al.* 2008), et dans le sol une part importante de l'azote est présente sous la forme de gaz N<sub>2</sub>, indisponible pour les végétaux. La fixation de l'azote s'effectue via un complexe enzymatique appelé nitrogénase, composée de deux sous-unités, dont la nitrogénase réductase codée par le gène *nifH* (Dixon et Kahn 2004). Ce gène a été largement utilisé pour l'étude des microorganismes fixateurs d'azote (Coelho *et al.* 2009; Prakamhang *et al.* 2009; Castro-González *et al.* 2011 ; Turk *et al.* 2011), car il est hautement conservé entre les différents diazotrophes, et sa phylogénie est fortement corrélée à celle de l'ADNr 16S (Zehr *et al.* 2003), ce qui en fait le marqueur de choix pour étudier les communautés diazotrophes du sol. Dans cette thèse, la taille de cette communauté fonctionnelle et la quantité de transcrits dans la rhizosphère de différents génotypes de plantes ont été mesurées par PCR quantitative, et la diversité des gènes et des transcrits *nifH* a été étudiée par T-RFLP, afin de déterminer l'impact de l'histoire évolutive des *Poaceae* sur cette communauté fonctionnelle.

Ce manuscrit comporte cinq chapitres. Le premier chapitre est une synthèse bibliographique concernant l'impact de l'histoire évolutive des hôtes eucaryotes sur les communautés bactériennes associées, en traitant des étapes de colonisation impliquées et des conséquences sur les populations présentes, en termes de taille, de diversité et de fonctionnement. Le deuxième chapitre traite de l'impact de l'histoire évolutive du maïs sur la composition taxonomique de la communauté bactérienne totale. Pour cette étude, deux lignées pures appartenant aux cinq groupes génétiques de maïs présents à travers le monde ont été cultivées dans du sol, en conditions de serre. La composition de la communauté bactérienne rhizosphérique, obtenue par puce à ADN taxonomique 16S, a été comparée à la structuration des groupes génétiques de maïs et aux distances génétiques entre lignées (Partie expérimentale 1). Le troisième chapitre concerne l'évolution des *Poaceae* et leur impact sur la composition taxonomique des communautés bactériennes totales associées. L'histoire évolutive des céréales (*Poaceae*) a été prise en compte en étudiant quatre lignées de maïs (issues de deux groupes génétiques) et différentes céréales plus ou moins éloignées phylogénétiquement du maïs. La composition de la communauté rhizobactérienne obtenue par puce à ADN taxonomique 16S a été comparée aux distances phylogénétiques entre ces différentes céréales (Partie expérimentale 2). Le quatrième chapitre correspond à l'étude de la communauté fonctionnelle des bactéries fixatrices d'azote en fonction des différentes *Poaceae* utilisées dans le chapitre précédent (à savoir la partie expérimentale 2), en termes d'effectif (PCR quantitative sur les gènes *nifH*) et d'expression génique (RT PCR quantitative sur les transcrits *nifH*) de cette communauté. Une étude de la diversité de cette communauté

## *Introduction générale*

fonctionnelle a également été mise en place, par T-RFLP sur l'ensemble des échantillons (Partie expérimentale 3). Le cinquième chapitre correspond à une discussion et une conclusion générale de la thèse, ainsi qu'à l'ouverture de nouvelles perspectives.





---

## Synthèse bibliographique

# Influence de l'évolution sur les interactions biotiques

---

## Introduction

L'apparition de la vie et l'évolution des organismes depuis des milliards d'années restent des domaines mal compris et sujets à de nombreuses théories. Néanmoins, certaines données nous permettent de mieux cerner la chronologie de l'évolution de la vie. Les premières formes de vie seraient apparues dans les océans il y a environ 3,8 milliards d'années sous formes de protobactéries chimiosynthétiques (Nisbet et Sleep 2001). Les interactions des cellules primitives avec le milieu abiotique auraient permis la mise en place des principaux métabolismes chimiolithotrophes et organotrophes (Bayman *et al.* 2003). L'activité métabolique primitive contribua à l'évolution de l'environnement, entraînant les adaptations des organismes cellulaires (Ragan *et al.* 2009). Ces protobactéries seraient à l'origine du dernier ancêtre commun LUCA (*last universal common ancestor*) aux bactéries, archées et eucaryotes (Forterre *et al.* 2005). Toutefois, en l'absence de fossiles l'évolution de la vie dans les premiers temps géologiques reste sujette à controverse.

Les stromatolithes sont les plus anciennes structures fossiles d'origine biologique connues (dès 3,5 milliards d'années environ ; Allwood *et al.* 2009). Ce sont des constructions sédimentaires (le plus souvent) carbonatées, formées d'une superposition de lamines millimétriques précipitées par l'activité biochimique de micro-organismes, principalement des bactéries photosynthétiques (cyanobactéries). Leur existence de façon si précoce dans les enregistrements fossilifères démontre que les cyanobactéries sont un groupe de bactéries qui s'est différencié très tôt. En particulier, les cyanobactéries seraient les seuls organismes photosynthétiques présents au moment où l'atmosphère est devenue oxydante, c'est à dire responsables de l'évolution vers une atmosphère moderne riche en O<sub>2</sub>.

Par la suite, des fusions de cellules procaryotes auraient généré les premières cellules eucaryotes pourvues d'un noyau et de mitochondries (de Duve 2007 ; Gross et Bhattacharya 2009). Ces eucaryotes primitifs seraient apparus il y a environ 2,7 milliards d'années d'après l'étude de biomarqueurs hydrocarbonés (Brocks *et al.* 1999), ou il y a 1,8 milliards d'années si on combine l'étude de fossiles à la phylogénie de gènes marqueurs (Parfrey *et al.* 2011). Très rapidement les eucaryotes se sont différenciés pour générer les trois règnes supérieurs classiques. Pour le règne végétal, certaines cellules auraient fusionné avec des bactéries photosynthétiques (cyanobactéries ancêtres des chloroplastes ; Cavalier-Smith 2000) pour former des algues unicellulaires, ancêtres des algues pluricellulaires à l'origine des plantes supérieures, il y a au moins 1,5 milliards d'années (Martin *et al.* 2003 ; Yoon *et al.* 2004). En

parallèle, d'autres types d'organismes unicellulaires ont évolué et généré le règne des champignons et celui des animaux, dont les plus vieux fossiles connus datent de 635 millions d'années (Peterson *et al.* 2008 ; Love *et al.* 2009).

L'enrichissement en oxygène de l'atmosphère eut pour conséquence la formation de la couche d'ozone. Cette couche d'ozone arrête la plupart des rayons UV nocifs pour les organismes et a rendu possible la colonisation des terres émergées par les êtres vivants dont les premiers ont été les végétaux, il y a environ 500 millions d'années (Kenrick et Crane 1997 ; Gensel 2008 ; Steemans *et al.* 2009). Depuis, la vie a continué à évoluer dans l'hydrosphère, la lithosphère et une partie de l'atmosphère, s'adaptant aux conditions environnementales changeantes et à l'évolution des interactions biotiques. Ainsi, les pressions de sélection entraînant l'évolution des individus sont de multiple nature dans un environnement donné et peuvent être liées (i) aux conditions naturelles environnantes abiotiques (pH, lumière, salinité, température...) ou (ii) aux interactions biotiques entre les organismes (symbiose mutualiste, compétition, prédation... ; Tableau 1).

**Tableau 1** : Tableau de coactions entre espèces différentes. Dajoz 2006.

<i>Types de coactions</i>	<i>Espèces réunies</i>		<i>Espèces séparées</i>	
	Espèce A	Espèce B	Espèce A	Espèce B
Neutralisme .....	0	0	0	0
Compétition .....	—	—	0	0
Mutualisme .....	+	+	—	—
Coopération .....	+	+	0	0
Commensalisme (A commensale de B) .....	+	0	—	0
Amensalisme (A amensale de B) .....	—	0	0	0
Parasitisme (A parasite, B hôte) .....	+	—	—	0
Prédation (A prédateur, B proie) .....	+	—	—	0

0 : les espèces ne sont pas affectées dans leur développement.  
 + : le développement de l'espèce est rendu possible ou amélioré.  
 — : le développement de l'espèce est réduit ou rendu impossible.

Dans ce chapitre, nous focaliserons essentiellement sur les interactions biotiques, car elles ont conduit à une grande diversité suite à l'influence réciproque des différents organismes impliqués dans l'interaction, qui ont conduit à une coévolution des partenaires. Nous ferons tout d'abord un bilan des différents types de coévolutions résultant de l'interaction prolongée de ces organismes, ainsi que des mécanismes d'interaction résultant de cette coévolution. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à un modèle de coévolution particulier, celui des interactions entre plantes et microorganismes du sol, en mettant en avant l'impact de l'histoire évolutive des plantes sur les communautés de bactéries phytobénéfiques. Enfin, nous étudierons un autre type d'interaction entre les plantes et les bactéries du sol, en focalisant sur l'impact de l'évolution des plantes sur la diversité et le fonctionnement des communautés microbiennes associées.

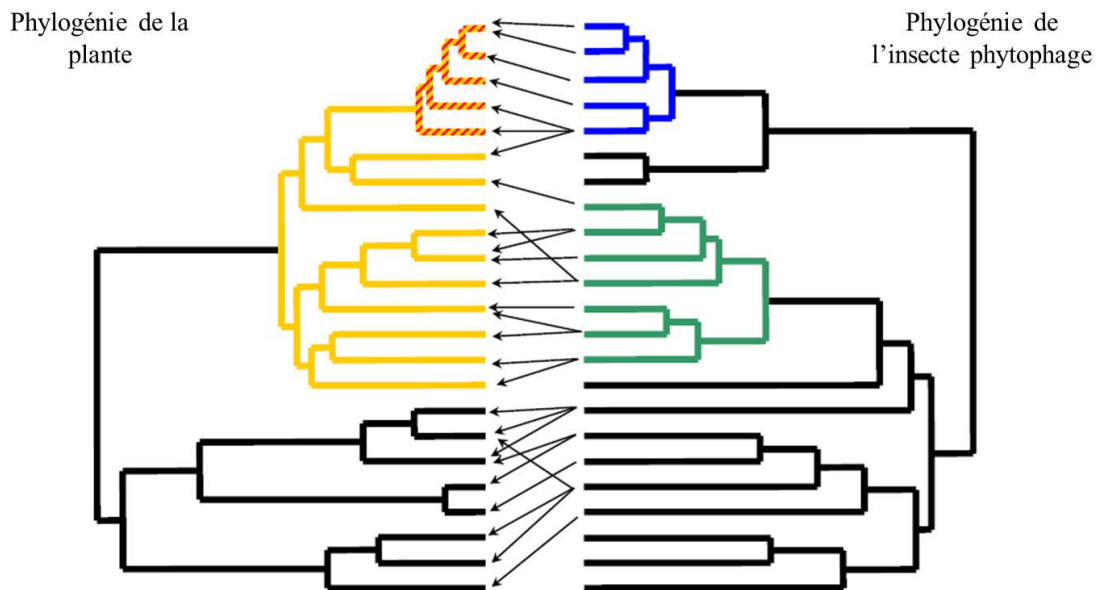
## **I/ Évolution et coévolution entre organismes**

L'évolution conjointe de différents organismes suite à leur interaction prolongée est aussi appelée coévolution. Ce terme a été utilisé pour la première fois par Ehrlich et Raven en 1964, qui l'ont défini comme une interaction entre deux ou plusieurs groupes majeurs d'organismes ayant une relation écologique proche et évidente. En résumé, la coévolution est un processus clef qui produit et maintient l'équilibre du réseau complexe des interactions entre espèces (Ehrlich et Raven 1964, Thompson 2005). Depuis, des phénomènes de coévolution ont été décrits pour un grand nombre d'espèces appartenant aux différents règnes vivants, et concernent différents types d'interactions (bénéfiques à délétères). Ils peuvent être étudiés à deux échelles évolutives : la macroévolution, qui compare plusieurs espèces et donc prend en compte l'histoire évolutive de ces espèces, et la microévolution, qui traite des différences génétiques existantes pour un trait donné et donc des traits moléculaires associés à ces interactions (Futuyma et Agrawal 2009). Dans ce chapitre, nous ferons le bilan des différents types de coévolutions connues (à l'échelle macroévolutive), en s'intéressant également à l'identification des différents mécanismes entrant en jeu dans la coévolution (à l'échelle microévolutive). Pour cela, nous traiterons des coévolutions entre deux partenaires particuliers : proies et prédateurs, hôtes et pathogènes, et hôtes et symbiontes.

### **I.1 La coévolution proie/prédateur**

Les coévolutions entre proies et prédateurs concernent des interactions entre espèces, et ont conduit à l'apparition d'une spectaculaire biodiversité. Un grand nombre d'études

traitent de la relation entre les plantes et leurs herbivores (notamment les insectes), car elle constitue l'un des maillons essentiels de la chaîne alimentaire. Cette interaction a d'ailleurs été le sujet de la première étude traitant de coévolution, effectuée par Ehrlich et Raven (1964). Ces derniers ont fait l'hypothèse qu'une plante, à chaque génération, améliore ses défenses chimiques ou en développe de nouvelles pour échapper aux insectes phytophages. En retour, de moins en moins d'insectes phytophages vont résister à ces toxines. Néanmoins certains insectes vont résister aux nouvelles molécules synthétisées par le végétal, et seront susceptibles d'engendrer une descendance capable de résister aux toxines. En retour cette nouvelle génération va pouvoir consommer plus de plantes, et seules les plantes qui synthétiseront une toxine différente vont pouvoir résister. Ces processus peuvent conduire à une radiation de l'espèce d'insecte, aboutissant à des espèces adaptées à des plantes différentes. Suite à ces évolutions successives, des insectes proches vont avoir tendance à utiliser des plantes proches, conduisant à une phylogénie comparable entre insectes phytophages et plantes, comme décrit par Futuyama et Agrawal (2009) (Figure 1).



**Figure 1** : Conceptualisation de l'hypothèse émise par Ehrlich et Raven de coévolution de type fuite et radiation. Dans ce scénario hypothétique, les flèches présentes entre les deux phylogénies représentent l'hôte utilisé comme nourriture. Pour la phylogénie de la plante, le noir indique le phénotype ancestral de défense, le jaune correspond à l'évolution de quelques nouvelles défenses, et le jaune hachuré de rouge indique l'évolution d'une nouvelle défense supplémentaire. L'évolution des contre-adaptations est indiquée de manière similaire pour la phylogénie de l'insecte phytophage. Futuyama et Agrawal 2009.

Dans de nombreuses études, la coévolution entre proies et prédateurs a été généralisée à un concept d'oscillation de populations antagonistes, suite à des changements adaptatifs de traits contrôlant l'interaction, résultant d'une évolution génétique ou d'une plasticité phénotypique (Mougi et Iwasa 2011). Ce concept, aussi appelé métaphore de la Reine Rouge<sup>1</sup> par van Valen (1973), met en évidence une adaptation d'une espèce pour augmenter sa performance ou sa survie vis-à-vis d'un ennemi naturel, qui en retour s'adapte et tend à restaurer l'équilibre initial des forces. Cette théorie, correspondant à une course à l'armement, a été largement utilisée pour modéliser les interactions entre proies et prédateurs (Abrams 2000 ; Fussmann *et al.* 2007 ; Mougi 2010). Cette théorie de la coévolution est issue de l'observation que la probabilité d'extinction d'une espèce ou d'un clade reste constante tout au long de son évolution dans le temps : l'effort d'adaptation d'une espèce n'atteint jamais complètement son but et est toujours à recommencer, indépendamment des changements de l'environnement physique.

Ce sont les facteurs biotiques qui constituent le principal moteur de l'évolution et l'essentiel de la pression de sélection qui s'exerce sur les êtres vivants. Chaque avancée évolutive d'une espèce face à son environnement contraint les autres à s'adapter en retour, car cette évolution des uns est perçue comme une détérioration de l'écosystème par les autres : les espèces sont obligées d'évoluer pour ne pas être dépassées par les organismes auxquels elles sont confrontées. Les événements adaptatifs des proies et des prédateurs sont parfois longs à se mettre en place, notamment à cause du temps de génération longs de certaines espèces. Toutefois, un grand nombre de ces modifications adaptatives des espèces de proies et de prédateurs sont aujourd'hui visibles dans la nature (Théry *et al.* 2005 ; Domenici *et al.* 2007 ; Fowler *et al.* 2009).

Les proies doivent en permanence trouver de nouvelles stratégies afin d'éviter leurs prédateurs. Une des stratégies majeures utilisées est le camouflage, qui permet aux espèces de se fondre de leur environnement et ainsi d'être moins visibles par les prédateurs. Un des exemples les plus connus est celui du papillon de nuit *Biston betularia*, qui existait

---

<sup>1</sup> La métaphore de la reine rouge a été inspirée du deuxième volet d'Alice au pays des merveilles – De l'autre côté du miroir de Lewis Carroll. L'extrait suivant illustre cette course ou rien ne bouge c'est à dire pour la coévolution garder le même équilibre d'interactions: - « Juste à ce moment, je ne sais pourquoi, (Alice et la Reine Rouge) se mirent à courir. Ce qu'il y avait de plus curieux, c'est que les arbres et tous les objets qui les entouraient ne changeaient jamais de place : elles avaient beau aller vite, jamais elles ne passaient devant rien. « Je me demande si les choses se déplacent en même temps que nous ? » pensait la pauvre Alice, tout intriguée. Et la Reine semblait deviner ses pensées, car elle cria : « Plus vite ! Ne parle pas ! »(...) Alice regarda autour d'elle d'un air stupéfait. - Mais voyons, s'exclama-t-elle, je crois vraiment que nous n'avons pas bougé de sous cet arbre ! Tout est exactement comme c'était ! - Bien sûr, répliqua la Reine ; comment voudrais-tu que ce fût ? - Ma foi, dans mon pays à moi, répondit Alice, encore un peu essoufflée, on arriverait généralement à un autre endroit si on courait très vite pendant longtemps, comme nous venons de le faire. - On va bien lentement dans ton pays ! Ici, vois-tu, on est obligé de courir tant qu'on peut pour rester au même endroit. »

initialement sous une forme claire (*typica*), et dont une forme sombre (*carbonaria*) a été sélectionnée à proximité des villes industrielles d'Angleterre à partir des années 1850 (Figure 2A). La forme *carbonaria* permettait à ces papillons d'être moins visibles par leurs oiseaux prédateurs lorsqu'ils se posaient en journée sur les troncs d'arbres devenus sombres suite au dépôt de charbon et de pollution atmosphérique résultant de l'industrialisation (Kettlewell 1961 ; Majerus 2009). Un grand nombre d'espèces a développé le camouflage dans l'environnement en modifiant leur couleur pour échapper aux proies (Oxford et Gillespie 1998 ; Théry et Casas 2002 ; Sacra Garcia et Sih 2003 ; Théry *et al.* 2005 ; Stuart-Fox *et al.* 2004 ; Adamo *et al.* 2006 ; Kelman *et al.* 2007 ; Stuart-Fox *et al.* 2008 ; Stevens et Merilaita 2009). D'autres formes de camouflage sont apparues au cours de l'évolution, comme (i) l'homotypie, où les espèces prennent la forme d'éléments inanimés tels que des feuilles, des pierres ou des brindilles, comme par exemple les phasmes (Figures 2B et 2C, Purser 2003 ; Skelhorn *et al.* 2010) (ii) l'aposématisme qui correspond à l'émission de signaux d'alarmes pour le prédateur comme des couleurs vives (Figure 2D ; Mappes *et al.* 2005 ; Merilaita et Tullberg 2005 ; Svádová *et al.* 2009), (iii) le mimétisme où les proies ressemblent à des espèces non comestibles par leur prédateur (Figure 2E ; Greene et McDiarmid 1981 ; Turner et Speed 1999 ; Turner 2006 ; Darst et Cummings 2006).

Le camouflage des proies est largement utilisé dans la nature, mais ne constitue pas le seul moyen de défense développé au cours de l'évolution. En effet, des structures défensives particulières sont également utilisées, comme les épines chez les plantes ou les piquants chez les animaux (Figures 3 ; Lev-Yadun 2001 ; Inbar et Lev-Yadun 2005). Le porc-épic a ainsi développé une défense basée sur un recouvrement d'une grande partie de son corps par des piquants, qui sont en fait une évolution des poils, afin de se protéger de ses prédateurs (Speed et Ruxton 2005 ; Chernova 2006). Enfin, une façon efficace d'échapper aux prédateurs a été de changer de physiologie, comme augmenter sa vitesse ou aiguïser ses sens, ce qui permet de visualiser ou de sentir le danger avant que le prédateur ne soit à portée, et donc de fuir avant d'être attaqué (Iriarte-Díaz 2002 ; Domenici *et al.* 2007 ; Jones *et al.* 2008 ; Müller-Schwarze 2009). Ainsi certains animaux comme les gazelles, peuvent presque atteindre les 100 km/h afin d'échapper aux lions ou aux guépards.

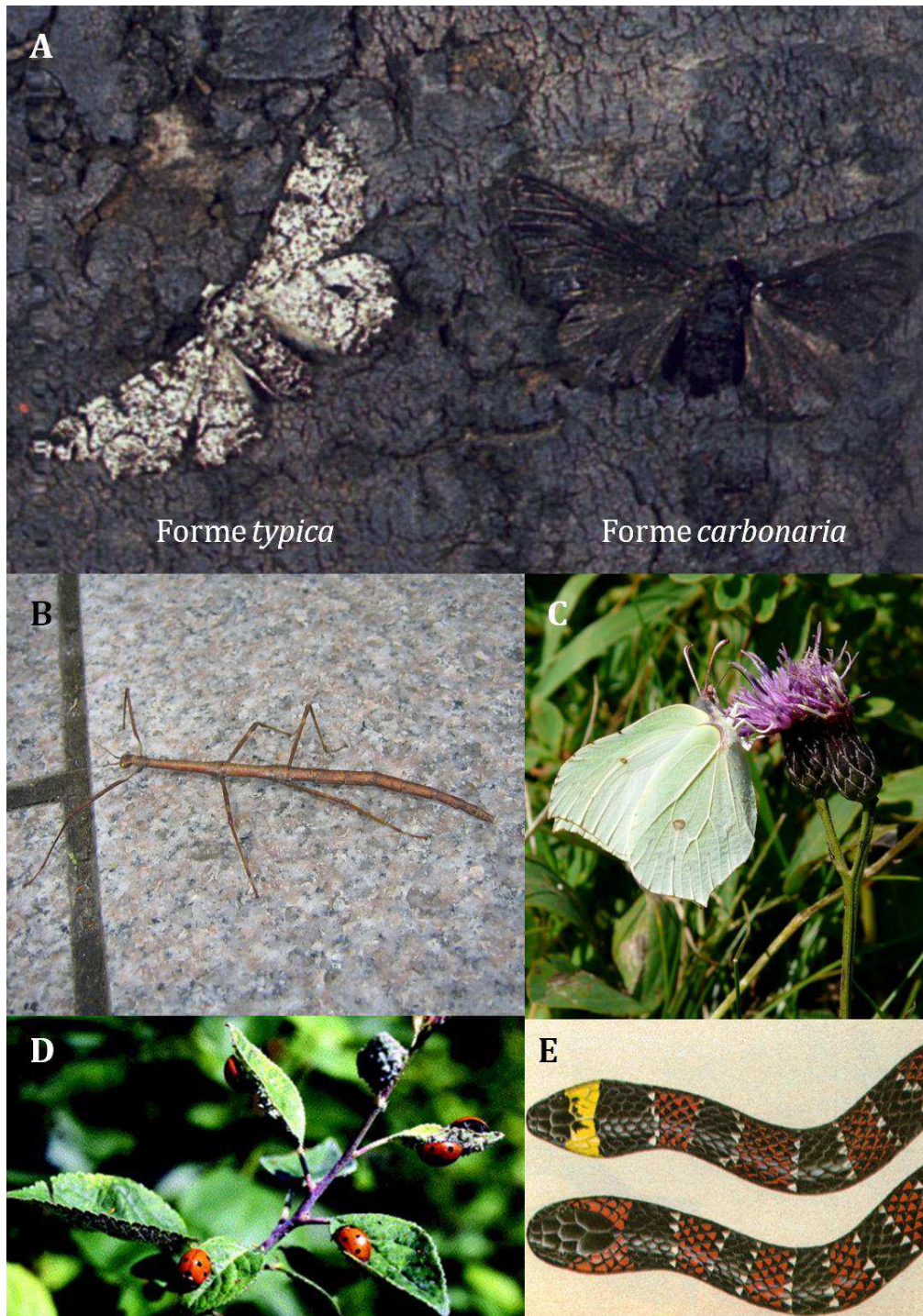
En réponse à cette course à la défense, l'évolution des prédateurs a emprunté différentes stratégies. Les modifications physiologiques sont prépondérantes dans l'évolution des prédateurs. Par exemple, l'acuité visuelle est souvent meilleure chez les prédateurs, car ils doivent repérer leurs proies bien avant l'attaque. Leur yeux sont généralement plus gros et placés sur le devant de la tête afin d'avoir une vision en trois dimensions et une meilleure



estimation des distances, alors que les proies ont les yeux sur le côté de la tête, ce qui leur permet d'avoir une vision plus large (Hall et Ross 2007 ; Martin 2007 ; Stobbe *et al.* 2009 ; Møller et Erritzøe 2010). Le meilleur exemple d'une vision très développée est celui des aigles, qui peuvent repérer leurs proies à plus de 30 km. L'odorat est également un sens très important chez les prédateurs (Amo *et al.* 2004 ; Hugues *et al.* 2010 ; Stevens 2010). Il permet ainsi à un requin de repérer ses proies à plusieurs kilomètres de distance, grâce à des cellules sensorielles extrêmement développées situées dans des cavités olfactives sous le museau (Tricas *et al.* 2009).

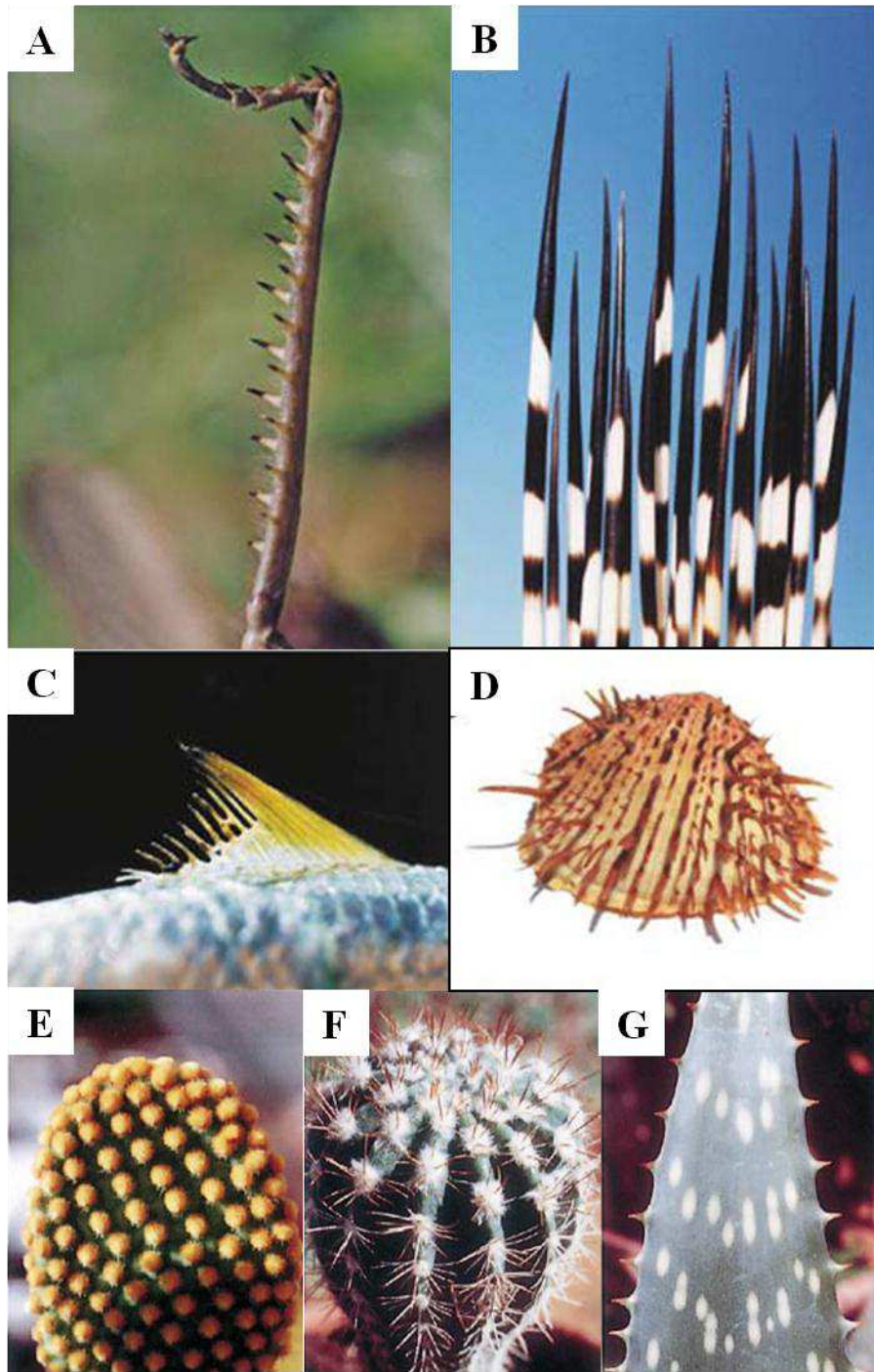
En plus de leurs sens exceptionnellement développés, les prédateurs ont développé des stratégies particulièrement efficaces de chasse. C'est le cas de phénotypes particuliers comme les becs, les crocs, les serres, ou le venin (Starkov *et al.* 2007 ; Barlow *et al.* 2009 ; Fowler *et al.* 2009), qui sont des structures permettant de tuer les proies en quelques secondes. Le venin est une substance hautement toxique, dont la composition varie en fonction du régime alimentaire du prédateur (Mackessy *et al.* 2006 ; Barlow *et al.* 2009). Enfin, de même que les sens, la vitesse est un élément essentiel chez les prédateurs, tout comme chez les proies. Le guépard en est l'évolution ultime, pouvant atteindre plus de 100 km/h (Sharp 1997), cette vitesse résultant d'une évolution des fibres musculaires et de la morphologie globale (Kohn *et al.* 2011).

Les interactions entre proies et prédateurs ont conduit à de nombreux phénomènes adaptatifs, et à l'apparition d'un grand nombre d'évolutions. Les exemples cités ci-dessus ne regroupent pas la totalité des techniques d'échappement aux prédateurs retrouvées dans la nature, mais permettent de mettre en évidence leur grande diversité et l'ingéniosité des adaptations. La théorie de la reine rouge, émise par van Valen, suggère que les espèces soumises à une pression de sélection doivent évoluer en permanence, et qu'ainsi les efforts d'adaptation sont à recommencer continuellement et que la probabilité d'extinction des espèces reste ainsi constante. On peut donc supposer que de nouvelles adaptations vont apparaître, toujours plus étonnantes, augmentant ainsi la biodiversité.



**Figure 2 :** Exemples de stratégies de camouflage des proies pour échapper aux prédateurs. (A) Sélection d'une couleur sombre (forme *carbonaria*) chez *Biston betularia* par rapport à la couleur initiale (forme *typica*), afin d'échapper aux oiseaux prédateurs lorsqu'ils se trouvaient sur des arbres noircis par la pollution résultant de l'industrialisation en Angleterre (H.B.D. Kettlewell, 1973, *Industrial Melanism*, Oxford Univ. Press, Oxford, U.K.). (B) Camouflage par homotypie des phasmes ou (C) des papillons. (D) Les coccinelles à sept points *Coccinella septempunctata* sont un exemple d'aposématisme. La coloration ostentatoire alerte les prédateurs de la toxicité des proies (Mappes *et al.* 2005). (E) Mimétisme de couleur du serpent *Micrurus langsdorffi* (en bas) par rapport à un autre serpent vivant dans la même région mais étant venimeux, *Erythrolamprus guentheri* (en haut). Greene et McDiarmid 1981.





**Figure 3 :** Epines ostentatoires dans le règne animal et végétal. (A) Epines du tibia postérieur de la sauterelle *Anacridium aegypticum*, (B) Epines noires et blanches du porc-épic indien aigrettes *Hystrix indica*, (C) Epines dorsales d'un rouget *Mullus* sp., (D) *Spondylus* sp., (E) Glochides jaunes sur *Opuntia microdasys*, (F) Epines de *Notocactus* sp., (G) Epines de *Aloe saponaria*. Inbar et Lev-Yadun 2005.

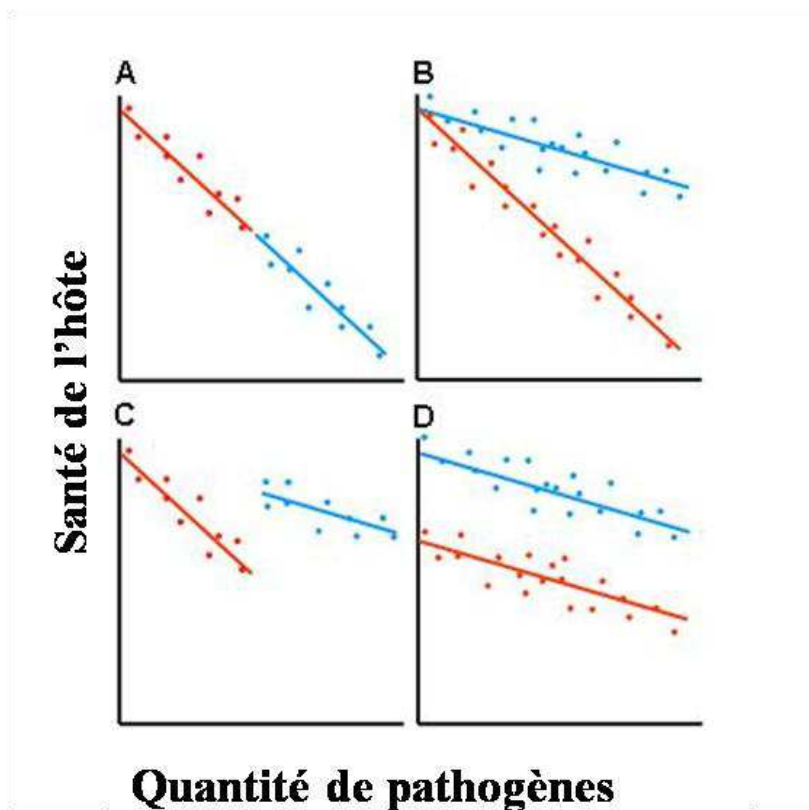
## I.2 La coévolution hôte/pathogène

Les études sur les relations entre hôtes et pathogènes sont souvent basées sur un concept d'interaction durable entre des couples d'espèces (Woolhouse *et al.* 2001 ; Crisholm *et al.* 2006). Or, des pathogènes peuvent souvent infecter un large spectre d'hôtes, et les hôtes sont également souvent au contact d'une grande variété de pathogènes. De même que dans l'interaction entre proies et prédateurs, une course à l'armement s'effectue entre les hôtes et leurs pathogènes. Cette course va aboutir à plusieurs stratégies adaptatives différentes, et notamment au niveau de la spécificité d'hôte des pathogènes, ou de la spécificité de lutte contre les pathogènes des hôtes (Saikkonen *et al.* 2004 ; Barrett *et al.* 2009).

La coévolution entre un hôte et ses pathogènes ou parasites favorise des modifications génétiques comme la recombinaison ou la mutation. Les mêmes phénomènes existent certainement pour la coévolution proies-prédateurs, mais sont surtout étudiés dans un contexte de coévolution hôtes-pathogènes. La recombinaison peut ainsi faire apparaître de nouveaux groupes génétiques d'espèces, et la mutation de nouveaux allèles de gènes non adaptés à l'autre partenaire (Fischer et Schmid-Hempel 2005 ; Pal *et al.* 2007). Ces modifications génétiques vont aboutir à l'apparition de nouvelles fonctions de défense chez l'hôte ou d'attaque chez le pathogène. La coévolution des hôtes et de leur pathogène ou parasite implique des adaptations coûteuses en énergie (Bergelson *et al.* 1996 ; Rausher 2001 ; Schulte *et al.* 2010), notamment lorsque de nouveaux métabolites sont produits comme des toxines, modifiant ainsi la fitness des partenaires (Simms et Rausher 1987 ; Forde *et al.* 2008). Ainsi, il a été montré qu'un champignon pathogène possédant un grand nombre de gènes de virulence (haute virulence) était sélectionné pour l'infection de plantes fortement résistantes aux pathogènes, mais émettaient peu de spores, alors qu'une souche pathogène moins virulente infectait des plantes sensibles en émettant un grand nombre de spores (forte agressivité), suggérant un coût à la production de gènes de virulence en quantité importante (Thrall et Burdon 2003).

Lorsqu'un hôte est attaqué par un pathogène, deux types de stratégies de défense peuvent être mis en place : la résistance et la tolérance (Read *et al.* 2008 ; Schneider et Ayres 2008 ; Medzhitov 2009). La résistance résulte de l'intervention du système immunitaire et limite la croissance du pathogène, dont un exemple bien connu comme la vaccination prouve son efficacité de lutte contre une infection. Le principe de la résistance repose sur une reconnaissance de l'agent pathogène par le système immunitaire, qui sera alors neutralisé par des effecteurs spécifiques. La tolérance est au contraire un mécanisme qui ne détruit pas

directement le pathogène mais limite son action nocive et permet ainsi d'augmenter la fitness de l'hôte (Read *et al.* 2008). Par conséquent, la résistance est définie comme l'inverse de la quantité de pathogène présente et donc plus la résistance de l'hôte augmente plus la quantité de pathogène présent diminue, alors que la tolérance est définie comme la pente de la réaction de l'hôte à l'infection, une pente faible représentant une forte tolérance (Figure 4). Ces deux mécanismes évolutifs de contrôle de la santé de l'hôte sont retrouvés aussi bien chez les animaux que chez les plantes (Rausher 2001 ; Råberg *et al.* 2009 ; Read *et al.* 2008 ; Schneider et Ayres 2008 ; Baucom et de Roode 2011).



**Figure 4 :** Figure schématique représentant la réaction de deux génotypes d'hôtes (lignes bleues et rouges) en sévérité de la maladie en réponse à des infections d'intensité différentes chez les individus hôtes (points). (A) Deux génotypes présentant la même tolérance mais de résistances différentes. Ici, le génotype rouge présente une plus faible quantité de parasites (plus résistant) et maintient ainsi une meilleure santé quand il est infecté. (B) Deux génotypes de résistance équivalente (même quantité de parasites) mais le génotype rouge est moins tolérant (déclin de la santé plus rapide avec une hausse de la quantité de parasites). (C) Les génotypes diffèrent au niveau de leur tolérance et de leur résistance. Le génotype de plus tolérant (bleu) est moins résistant, et les deux génotypes ont finalement en moyenne le même statut sanitaire quand ils sont infectés. (D) les génotypes hôtes ne diffèrent ni au niveau de leur résistance (même quantité de parasite moyen) ni au niveau de leur tolérance (même pente). Adapté de Read *et al.* 2008.

Ces deux stratégies de défense ne vont pas avoir le même impact évolutif sur le pathogène. Dans le cas de mécanismes de résistance de l'hôte, le pathogène va avoir tendance à développer des traits antagonistes pour pouvoir croître, alors que la tolérance va conduire à une plus longue vie de l'hôte, mais également du pathogène qui pourra vivre dans l'hôte, ce qui aboutit à une plus faible pression de sélection et donc à une évolution moins rapide des deux partenaires (Svensson et Raberg 2010 ; Baucom et de Roode 2011). De plus, des études ont montré que ces deux mécanismes n'évoluent pas de la même manière. Les hôtes utilisant une stratégie de résistance vont évoluer par polymorphisme et non par fixation d'un trait spécifique dans une population. En effet, si les gènes conférant une résistance sont diffusés à travers toute la communauté des hôtes, l'infection des hôtes par ce pathogène va disparaître, et les gènes de résistance deviennent alors un fardeau génétique (Roy et Kirchner 2000 ; Miller *et al.* 2005). Par contre, les mécanismes de tolérance vont avoir tendance à être fixés, car leur diffusion à travers la communauté ne va pas empêcher la transmission du pathogène (Roy et Kirchner 2000 ; Miller *et al.* 2005).

En conclusion, résistance et tolérance jouent un rôle important dans l'écologie et l'évolution des hôtes animaux et végétaux, mais également dans celle des pathogènes ou parasites. Ces mécanismes aboutissent à une grande diversité génétique des deux partenaires, s'adaptant en permanence aux stratégies mises en place par le partenaire opposé (Schulte *et al.* 2010).

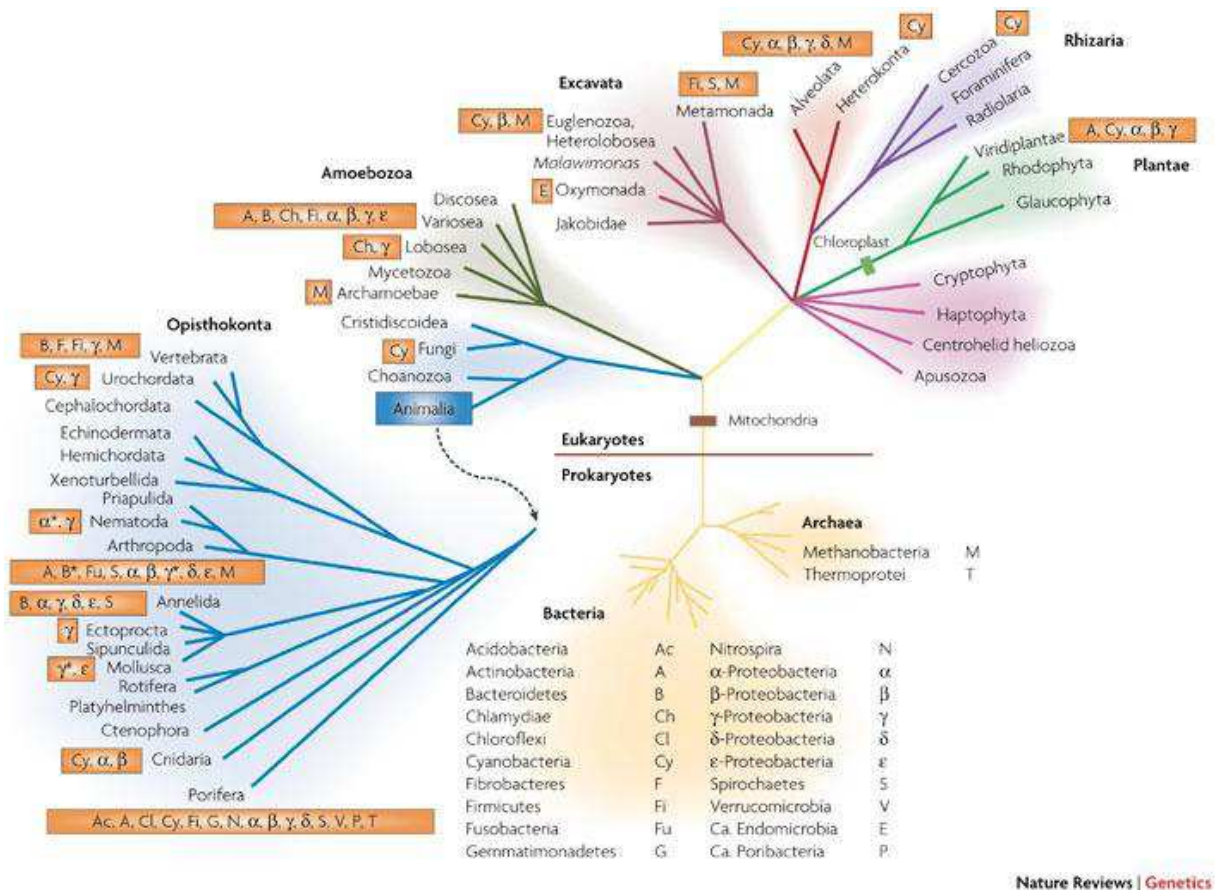
### I.3 La coévolution hôte-symbiote

Au cours de l'évolution, des microorganismes à l'état libre se sont adaptés pour devenir des microorganismes vivant strictement ou de façon facultative dans un hôte, les partenaires étant appelés symbiotes. Le terme symbiote provient du grec, *sym* signifiant « avec » et *biote* signifiant « la vie », et définit une interaction durable entre deux ou plusieurs organismes, et a été introduit par Anton de Bary en 1879 (de Bary 1879 ; Portier 1918). La symbiose peut être définie comme une interaction à bénéfice réciproque entre les partenaires, et elle est souvent qualifiée de symbiose mutualiste (Douglas 1994). Cependant, de Bary avait défini la symbiose de façon plus large, où le niveau de spécificité à l'intérieur de l'hôte définit si la symbiose est facultative ou obligatoire, et l'effet de la symbiose sur la santé des partenaires permet de qualifier l'interaction de parasitisme, mutualisme ou commensalisme (Ruby et Goldner 2007). De même, selon la localisation du symbiote dans l'hôte, les termes endosymbiose ou ectosymbiose s'appliquent (Dale et Moran 2006 ; Moya *et al.* 2008). Dans

cette partie I.3, nous nous intéresserons plus particulièrement au cas des symbioses obligatoires entre un hôte eucaryote et son symbiote.

Les symbiotes bactériens ont une origine environnementale ou maternelle. La transmission est dite verticale lorsque les symbiotes sont directement transmis du parent à sa progéniture (Buchner 1965 ; Frank 1996). Ce mode de transmission a d'abord été décrit pour les endosymbiotes primaires des insectes, telles les bactéries du genre *Buchnera*. Il a plus récemment été mis en évidence pour les endosymbiotes des clams vésicomidés des sources hydrothermales du genre *Calyptogena* (Cary et Giovannoni 1993). Lorsque l'hôte acquiert ses symbiotes à partir de l'environnement, l'acquisition est dite horizontale. Ce mode de transmission est notamment observé dans les associations entre les légumineuses (fabacées) et les *Rhizobium*, entre le calamar *Euprymna scolopes* et les bactéries luminescentes *Vibrio fischeri*, ou encore entre le ver tubicole *Riftia pachyptila* et son symbiote *Candidatus Endoriftia persephone* chimiolitotrophe (Nussbaumer *et al.* 2006 ; Chaston et Goodrich-Blair 2010). Dans les cas de coévolution, la co-spéciation est plus stricte avec des symbiotes hérités verticalement.

La symbiose peut avoir un rôle important dans l'évolution des espèces impliquées dans cette relation, car elle peut nécessiter la formation de nouvelles structures cellulaires et/ou voies métaboliques chez les deux partenaires. Le plus souvent, ces structures ou voies métaboliques chez le symbiote microbien servent à apporter des nutriments déficients chez l'hôte, et en retour, le symbiote microbien a à sa portée une large gamme de métabolites produits par l'hôte (Minic et Hervé 2004 ; Zientz *et al.* 2004 ; Kneip *et al.* 2007). Beaucoup de symbioses étudiées concernent les symbioses entre des gammaprotéobactéries et des insectes, comme *Buchnera* et les aphides (Baumann *et al.* 1995 ; Brinza *et al.* 2009 ; Shigenobu et Wilson 2011), les alphaprotéobactéries avec les plantes légumineuses (Giraud *et al.* 2007 ; Pawlowski et Sprent 2008 ; Masson-Boivin *et al.* 2009), ou les actinobactéries avec les plantes actinorhiziennes (Normand *et al.* 2007 ; Franche *et al.* 2009 ; Hocher *et al.* 2011), mais les symbioses entre eucaryotes et procaryotes sont retrouvées chez la plupart des grands groupes phylogénétiques existants (Moya *et al.* 2008 ; Figure 5).



**Figure 5 :** Distribution phylogénétique des symbioses, indiquant les classes de bactéries et d'archées à l'intérieur desquelles une association existe avec des hôtes eucaryotes. Moya *et al.* 2008.



Lors d'une coévolution entre deux partenaires, de nombreux changements vont avoir lieu, notamment une réduction non négligeable de la taille du génome du microsymbiote (Wernegreen 2002). En effet, de nombreux gènes deviennent inutiles ou redondants chez le microsymbiote, du fait d'un environnement plus stable et donc moins complexe à affronter que celui d'organismes à l'état libre, ou de la présence de mêmes gènes chez l'hôte (Pérez-Brocal *et al.* 2006 ; Moya *et al.* 2008). La réduction du génome va ainsi s'accompagner d'une baisse de la proportion d'éléments transposables et de la perte de gènes ayant une fonction métabolique ou structurale (Foster *et al.* 2005 ; Pérez-Brocal *et al.* 2006 ; Moya *et al.* 2008). Par exemple, les éléments structuraux comme les flagelles ne sont plus nécessaires lors d'une vie symbiotique, lorsque le microsymbiote n'a plus à coloniser les cellules d'un hôte, et les éléments transposables peuvent devenir délétères s'ils provoquent la perte de fonctions essentielles à la symbiose (Moya *et al.* 2008). Toutefois, le microsymbiote doit maintenir suffisamment de fonctions pour survivre et se reproduire dans l'hôte, et également apporter un avantage à son hôte, notamment au niveau nutritionnel (Tamas *et al.* 2002). Les exemples les plus « aboutis » de réduction de génome d'un microsymbiote sont ceux de l'alphaprotéobactérie (*Rickettsiales*) à l'origine des mitochondries, ou celui de la cyanobactérie à l'origine des chloroplastes, qui sont devenus des organelles de leur hôte eucaryote, et dont les existences sont maintenant indissociables (Gross et Bhattacharya 2009 ; Falcon *et al.* 2010).

En retour, pour aboutir à une symbiose il faut que l'hôte eucaryote coévolue en s'adaptant à la présence de cellules étrangères dans son organisme ou ses cellules. L'hôte peut développer des cellules spécialisées afin de contrôler la population du symbiote, et adapte son système immunitaire à cette présence. Par exemple, la reconnaissance de motifs moléculaires présents sur l'enveloppe cellulaire du microsymbiote par des récepteurs de l'hôte conduit à une inhibition de la réponse du système immunitaire (Heddi *et al.* 2005 ; Zaidman-Rémy *et al.* 2006). De plus, certains microsymbiotes ne vivant pas dans des vésicules, mais de façon libre dans le cytosol ont perdu le gène *dnaA* impliqué dans l'initiation de la réplication de l'ADN, suggérant un contrôle de l'abondance des bactéries symbiotiques par la cellule hôte (Akman *et al.* 2002 ; Gil *et al.* 2003). Enfin, 15% des espèces d'insectes ont intégré des bactéries symbiotiques dans des cellules spécialisées, appelées bactériocytes, qui sont souvent regroupées entre elles pour former un véritable tissu, le bactériome (Baumann 2005). Ces insectes contrôlent la quantité de symbiotes en produisant des lysozymes induisant une hydrolyse du peptidoglycane des bactéries dans les bactériocytes (Nakabachi *et al.* 2005).

L'adaptation de l'hôte et du microsymbiote lors de la coévolution implique un grand nombre de modifications génétiques, et l'étude de l'interaction de deux partenaires permet de mieux comprendre les systèmes évolutifs mis en place. Toutefois, la nature fait cohabiter un grand nombre de microsymbiotes au sein d'un même hôte, ce qui rend les modèles bipartites peu résolutifs des réels changements évolutifs résultant d'une interaction prolongée. En effet, un symbiote n'est jamais présent seul dans une cellule eucaryote, et la réduction de son génome peut être le résultat non seulement d'une perte de fonctions non essentielles à sa survie, mais également d'une coévolution avec d'autres microsymbiotes complémentaires (Nakabachi *et al.* 2005 ; Pérez-Brocal *et al.* 2006 ; Wu *et al.* 2006). Il est donc nécessaire de tenir compte de tous les partenaires présents dans l'interaction pour mieux comprendre les phénomènes de coévolution hôte-symbiotes.

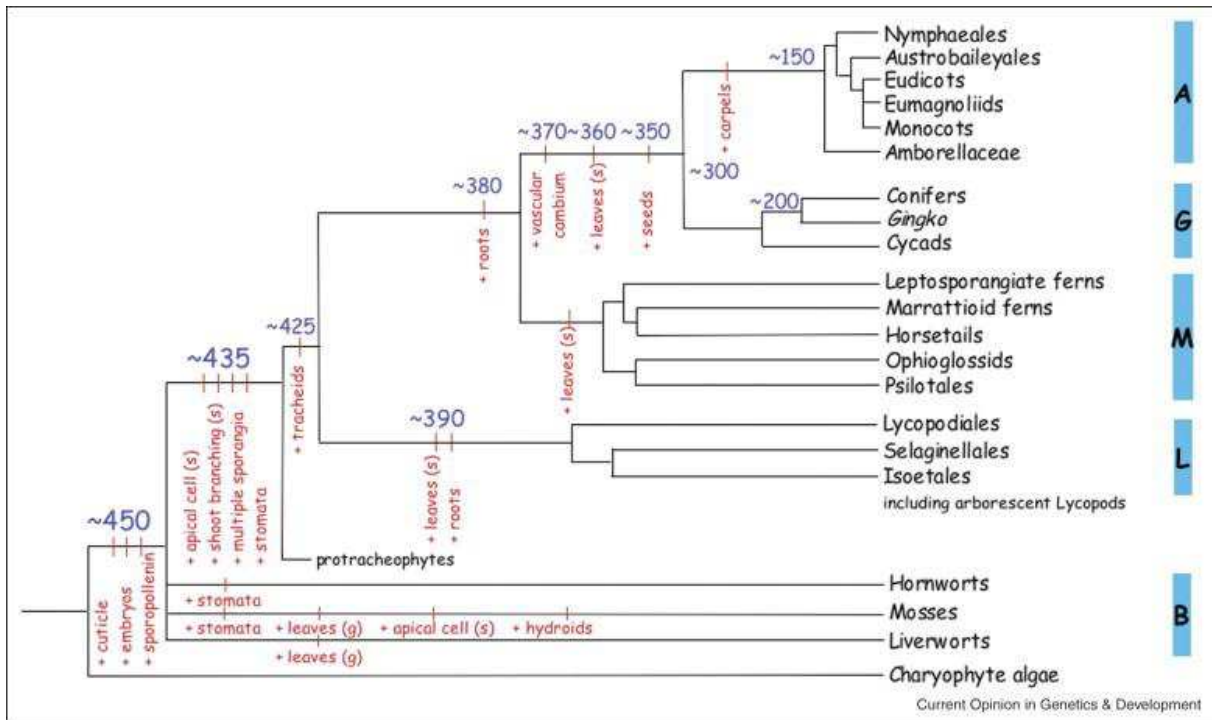
## **II. Cas particulier de coévolution : les interactions plantes-bactéries phytobénéfiques**

Les microorganismes ont généralement une influence prépondérante sur la santé et le développement des hôtes eucaryotes qui les hébergent. C'est notamment le cas avec les pathogènes. Or, au cours de l'évolution entre eucaryotes et procaryotes, un grand nombre d'interactions bénéfiques se sont aussi développées. Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux phénomènes de coévolution existant entre les plantes et les microorganismes du sol. Les espèces végétales ont évolué progressivement, pour former différents groupes végétaux, et l'on considère qu'il existe de nos jours environ 400 000 espèces de plantes (Botanic Gardens Conservation International, <http://www.bgci.org/worldwide/1521/>). La longue évolution conjointe des plantes en interaction avec les bactéries a conduit à des adaptations chez les partenaires, les plantes sélectionnant les microorganismes bénéfiques et luttant contre ceux étant délétères, et les microorganismes en retour colonisant les plantes, leur procurant un environnement ou des ressources essentielles à leur survie (Bais *et al.* 2006 ; Berg et Smalla 2009 ; Compant *et al.* 2010). Afin de mieux comprendre les coévolutions entre plantes et bactéries, de nombreuses études ont ciblé une plante en interaction avec une bactérie. Or le sol, et plus particulièrement la rhizosphère, zone du sol situé immédiatement au contact de la plante (Hiltner 1904 ; Hinsinger *et al.* 2009), regorge de microorganismes, jusqu'à  $10^{10}$  bactéries par gramme de sol (Gans *et al.* 2005 ; Roesch *et al.* 2007).

Les microorganismes bénéfiques pour les plantes sont des microsymbiotes mutualistes ou associatifs. Les symbioses mutualistes entraînent une interaction forte entre les symbiotes et leur plante hôte et la formation de structures d'échanges comme les nodosités. Les symbioses associatives concernent une interaction non obligatoire entre les partenaires microbiens et végétaux, et l'exemple le plus connu est celui des microorganismes PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*). Ces deux types de symbioses peuvent avoir un rôle important en agriculture, pour limiter la quantité de fertilisants ou de pesticides (Weyens *et al.* 2009 ; Singh *et al.* 2011). Cette partie traitera de l'histoire évolutive des plantes, puis de l'impact de cette évolution sur (i) les étapes de colonisation racinaire des bactéries, (ii) les symbioses mutualistes et (iii) les symbioses associatives.

## II.1 L'histoire évolutive des plantes

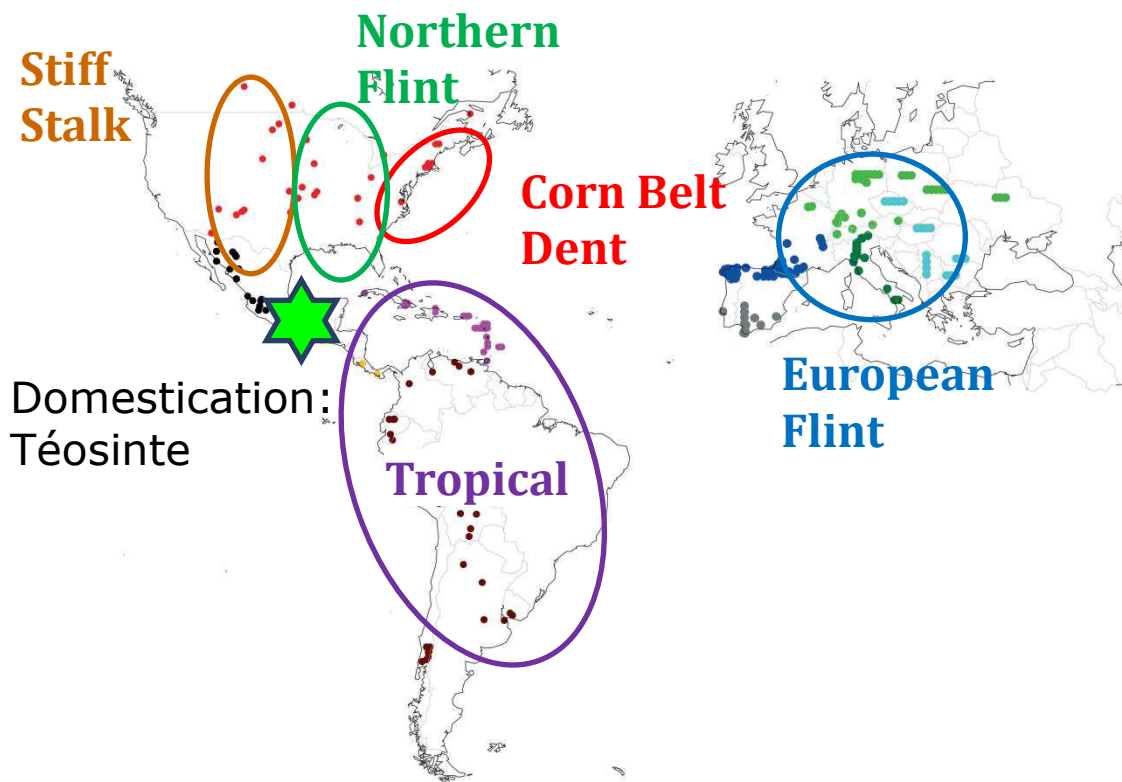
Les plantes ont commencé à coloniser le milieu terrestre à partir du milieu aquatique il y a environ 500 millions d'années (Gensel 2008). Ce passage à un règne végétal aérien correspond à l'apparition des embryophytes (Niklas et Kutschera 2010) qui sont à l'origine de toutes les espèces végétales terrestres connues de nos jours. L'évolution des embryophytes terrestres aurait généré les embranchements des bryophytes et des plantes vasculaires, ces dernières étant probablement une évolution spécifique des bryophytes, mais cette théorie reste très controversée (Hedges *et al.* 2002 ; Boyce 2008 ; Gensel 2008 ; Langdale 2008). Ces deux embranchements présentent de nombreuses différences morphologiques (résumées dans la Figure 6), aussi bien au niveau des parties aériennes que racinaires, qui n'existent pas en tant que telles chez les bryophytes mais sous forme de rhizoïdes servant de point d'ancrage dans le substrat (Menand *et al.* 2007 ; Langdale 2008). Des différences phénotypiques importantes résultant de l'évolution sont également retrouvées entre les sous-groupes des plantes vasculaires, gymnospermes et angiospermes (Hedges 2002 ; Li *et al.* 2008 ; Comas et Eissenstat 2009 ; Côté *et al.* 2010), ou les deux clades des angiospermes, monocotylédones et dicotylédones (Hochholdinger et Zimmermann 2008 ; Agarwal *et al.* 2011). Ces différences par exemple morphologiques (feuilles, racines) ou en composés exsudés impactent (Maloney *et al.* 1997 ; de Dordolot *et al.* 2007 ; Haichar *et al.* 2008) les interactions avec les populations microbiennes et par conséquent les structures des communautés.



**Figure 6 :** Phylogénie des plantes ayant colonisé le milieu terrestre, montrant la prédiction d’acquisition de traits évolutifs à chaque nœud en rouge (s = sporophytes, g = gamétophytes). Le temps de divergence approximatif à chaque nœud est indiqué en bleu. Les Protrachéophytes font référence aux polysporangiates non vasculaires, incluant *Aglaophyton major*, *Horneophyton lignieri* et quelques fossiles non vasculaire de type *Cooksonia*. Au niveau des barres à droite, A = angiospermes, G = gymnospermes, M = monilophytes, L = lycophytes et B = bryophytes. Adapté de Langdale 2008.

L’évolution des plantes suite à d’innombrables adaptations a conduit à leur grande diversité, mais ces processus ont été longs à se mettre en place. Or, certaines espèces ont subi une évolution rapide au cours des derniers 10 000 ans (Fuller 2007). En effet, les angiospermes ont été largement exploitées pour leurs propriétés nutritives, lorsque les sociétés humaines de chasseurs cueilleurs ont domestiqué certaines espèces de ces angiospermes et se sont sédentarisées (Diamond 2002 ; Purugganan et Fuller 2009). La domestication a été effectuée en sélectionnant les plantes ayant (i) des grains plus gros, qui contenaient de plus grandes ressources nutritives et donnaient à leur tour des plantes plus grandes, et (ii) des épis dont les grains ne se détachaient pas, afin de pouvoir tous les récolter au même moment et les stocker (Purugganan et Fuller 2009). Suite à leur domestication, les différentes espèces végétales ont été disséminées à travers le monde, de façon plus au moins étendue selon l’espèce considérée (Dubreuil *et al.* 2006), conduisant à la formation et la sélection de nouvelles variétés mieux adaptées aux conditions environnementales locales. Les agriculteurs

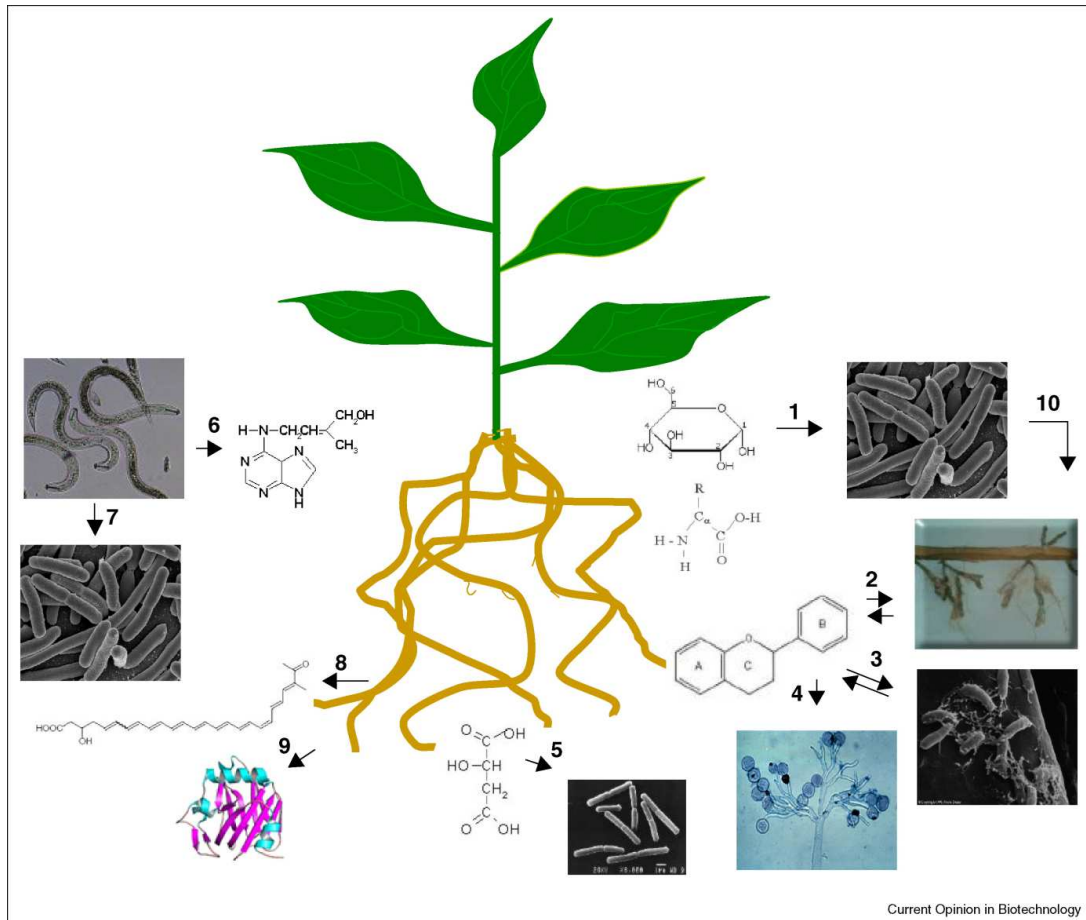
cherchant en permanence à améliorer le rendement et le pouvoir nutritionnel de ces plantes, cette évolution dirigée par l'homme a continué pour ces différentes variétés pendant des millénaires, structurant alors de nouveaux groupes génotypiques, sous-espèces et/ou espèces végétales, dérivées d'un même ou de plusieurs ancêtres communs (Salamini *et al.* 2002). Ainsi, à partir de la domestication d'une téosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) au Mexique (Doebley 2004), cinq groupes génétiques principaux de maïs répartis à travers le monde se sont formés (Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006, Figure 7). De même, pour le riz (*Oryza sativa*) deux sous-espèces : *indica* et *japonica* ont été générées à partir de *O. rufipogon* (Vaughan *et al.* 2008). Enfin, plusieurs espèces de blé (*Triticum*) dérivées de *T. urartu*, *T. boeoticum* et *T. dicoccoides* sont retrouvées de nos jours (Salamini *et al.* 2002).



**Figure 7 :** Répartition géographique des cinq principaux groupes génétiques de maïs. Adapté de Doebley 2006, Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006.

Les modifications génétiques résultant de l'évolution des plantes ont eu un impact sur les communautés microbiennes et ont influencé leur recrutement au cours du temps. Parmi ces modifications phénotypiques, un certain nombre concerne le système racinaire, par exemple au niveau de sa morphologie et ou de la composition des exsudats racinaires (Czarnota *et al.* 2003 ; de Dorlodot *et al.* 2007 ; Badri *et al.* 2009 ; Comas et Eissenstat 2009). Ces exsudats

peuvent être comparés à un cocktail constitué de nombreuse molécules carbohydratées qui ont des fonctions signal (repoussantes, attractantes) ou nutritives pour des populations microbiennes spécifiques. Ainsi, ces modifications phénotypiques du végétal modulent l'impact des racines sur les propriétés physico-chimiques (porosité, substrats carbonés exsudés, minéraux, pH, potentiel redox du sol, etc.) de la rhizosphère (Lynch et Whipps 1990 ; Gransee et Wittenmayer 2000 ; Hartmann *et al.* 2008 ; Hinsinger *et al.* 2009), et la structure de la communauté microbienne présente dans la rhizosphère (Figure 8).



**Figure 8 :** Représentation de la communication chimique existant entre les racines des plantes et les autres organismes dans la rhizosphère. Les racines végétales sécrètent une grande variété de composés, parmi lesquels les sucres et les acides aminés ont un rôle dans l'attraction (chimiotaxie) des microbes (1), les flavonoïdes sont des molécules signal pour l'initiation des interactions avec les champignons mycorhiziens (2), *Rhizobium* (3) et les oomycètes pathogènes (4), les acides aliphatiques (par exemple l'acide malique) sont impliqués dans le recrutement de PGPR (*Bacillus subtilis*) (5), les nématodes sécrètent des régulateurs de croissance (cytokinines) impliqués dans l'établissement de sites pour leur nutrition dans les racines des plantes (6) et les nématodes sécrètent d'autres composés (acides organiques, acides aminés et sucres) impliqués dans l'attraction des bactéries et dans le *quorum sensing* des bactéries (7). Le rôle d'autres types de composés, comme les acides gras (8) et les protéines (9) sécrétés par les racines dans la rhizosphère, et des autres interactions multipartites (10) reste inconnu. Adapté de Badri *et al.* 2009.

## II.2 Impact de l'histoire évolutive végétale sur les étapes de la colonisation racinaire par les microorganismes

La colonisation des racines par les microorganismes du sol nécessite plusieurs étapes. En effet, les bactéries doivent dans un premier temps reconnaître les molécules présentes dans les exsudats racinaires, se déplacer vers les racines, coloniser le rhizoplan, puis se développer (Rodríguez-Navarro *et al.* 2007 ; Compant *et al.* 2010). Chacune de ces étapes est susceptible d'être influencée par les variations même légères du génotype végétal.

### II.2.1 La chimioattraction

Tout d'abord, les exsudats racinaires produits par les racines, composés d'une large gamme de sucres, acides aminés, acides organiques et composés phénoliques (Bertin *et al.* 2003), servent de chimioattractants pour les bactéries du sol. Ces exsudats varient en termes qualitatif et quantitatif entre différentes variétés d'une même espèce végétale (Soejima *et al.* 1992 ; Pueppke *et al.* 1998 ; Aulakh *et al.* 2001 ; Czarnota *et al.* 2003 ; Bais *et al.* 2006) et vont avoir un impact sur l'attraction des bactéries du sol (Downie 2010). Il a ainsi été mis en évidence que la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, pathogène opportuniste de l'Homme mais capable aussi de coloniser plusieurs espèces végétales (Troxler *et al.* 1997 ; Walker *et al.* 2004), présentait un profil transcriptomique différent en réponse aux exsudats de deux cultivars de canne à sucre (Mark *et al.* 2005). Ces différences concernaient notamment des gènes impliqués dans la chimiotaxie (*cheA*, *cheY* et *pctA*), la mobilité et l'attachement (*flgE* et *fliC*), qui étaient négativement régulés par les exsudats d'un cultivar, suggérant des différences de colonisation pour cette souche selon le génotype rencontré (Mark *et al.* 2005). Ces résultats mettent en évidence l'importance du génotype végétal dans l'attraction des bactéries du sol, et donc dans leur colonisation racinaire, suggérant que tout comme pour les pathogènes ou les symbiotes mutualistes, l'évolution ait pu conduire à des mécanismes d'interaction spécifiques entre les plantes et les bactéries saprophytes.

### II.2.2 La colonisation

La colonisation racinaire nécessite une adhésion à la racine, effectuée en deux étapes. La première étape est une interaction réversible avec la racine grâce aux flagellines, alors que la deuxième étape est un ancrage plus durable sur la racine (Rodríguez-Navarro *et al.* 2007). Ces étapes peuvent également dépendre du génotype de plante rencontré, comme cela a été mis en évidence dans le cas du soja ou du riz (Krishnan *et al.* 1995 ; Che *et al.* 2000). Bien

que les étapes de colonisation racinaire soient bien connues (Rodríguez-Navarro *et al.* 2007), elles ont été peu étudiées dans le cas de différentes variétés d'une même espèce végétale. Il est pourtant possible que cette étape soit elle aussi influencée par le génotype de la plante. C'est l'influence du génotype sur les différentes étapes de la colonisation racinaire (chimiotaxie et colonisation), qui aboutit à des différences de colonisation racinaire au niveau de la rhizosphère, comme nous le verront pour des communautés totales dans la partie III.2 (Germida et Siciliano 2001 ; Adams et Kloepper 2002 ; van Overbeek et van Elsas 2008), des communautés fonctionnelles (Partie III.3 ; Araújo da Silva *et al.* 2003 ; Picard et Bosco 2008 ; Inceoglu *et al.* 2010), ou des populations spécifiques, notamment phyto-bénéfiques (Parties II.3 et II.4).

### II.3 Les symbioses mutualistes

La symbiose mutualiste dans le cas des microorganismes associés aux plantes implique souvent une différenciation morphologique chez la plante et/ou son symbiote: la nodulation ou la mycorhization (Provorov et Vorobyov 2009 ; Kucho *et al.* 2010 ; Hocher *et al.* 2011). Les symbioses mutualistes les plus étudiées impliquent des bactéries fixatrices d'azote telles *Rhizobium* avec les fabacées (Giraud *et al.* 2007; Pawlowski et Sprent 2008 ; Masson-Boivin *et al.* 2009), *Frankia* avec les plantes actinorhiziennes (Normand *et al.* 2007; Franche *et al.* 2009; Hocher *et al.* 2011) et les champignons mycorhiziens avec un grand nombre de plantes (Marmeisse *et al.* 2004 ; Guidot *et al.* 2005 ; Parniske 2008 ; Smith et Read 2008). Le développement de ces symbioses avec les plantes est le résultat d'une longue coévolution entre hôte et son microorganisme, qui a abouti à des spécialisations d'interactions entre les deux partenaires. Ainsi pour de nombreuses symbioses mutualistes, il est possible de caractériser des liens privilégiés entre espèces, qui se traduisent par des schémas d'infection spécifiques.

#### II.3.1 Les symbioses mycorhiziennes

Les champignons mycorhiziens (du grec *myco* : champignon et *rhiza* : racine) sont des partenaires privilégiés des plantes. Les symbioses mycorhiziennes permettent aux champignons d'utiliser les carbohydrates d'origine photosynthétique issus de la plante, et la plante bénéficie en retour de l'eau, des nutriments et sels minéraux rendus disponibles par les champignons (Gobat *et al.* 2010). Cette symbiose serait apparue rapidement après la colonisation des terres émergées par les premiers végétaux (>400 millions d'années, Remy *et*



al. 1994) et aurait favorisé la colonisation rapide de tous les continents (Pirozynski et Malloch 1975). Ces mycorhizes sont classifiées en fonction de la place qu'elles occupent dans les racines lors de la symbiose. Les champignons ectomycorhiziens ne pénètrent pas l'intérieur des cellules des racines végétales mais les entourent de mycélium, ce qui entraîne une déformation des racines et une importante ramification, et les ectomycorhizes sont prédominantes dans les forêts de régions tempérées (Parniske *et al.* 2008 ; Gobat *et al.* 2010). Les champignons endomycorhiziens pénètrent quant à eux les cellules végétales racinaires, et ces endomycorhizes incluent les mycorhizes éricoïdes, celles des orchidées et les mycorhizes arbusculaires. Ces dernières colonisent presque 80% des plantes vasculaires (Wang et Qiu, 2006) et appartiennent au groupe monophylétique des *Glomeromycota* (Parniske *et al.* 2008 ; Smith et Read 2008).

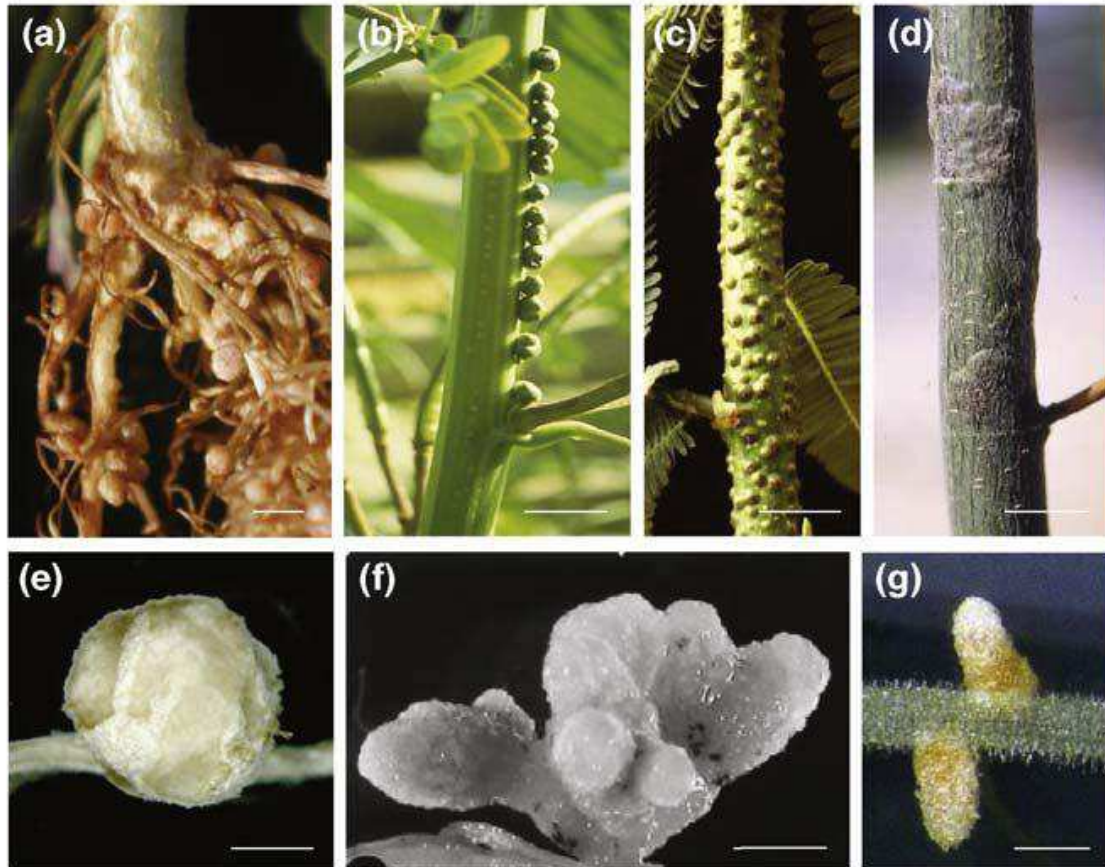
Du fait de leur capacité à coloniser un grand nombre d'hôtes végétaux, notamment pour les symbioses mycorhiziennes à arbuscule (Fitter 2005), la spécificité d'hôte pourrait sembler très faible. Or, la colonisation racinaire par les champignons ectomycorhiziens et endomycorhiziens est dépendante de l'espèce végétale et de la lignée végétale (Krishna *et al.* 1985 ; Baum *et al.* 2009). De même, le génotype de plante va avoir une influence sur l'effet bénéfique apporté par l'inoculation des symbiotes mycorhiziens sur la croissance (taille ou poids) des plantes (Krishna *et al.* 1985; Khalil *et al.* 1994 ; Clement et Habte 1995 ; Baum *et al.* 2009 ; Sawers *et al.* 2010). L'histoire évolutive récente des plantes, c'est-à-dire les différentes variétés apparues depuis la domestication de la plante d'origine, semble également avoir eu une influence importante sur la réponse des lignées en terme de croissance après l'inoculation de champignons mycorhiziens, notamment concernant le blé et le maïs. En effet, les lignées récentes de plantes ont une réponse moins importante à l'inoculation que les lignées plus anciennes (Hetrick *et al.* 1993 ; An *et al.* 2009). Il est possible que ces cultivars récents aient été sélectionnés pour leur plus grande résistance aux champignons pathogènes, entraînant un mécanisme de défense envers les champignons mycorhiziens et plus particulièrement pour ceux pénétrant les racines des plantes (Smith et Goodman 1999). Ce concept est cependant critiqué, et l'impact de l'histoire évolutive végétale sur le recrutement des symbiotes mycorhiziens reste à approfondir (Sawers *et al.* 2010 ; Steinkellner *et al.* 2011). Toutefois, au cours de l'évolution la capacité des plantes à interagir avec les champignons a été souvent sélectionnée et conservée car cela améliorerait grandement la croissance du végétal (Sawers *et al.* 2010). Aussi, on peut supposer que dans le futur, afin d'améliorer la croissance des plantes de grande culture, les lignées de plante recrutant naturellement de plus grandes quantités de champignons mycorhiziens seront sélectionnées (Sawers *et al.* 2008).

### II.3.2 Les symbioses plantes-bactéries

La fixation biologique de l'azote qui consiste en la réduction de l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) en ammoniacque ( $NH_3$ ) a une importance majeure dans le fonctionnement de la biosphère. Elle apparaît comme l'un des processus fondamentaux parmi les cycles biogéochimiques se déroulant dans le sol. A côté des microorganismes fixant librement l'azote atmosphérique, tels les *Azospirillum*, les *Azotobacter*..., le sol recèle des protéobactéries et actinobactéries capables de noduler les légumineuses et les plantes ligneuses, respectivement. Toutes ces bactéries possèdent une nitrogénase, complexe enzymatique catalysant la réduction du diazote ( $N_2$ ) en ammoniacque ( $NH_3$ ), capables de fixer l'azote à leur profit et celui de la plante avec laquelle elles entrent en symbiose. L'importance agronomique et écologique de ces symbioses fixatrices de  $N_2$  est considérable.

#### *A. Les symbioses rhizobiacées-fabacées*

La symbiose entre les bactéries fixatrices d'azote de la famille des rhizobiacées (*Rhizobium*, *Ensifer* (ex-*Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Phyllobacterium*, *Ochrobacterium*, *Blastobacter*, *Devosia*) et les fabacées (plantes légumineuses : pois, soja, haricot, trèfle...) est une des interactions symbiotiques plantes-bactéries les plus étudiées à ce jour (van Rhijn et Vanderleyden 1995 ; Moulin *et al.* 2001 ; Masson-Boivin *et al.* 2009). Ce type de symbiose entraîne la formation par l'hôte de structures particulières localisées au niveau des racines, les nodosités colonisées par les bactéries symbiotiques et où les échanges nutritifs entre les partenaires s'effectuent (Figure 9). Les espèces de *Rhizobium* qui peuvent infecter les plantes possèdent généralement des plasmides de grande taille appelés plasmides symbiotiques (pSym) qui hébergent des gènes essentiels pour la nodulation (gènes *nod*) et la fixation d'azote (gènes *fix*, *nif* ; Batut *et al.* 1985 ; Velazquez *et al.* 2005 ; Young *et al.* 2006).



**Figure 9** : Variations morphologiques dans la symbiose entre bactéries diazotrophes et légumineuses. Les bactéries forment des nodosités sur les racines [(a) *Cupriavidus taiwanensis*–*Mimosa pudica*] et occasionnellement sur les tiges des légumineuses [(b) *Azorhizobium caulinodans*–*Sesbania rostrata*, (c) *Bradyrhizobium* sp. ORS322–*Aeschynomene fraspera*, et (d) *Bradyrhizobium* sp. ORS278–*Aeschynomene sensitiva*]. Les nodosités se présentent sous différentes formes, c’est à dire rondes [(e) *Sinorhizobium fredii*–soja], coralloïdes [(f) *Methylobacterium nodulans*–*Crotalaria perrottetii*] ou allongées [(g) *Sinorhizobium meliloti*–*Medicago sativa*]. Adapté de Masson-Boivin *et al.* 2009.

En ce qui concerne l'origine évolutive de l'association symbiotique entre les rhizobiacées et les légumineuses, deux théories ont été proposées. Pour la première théorie, la symbiose aurait évolué à partir de bactéries diazotrophes du sol qui se seraient associées aux plantes en exploitant en partie les voies de signalisation développées lors de la coévolution du végétal avec les mycorhizes. En effet les voies de signalisation de la colonisation du partenaire végétal sont partagées entre les bactéries, les champignons mycorhiziens (Dénarié et Gianinazzi-Pearson 1997) et les nématodes (Weerasinghe *et al.* 2005). L'existence de mutants de plantes incapables d'entrer en symbiose avec des rhizobiacées et avec des champignons endomycorhiziens corrobore cette idée (Hirsch *et al.* 2001). Dans la deuxième théorie, les ancêtres des bactéries symbiotiques seraient des bactéries phytopathogènes. Cette hypothèse est avancée en raison d'une part de la proximité phylogénétique entre symbiote et pathogène (*Agrobacterium* est une rhizobiacée), et d'autre part de l'existence d'homologies locales entre les plasmides Vir et Sym (Terefework *et al.* 2000).

La divergence entre les différents genres de rhizobiacées est estimée à 200-300 millions d'années, c'est-à-dire bien avant celle entre les monocotylédones et les dicotylédones ou l'apparition des légumineuses. De plus, depuis 10 ans, la capacité de souches de bêta-protéobactéries *Burkholderia* (Moulin *et al.* 2001) et *Ralstonia* (Chen *et al.* 2001) et de l'alphaprotéobactérie *Methylobacterium* (Sy *et al.* 2001) à former des nodosités fixatrices d'azote en symbiose avec des légumineuses a été décrite (Moulin *et al.* 2001). Bien que les bêta-protéobactéries soient phylogénétiquement éloignées des alphaprotéobactéries, leurs gènes de nodulation sont phylogénétiquement proches. Ces observations suggèrent que la capacité des bactéries à noduler les légumineuses a été acquise après la divergence des différents genres et a été transmise horizontalement (Hirsch *et al.* 2001).

L'une des caractéristiques majeures de la symbiose est sa spécificité. En effet, la plupart des rhizobiacées n'est capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote qu'avec un nombre limité d'espèces végétales, définissant son spectre d'hôte. Inversement, une espèce de légumineuse donnée ne pourra établir une association symbiotique qu'avec une ou plusieurs espèces ou genres de bactéries, définissant ainsi le spectre d'hôte de la légumineuse. Les variations du spectre d'hôte bactérien et des légumineuses sont très importantes. Ainsi les associations peuvent être très spécifiques (aussi appelées spécialistes) dans le cas d'un seul symbiote possible, jusqu'à généralistes, lorsque le spectre d'hôte est large. A titre d'exemple pour le partenaire bactérien, nous pouvons citer *Azorhizobium caulinodans* qui ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus *et al.* 1988). Chaque espèce de rhizobiacées a souvent un spectre d'hôte défini, et les différences infraspécifiques bactériennes d'hôte sont alors

généralement signifiées par le biovar, comme c'est le cas pour *Rhizobium leguminosarum* colonisant le trèfle appelé alors biovar *trifolii*.

Il est cependant souvent difficile de déterminer quel est l'impact de la variété de plante sur ces interactions. En effet, différents génotypes d'une même espèce de plante vont influencer la symbiose avec les rhizobiacées au niveau de la colonisation des bactéries (Drew et Ballard 2010), du nombre de nodosités formées ou la capacité à en produire (Sadowski *et al.* 1988 ; Krishnan *et al.* 2003 ; Leon-Barrios *et al.* 2009 ; Drew et Ballard 2010 ; Abi-Ghanem *et al.* 2011), de la quantité d'azote formé (Valverde et Ottabong 1997 ; Leon-Barrios *et al.* 2009 ; Drew et Ballard 2010 ; Abi-Ghanem *et al.* 2011) ou du bénéfice de croissance apporté par la symbiose (Valverde et Ottabong 1997 ; Drew et Ballard 2010).

Malgré les différences observées entre génotypes de plantes, à notre connaissance une seule étude a mesuré une relation directe entre le génotype de plante (distances génétiques) et la phylogénie du microsymbiote (Parker et Spoerke 1998), et a mise en évidence que les plantes proches phylogénétiquement recrutent des populations bactériennes plus proches génétiquement. Une étude récente suggère que la symbiose *Rhizobium*-légumineuses ne serait toutefois pas le résultat d'une coévolution mais d'une sélection des bactéries au cours du temps ayant une fonction phytobénéfique commune obtenue par transfert de gènes, sans spécificité d'espèce (Martinez-Romero 2009). Il est donc nécessaire d'approfondir les relations existant potentiellement entre la phylogénie des plantes et la phylogénie des symbiotes afin de mieux comprendre l'influence qu'a pu avoir l'histoire évolutive dans ce cas particulier de symbiose.

### *B Les symbioses Actinorhiziennes*

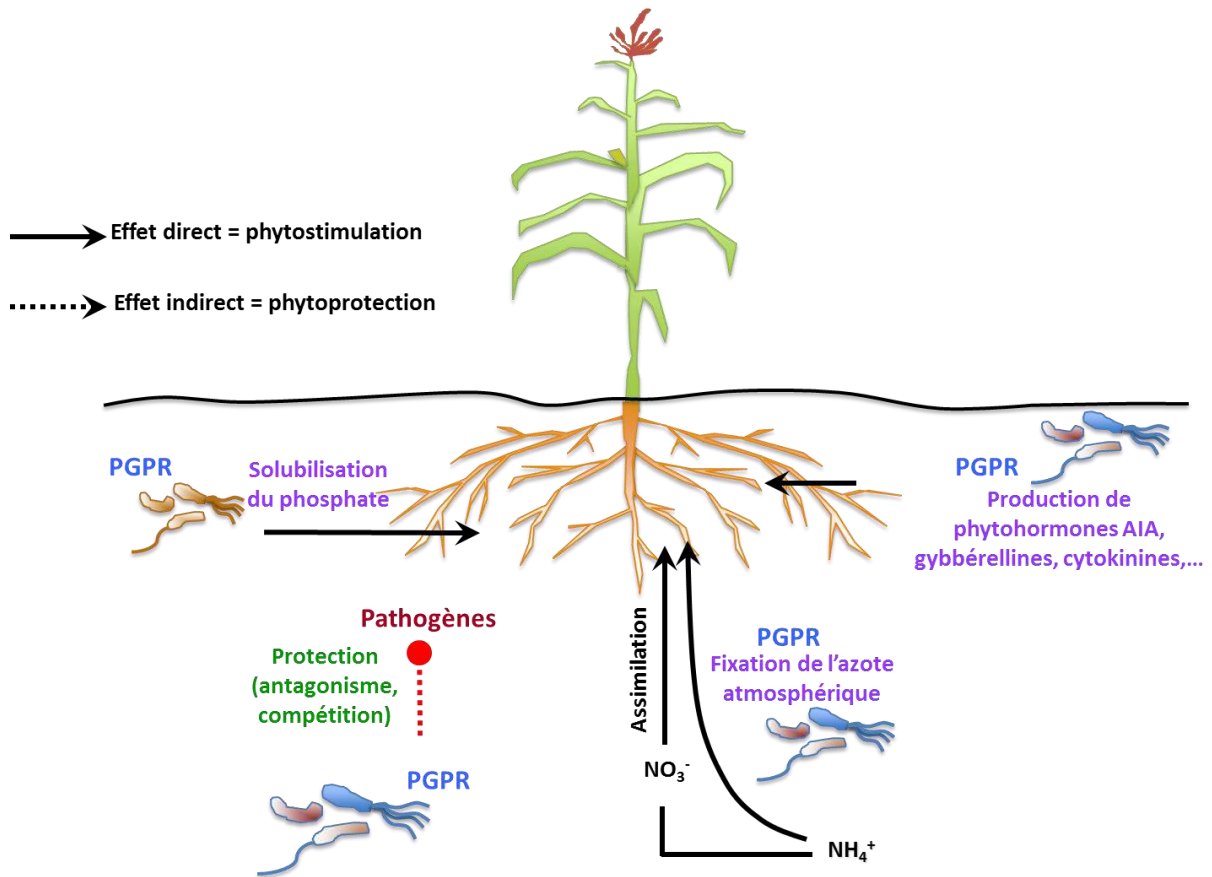
Les symbioses actinorhiziennes concernent les actinobactéries fixatrices d'azote du genre *Frankia*. Ces bactéries fixent l'azote en symbiose avec un large spectre de plantes ligneuse dicotylédones, appelées actinorhiziennes, qui appartiennent à 25 genres répartis dans 8 familles dont les Bétulacées, les Myricacées et les Casuarinacées (Benson et Silvester 1993). Cette symbiose entraîne également la formation de nodosités (dichotomes) où vont avoir lieu les échanges de nutriments entre les deux partenaires de l'interaction (Kucho *et al.* 2010). D'après les pollens fossiles, les plantes actinorhiziennes seraient apparues il y a presque 100 millions d'années (Oakley *et al.* 2004), mais rien n'indique qu'une symbiose avec les actinobactéries était déjà en place. Nous pouvons cependant penser que la symbiose avec les actinobactéries ait pu aider les plantes à coloniser des sols très pauvres en nutriments

tels les moraines glaciaires. Ainsi après la dernière glaciation, l'aulne était la plante dominante en Europe et Amérique du nord (Benson et Silvester 1993 ; Wall 2000). Toutefois, les gènes bactériens et les mécanismes moléculaires entrant en jeu dans la symbiose actinorhizienne sont encore mal compris notamment du fait que les bactéries du genre *Frankia* sont souvent difficiles à cultiver et presque impossibles à manipuler génétiquement, empêchant l'utilisation de mutants (Kucho *et al.* 2010).

L'influence de l'évolution des plantes actinorhiziennes est difficile à caractériser du fait du large spectre d'hôte de *Frankia*, avec sa capacité à entrer en symbiose avec des espèces de plantes différentes. La relation entre l'évolution des plantes et les actinobactéries est peu visible au niveau de l'espèce végétale, mais plus claire au niveau du genre (Huss-Danell 1991 ; Bautista *et al.* 2011). Différentes souches de *Frankia* ont récemment été caractérisées phylogénétiquement, et les résultats ont montré une concordance entre les génomovars de *Frankia* étudiés et les plants hôtes de ces bactéries (Bautista *et al.* 2011). De plus, la phylogénie de la plante et celle de son symbiote sont concordantes, les espèces végétales proches ayant des symbiotes proches phylogénétiquement (Jeong *et al.* 1999 ; Figure 8), suggérant une influence de l'histoire évolutive sur les symbioses actinorhiziennes.

#### II.4 Les symbioses associatives

Les microorganismes vivant librement dans la rhizosphère peuvent également avoir un effet bénéfique sur la plante (van der Heijden *et al.* 2008). Les symbioses associatives concernent les bactéries PGPR, qui peuvent stimuler la croissance des plantes, augmenter leur rendement ou réduire leur agression par des pathogènes (Lugtenberg et Kamilova 2009 ; Figure 10). Nous traiterons de manière séparée l'impact du génotype végétal sur les PGPR phytostimulatrices et phytoprotectrices, bien que certains microorganismes présentent les deux types d'activité (Blaha *et al.* 2006 ; Spaepen *et al.* 2007).



**Figure 10** : Interactions entre les plantes et les bactéries PGPR dans la rhizosphère. Inspiré de Richardson *et al.* 2009.

#### II.4.1 Les PGPR phytostimulatrices

Les PGPR phytostimulatrices influencent la croissance des plantes (i) en améliorant la biodisponibilité de certains nutriments, par exemple en fixant l'azote atmosphérique (Bloemberg et Lugtenberg 2001) ou en solubilisant le phosphate (Richardson *et al.* 2009), (ii) en synthétisant des phytohormones comme des auxines, cytokinines, gibbérellines, ou de l'acide abscissique (Steenhoudt et Vanderleyden 2000 ; Vessey 2003 ; Barea *et al.* 2005), (iii) en modulant le développement des plantes, grâce à une activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, qui va entraîner une élévation racinaire, (iv) en facilitant la mise en place ou le fonctionnement des symbioses mutualistes entre les racines et les bactéries fixatrices d'azote (Remans *et al.* 2007) ou les champignons mycorhiziens (Garbaye 1994 ; Frey-Klett *et al.* 2007 ; Pivato *et al.* 2009).

Certaines de ces propriétés phytobénéfiques sont différentiellement exprimées selon l'espèce ou la variété de plante (Combes-Meynet 2010 ; Remans *et al.* 2009). Elles peuvent également avoir un effet contrasté selon le cultivar étudié. Cela a été montré dans le cas de la production par une souche du genre *Pseudomonas* d'acide indole acétique, une phytohormone de la classe des auxines, dont l'effet sur la croissance racinaire était positif pour le cassis mais négatif pour le griottier (Dubeikovsky *et al.* 1993). Ceci suggère qu'il peut exister un spectre d'hôte d'action chez les bactéries PGPR, comme décrit pour les microsymbiotes. La colonisation et l'impact de l'inoculation de bactéries phytostimulatrices en conditions contrôlées est variable selon le génotype de plante étudié. Cela a été montré pour les principaux genres bactériens phytostimulateurs identifiés à ce jour, comme *Gluconacetobacter* (Munoz-Rojas et Caballero-Mellado 2003), *Pseudomonas* (Liddycoat *et al.* 2009), ou *Azospirillum* (Baldani et Döbereiner 1980 ; Moutia *et al.* 2010). Ces bactéries phytostimulatrices ont donc des propriétés qui théoriquement aident à la croissance des plantes, mais la réponse des plantes à leur inoculation peut être variable. Les systèmes plantes-PGPR ne sont donc pas généralisables au niveau du genre bactérien ou de l'espèce végétale étudiés. Nous pouvons supposer qu'il existe un spectre d'hôte chez les bactéries phytostimulatrices, comme observé chez les symbioses mutualistes.

#### II.4.2 Les PGPR phytoprotectrices

Dans certains sols, on voit apparaître une propriété émergente de résistance du sol à la maladie. Cette résistance est la capacité d'un sol à permettre le développement de plantes saines (faible niveau de maladie) alors que le pathogène est présent et que les conditions climatiques sont favorables au développement de la maladie (Baker *et al.* 1974 ; Elad et Freeman 2002 ; Kyselkova *et al.* 2009). Ainsi, des PGPR phytoprotectrices favorisent la croissance des plantes en réduisant le niveau de certaines maladies. Pour cela, elles peuvent agir (i) par antagonisme en produisant des antibiotiques délétères pour les pathogènes (Sharifi-Tehrani *et al.* 1998, Mazurier *et al.* 2009), (ii) par interférence avec des signaux, en détruisant les molécules signal des pathogènes (Lugtenberd et Kamilova 2009), (iii) en activant la résistance systémique induite de type ISR des plantes, qui augmentera la résistance végétale à l'attaque de pathogènes (van Loon 2007), ou (iv) en contrôlant la croissance des pathogènes par la compétition pour les éléments nutritifs, comme par exemple, la compétition pour le carbone (Lemanceau *et al.* 1988) et la compétition pour le fer dont la biodisponibilité dans le sol est très faible (Lemanceau *et al.* 2009).



Le génotype de plante est un facteur influençant certaines de ces propriétés phytobénéfiques. C'est notamment le cas lorsque l'on s'intéresse à l'ISR, qui est une stimulation des mécanismes de défense de la plante par les PGPR phytoprotectrices. La reconnaissance de ces bactéries par les plantes va être variable selon l'espèce de plante étudiée (van Wees *et al.* 1997 ; van Loon 2007), et selon la variété à l'intérieur d'une espèce végétale (Liu *et al.* 1995), aboutissant à des niveaux de maladies différents entre ces différents génotypes.

La protection des plantes par des bactéries ayant une activité de biocontrôle des pathogènes a été fortement étudiée pour un genre bactérien capable de produire une large gamme d'antimicrobiens, les *Pseudomonas* fluorescents (Haas et Défago 2005 ; Couillerot *et al.* 2009). Ces bactéries sont influencées par le génotype de plante rencontré au niveau de leur colonisation racinaire (Okubara *et al.* 2004), de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites ayant une activité antimicrobienne, notamment le cyanure d'hydrogène, les phénazines et le 2,4-diacétylphloroglucinol (Jamali *et al.* 2009 ; Mazurier *et al.* 2009 ; Rochat *et al.* 2010), ou de la quantité de certains de ces composés produits (Okubara et Bonsall 2008).

#### II.4.3 Bilan

Ainsi l'étude des symbioses suggère qu'aussi bien au niveau des espèces qu'à celui des variétés de plantes, le végétal a un impact sur le recrutement des microorganismes et la réalisation des fonctions microbiennes. Néanmoins, les processus qui ont généré ces différentes espèces et variétés sont très rarement pris en compte pour comprendre leurs différences d'interaction avec le compartiment microbien. Etudier l'impact de l'histoire évolutive du végétal sur le recrutement et l'activité des bactéries PGPR est une piste intéressante pour identifier les lignées les plus efficaces pour recruter les PGPR et mieux lutter contre les phytopathogènes.

### **III/ Impact de l'évolution des plantes sur les communautés microbiennes de la rhizosphère**

Les évolutions conjointes et prolongées entre deux ou plusieurs partenaires sont visibles et communes à la majorité des espèces vivantes. Chaque organisme vivant est au contact non pas d'un ou deux partenaires, mais d'une communauté entière, avec qui il

interagit en permanence. C'est la somme de ces interactions, certaines positives et d'autres délétères, qui va conditionner son fonctionnement et son développement. Ce contexte permet la mise en place de phénomènes de coévolution à l'échelle des communautés en interaction (Ley *et al.* 2008a). Si l'on se place dans le contexte d'évolution, on suppose qu'une ascendance commune produit des similitudes écologiques entre espèces étroitement apparentées ayant des niches écologiques semblables (Freckleton *et al.* 2002 ; Wiens *et al.* 2005). Ceci peut être relié à l'observation de Darwin qui disait que la lutte pour l'existence est la plus sévère entre espèces apparentées, car elles partagent les mêmes phénotypes et spécificités de niche (Darwin 1859). Les interactions interspécifiques comprennent une part substantielle de la niche totale de la plupart des espèces (Chase et Leibold 2003). Et logiquement cela suggère que deux espèces étroitement apparentées sont susceptibles d'interagir plus avec des partenaires similaires que des espèces éloignées, parce que les traits phénotypiques qui régulent les interactions sont souvent phylogénétiquement conservés (Sasal *et al.* 1998 ; Jackson *et al.* 2004 ; Gilbert *et al.* 2007 ; Holmes *et al.* 2009). Cette hypothèse peut être étudiée en analysant les corrélations entre les distances évolutives entre les hôtes et les distances de diversité entre communautés microbiennes associées. Nous ferons ici une revue des études concernant l'impact de l'histoire évolutive des hôtes eucaryotes sur la structuration de la communauté microbienne associée, notamment lorsqu'elles s'intéressent à l'impact de l'évolution des plantes sur la communauté bactérienne rhizosphérique dans son ensemble. Pour cela, nous ferons tout d'abord un bilan des études sur l'évolution d'un hôte et de sa communauté associée, puis nous nous intéresserons à l'influence de l'évolution des plantes sur la communauté bactérienne rhizosphérique en termes (i) de diversité et (ii) de fonctionnement.

### III.1 Hôte et communauté microbienne

Chaque organisme vivant interagit en permanence avec une communauté entière d'organismes vivants, et pour mesurer l'impact de l'évolution, la totalité de la communauté présente doit pouvoir être analysée. Or, la très grande majorité des microorganismes ne peut être cultivée, ce qui empêche actuellement toute étude « directe » de ces interactions. Ce n'est que depuis une vingtaine d'années que la diversité procaryote a pu être étudiée grâce à l'analyse de l'ADN ribosomal 16S, présent chez toutes les bactéries et hautement conservé (Edwards *et al.* 1989 ; Weisburg *et al.* 1991).

### III.1.1 Notion espèce, population et communauté

La définition d'espèce chez les eucaryotes considère le critère de reproduction, et donc d'échange de gènes, pour définir l'unité taxonomique. La notion de population eucaryote a été introduite par Johannsen (1903) et est décrite comme un ensemble d'individus se reproduisant par la voie sexuée et vivant dans un même écosystème. On considère que deux populations sont différenciées lorsque les individus qui les composent n'échangent pas assez de matériel génétique entre eux pour maintenir une homogénéité génétique entre elles. Pour les bactéries, la notion d'espèce est actuellement discutée en terme de similarité globale entre souches. Ainsi deux souches seront considérées comme appartenant à la même espèce si les niveaux d'hybridations ADN / ADN entre leur deux génomes se révèlent supérieures à 70 % dans des conditions standards avec un  $T_m \leq 5^\circ\text{C}$ , ce qui correspond souvent à des séquences de gènes ribosomiaux 16S présentant plus de 98,7 % d'identité (Stackebrandt *et al.* 2002). Ainsi, la notion d'espèce bactérienne ne prend pas en compte de critères écologiques, mais considère plutôt la cohérence génomique entre souches de la même espèce, c'est à dire une définition d'espèce génomique. Néanmoins, une prise en compte de leur écologie pour la définition d'unités taxonomiques cohérentes a été proposée (Cohan et Perry 2007). Au sein des espèces, les groupes ayant des rôles écologiques distants sont appelés écotypes (Konstantinidis *et al.* 2006). Alors que les méthodes actuelles de systématique bactérienne ne parviennent pas toujours à structurer le monde bactérien en unités ayant un sens du point de vue écologique (Fraser *et al.* 2009), certains auteurs se sont intéressés à caractériser la niche spécifique d'une espèce génomique (Lassalle *et al.* 2011). L'identification par le séquençage de l'ADNr 16S n'apporte pas d'information quant à la fonction de la bactérie considérée, mais permet d'identifier l'ensemble des taxons bactériens présents dans le même site géographique et formant la communauté.

### III.1.2 Outils d'étude de la communauté

L'étude de la diversité microbienne nécessite l'utilisation d'outils moléculaires permettant d'analyser la quasi-totalité des individus de cette communauté et d'identifier les espèces clés. Les méthodes de culture des microorganismes permettent l'identification des microorganismes cultivables et non ceux étant dans un stade viable mais non cultivable ou que l'on ne sait pas encore cultiver, ce qui permet d'étudier moins de 1% des bactéries présentes dans le sol (Torsvik et Øvreås 2002). Ce n'est qu'avec l'avènement d'approches de biologie moléculaire que la diversité de la communauté procaryote peut être analysée.

Les phospholipides sont une composante majeure des membranes cellulaires. Le type (longueur, ramification) et l'abondance des acides gras des phospholipides varient dans divers groupes microbiens. L'analyse des phospholipides (Phospholipid fatty acid [PLFA]) peut donc servir de signature d'un groupe bactérien (Hill *et al.* 2000). L'emploi de la chromatographie en phase gazeuse des PLFAs (ou de leurs dérivés, les esters méthyliques d'acides gras, FAME) extrait d'un l'échantillon de sol offre une image brute de la composition des communautés microbiennes (bactéries et eucaryotes microbiens ; Fierer *et al.* 2003; Grayston *et al.* 2004). Néanmoins, les limites de cette méthode restent (i) une faible résolution et (ii) la possibilité limitée d'identification (un organisme peut présenter différents modèles PLFA dans des conditions environnementales différentes).

La majorité des méthodes est basée sur l'analyse de séquences d'acides nucléiques de gènes conservés entre toutes les espèces, en général des gènes codant des fonctions primordiales au fonctionnement cellulaire. Dans les génomes bactériens, les gènes codant pour les ARN ribosomiques sont organisés en un opéron, leur ordre étant habituellement 16S-23S-5S (ARN nommés en fonction de leurs constantes de sédimentation ; Brosius *et al.* 1981). Le gène *rrs* (le gène de l'ARNr 16S) est conservé parmi les bactéries, mais il contient plusieurs régions variables qui diffèrent par leur longueur et leur composition selon le groupe bactérien (Edwards *et al.* 1989 ; Weisburget *et al.* 1991). Ces différences de séquences sont utilisées pour la création d'empreintes moléculaires de la communauté (Osborn *et al.* 2000; Mills *et al.* 2003; Gotz *et al.* 2006). En outre, le séquençage des gènes *rrs* à partir d'un échantillon de l'environnement permet l'identification des membres (au niveau du genre et/ou de l'espèce) de la communauté et de reconstruire leur phylogénie (Woese 1987; Wackett 2008).

Ainsi, en extrayant l'ADN métagénomique (ADN de toute la communauté procaryote et eucaryote), ces méthodes ont été largement utilisées pour l'analyse de la diversité microbienne de nombreux environnements, dont les tubes digestifs et le sol (Ranjard *et al.* 2000 ; Torsvik et Ovreas 2002 ; Zhao *et al.* 2011), chacune ayant des avantages et des inconvénients. Les techniques d'empreintes moléculaires, la DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*), TTGE (*Temporal temperature gel electrophoresis*), l'ARDRA (*Amplified rDNA restriction analysis*), la T-RFLP (*Terminal restriction fragment length polymorphism*), la RISA (*Ribosomal intergenic spacer analysis*), et autres permettent de comparer des profils reflétant la composition des communautés de différents échantillons, mais l'identification des populations bactériennes présentes est impossible de façon directe, et nécessite une étape

supplémentaire de clonage-séquençage (Zak *et al.* 2006 ; Smalla *et al.* 2007 ; Moura *et al.* 2009).

D'autres techniques de biologie moléculaire permettent par contre d'étudier la diversité d'un échantillon et d'avoir une identification des taxons présents simultanément : la puce à ADN de génotypage et le séquençage haut débit. Il existe des puces à ADN taxonomiques, qui permettent d'étudier la diversité des espèces présentes en ciblant l'ADNr 16S (Sanguin *et al.* 2006 ; deAngelis *et al.* 2009 ; Kyselková *et al.* 2009), contrairement aux puces à ADN fonctionnelles, qui ciblent cette fois un ou des gène(s) impliqué(s) dans le fonctionnement d'un écosystème (Zhang *et al.* 2007). La technique des puces à ADN est fondée sur l'hybridation d'ADN marqué par fluorescence sur des sondes fixées à la puce à ADN. Ces sondes ciblant des taxons particuliers, il est alors possible de déterminer les populations présentes (selon les sondes hybridées), ainsi que la taille relative de ces populations (selon le niveau d'intensité du signal). Le séquençage haut débit permet de séquencer les produits de PCR des ADN cibles obtenus à partir du métagénome (analyse de la diversité), voire de séquencer tout le métagénome (analyse de la diversité et des fonctions ; Venter *et al.* 2004).

### III.1.3 Impact de l'histoire évolutive d'un hôte sur sa communauté microbienne

Les techniques de biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence l'immense diversité bactérienne présente dans tous les environnements et au sein de tous les êtres vivants (Smalla *et al.* 2007 ; Moura *et al.* 2009 ; Li *et al.* 2011). Ces études permettent également d'étudier à une plus large échelle l'impact de l'évolution des hôtes eucaryotes sur les communautés microbiennes symbiotiques ou commensales, en ne ciblant plus les mécanismes d'interaction et de colonisation des partenaires mais la résultante de ces mécanismes: les communautés présentes.

Depuis quelques années, l'apparition de méthodes de séquençage plus performantes a permis d'analyser le métagénome bactérien des hôtes eucaryotes, en générant des informations importantes sur les propres communautés microbiennes de l'Homme. En effet, l'intestin de l'Homme présente une grande diversité de microorganismes (Andersson *et al.* 2008 ; Ley *et al.* 2008a ; Whitman *et al.* 1998), et tout comme les PGPR pour les plantes, plusieurs de ces microorganismes sont essentiels pour la santé des humains puisqu'ils leur permettent l'assimilation de nutriments essentiels (acides aminés ; Bäckhed *et al.* 2005), empêchent l'invasion par des pathogènes (Hooper et Gordon 2001), et permettent la

maturation du système immunitaire (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004 ; Mazmanian *et al.* 2005 ; Round et Mazmanian 2009). Des analyses comparatives de la diversité et l'abondance des populations bactériennes intestinales ont mis en évidence que la structuration de la communauté est influencée par de nombreux facteurs de l'hôte, dont son type de diète (Ley *et al.* 2008b ; Faith *et al.* 2011) ou son génotype (Kovacs *et al.* 2011). L'analyse de la communauté microbienne présente dans l'intestin d'hôtes vertébrés (mammifères incluant muridés, équidés, félins, primates, humains) par des approches métagénomiques a montré un impact de la diversité infra et interspécifique de l'hôte (Ley *et al.* 2008a ; Kovacs *et al.* 2011). En replaçant dans un contexte d'évolution des hôtes, les auteurs de ces études ont pu mettre en évidence une relation entre l'évolution des mammifères et la composition des communautés bactériennes présentes (Ley *et al.* 2008a). Les espèces hôtes proches ont des communautés bactériennes plus semblables que des espèces plus éloignées phylogénétiquement. Par conséquent, l'histoire évolutive des mammifères a conduit à une évolution des communautés bactériennes présentes dans leur intestin, et ceci peut s'expliquer par une spécificité d'attachement aux cellules de l'hôte (Walter *et al.* 2011), et également par une modification des communautés suite à une modification des régimes diététiques (herbivores, carnivores ou omnivores) au cours de l'évolution (Ley *et al.* 2008b ; Faith *et al.* 2011 ; Walter *et al.* 2011). De manière intéressante on peut noter que ce constat est transposable au tube digestif des termites, pour lesquelles l'analyse du métagénome (diversité et fonction) a corrélié l'évolution des termites à la structuration de leur communauté bactérienne intestinale (Hongoh *et al.* 2005).

De telles études restent difficiles à mettre en place, car elles nécessitent d'avoir à la fois une bonne connaissance de la phylogénie des hôtes, et de caractériser un grand nombre d'espèces bactériennes pour chacun des hôtes. Actuellement, seules des études portant sur l'analyse des communautés intestinales ont été réalisées, et permettent de mieux connaître un système écologique ayant un rôle important dans la santé des hôtes (notamment humains) (Turnbaugh *et al.* 2006 ; Li *et al.* 2008 ; McKenna *et al.* 2008). Nous pouvons toutefois penser que des résultats comparables pourraient être trouvés en prenant en compte d'autres espèces hôtes, aussi bien animales que végétales. Dans ce contexte, mon travail de thèse devait notamment permettre de mieux comprendre l'impact de l'histoire évolutive végétale sur des communautés bactériennes du sol, qui ont également un rôle important sur la croissance et la santé des plantes. La prise en compte de paramètres évolutifs de l'hôte dans l'étude des communautés microbiennes associées est essentielle pour mieux comprendre l'écologie des interactions.

### III.2 Impact de l'histoire évolutive végétale sur la diversité microbienne du sol

L'histoire évolutive des plantes a conduit à l'apparition d'un grand nombre d'espèces végétales, elles-mêmes présentant une grande diversité génétique, de sous-espèces ou de variétés (Salamini *et al.* 2002 ; Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006 ; Vaughan *et al.* 2008). Chaque plante va avoir un impact sur les communautés microbiennes du sol, appelé effet rhizosphère, au niveau de la quantité de microorganismes, de leur activité ou de leur diversité (Baudoin *et al.* 2003 ; Sanguin *et al.* 2006). Concernant l'effet rhizosphère, les différents génotypes de plante, par l'intermédiaire de leurs propriétés phénotypiques telles que les exsudats produits par la racine, leur métabolisme ou la structure de leur système racinaire, vont avoir un impact important sur les communautés microbiennes dans leur ensemble (Fan *et al.* 2001; Bertin *et al.* 2003; Bais *et al.* 2006 ; Micallef *et al.* 2009). Les populations microbiennes interagissent avec la plante au sein des racines et dans la rhizosphère, et ces deux compartiments seront traités de façon séparée dans la suite de cette partie.

#### III.2.1 Les communautés microbiennes endophytes

Les organismes endophytes sont des endosymbiotes des végétaux, qui ne sont pas délétères pour l'hôte et n'induisent pas de symptômes de maladie (Reinhold-Hurek et Hurek 2011). Contrairement aux communautés rhizosphériques qui proviennent du sol environnant et qui sont sélectionnées par la plante tout au long de sa croissance, les communautés microbiennes endophytes bactériennes et fongiques sont en partie transmises verticalement, de la lignée maternelle à la lignée fille, au niveau de la graine (Saikkonen *et al.* 2004 ; Rosenblueth et Martinez-Romero 2006 ; Selosse et Schardl 2007 ; Johnston-Monje et Raizada 2011 ; Reinhold-Hurek et Hurek 2011). Toutefois, comme pour les associations *Rhizobium* fabacée, une part importante des populations endophytes est recrutée par le végétal à partir du sol présent au contact de la racine (Frohlich *et al.* 2000 ; Rosenblueth et Martinez-Romero 2006 ; Arnold 2007 ; Reinhold-Hurek et Hurek 2011). Dans ce dernier cas, ce sont les propriétés phénotypiques de la plante qui influencent le recrutement des microorganismes endophytes des racines. Par conséquent, les propriétés du génotype végétal vont moduler la diversité microbienne endophyte.

La communauté endophyte est généralement moins grande et moins riche (diversité) que la communauté rhizosphérique, mais elle est retrouvée chez toutes les espèces végétales étudiées (Rosenblueth et Martinez-Romero 2006 ; Rothballer *et al.* 2009). Le génotype végétal est un facteur important à prendre en compte dans l'étude de la communauté

microbienne endophyte, bactérienne et fongique (Zhou et Hyde 2001). En effet, d'importantes différences ont été trouvées concernant l'effectif de la communauté totale entre différentes espèces de plantes, mais également entre différentes variétés d'une même espèce végétale (Wieland *et al.* 2001 ; Adams et Kloepper 2002). D'importantes différences ont également été montrées au niveau de la diversité des communautés microbiennes présentes au sein de différents génotypes (Siciliano *et al.* 1998 ; Germida et Siciliano 2001 ; Rasche *et al.* 2006 ; Ulrich *et al.* 2008 ; van Overbeek et van Elsas 2008). De manière remarquable des différences génétiques même très faibles entre deux plantes, comme celle retrouvée entre une plante mutante et sa variété sauvage, peuvent aboutir à une modification de la communauté bactérienne endophyte (Offre *et al.* 2007 ; Ikeda *et al.* 2008 ; Saunders et Kohn 2009).

Les différentes variétés ou espèces végétales retrouvées de nos jours sont le résultat d'une longue évolution de leur patrimoine génétique, comme nous le décrivons dans le point (II.1). Par conséquent, les propriétés physicochimiques variables selon les génotypes de plante et leur impact sur les communautés microbiennes endophytes sont susceptibles d'être liées à l'histoire évolutive du végétal. Néanmoins, une seule étude le mentionne explicitement, en proposant une relation entre l'évolution du genre *Zea* (des lignées de maïs actuel, une téosinte et quelques espèces proches phylogénétiquement) et la communauté bactérienne endophyte des graines (Johnston-Monje et Raizada 2011).

### III.2.2 Les communautés microbiennes rhizosphériques

La rhizosphère, zone d'interaction entre la plante et les microorganismes du sol, est une zone très active, où de nombreux échanges ont lieu (Somers *et al.* 2004 ; Bais *et al.* 2006 ; Cooper 2007 ; Pothier *et al.* 2007 ; Badri *et al.* 2009). Ce compartiment héberge une communauté microbienne riche, comprenant jusqu'à  $10^{10}$  bactéries par gramme de sol (Gans *et al.* 2005 ; Roesch *et al.* 2007), et diversifiée (Kyselková *et al.* 2009 ; Gomes *et al.* 2010 ; Somenahally *et al.* 2011). Les propriétés phénotypiques racinaires telles que la structure du système racinaire, le profil d'exsudation racinaire, la capacité d'acquisition de nutriments et d'eau diffèrent en fonction du génotype de la plante et influent sur les interactions avec les populations microbiennes (Czarnota *et al.* 2003 ; de Dorlodot *et al.* 2007 ; Comas et Eissenstat 2009). Cela se traduit par des différences de structure entre communautés microbiennes associées aux différents génotypes végétaux.

Les différences de communautés microbiennes rhizosphériques ont été montrées lors de comparaisons interspécifiques (Grayston *et al.* 1998 ; Marschner *et al.* 2001 ; Wieland *et*



al. 2001 ; Costa *et al.* 2006 ; Berg et Smalla 2009) ou infraspécifiques (Siciliano *et al.* 1998 ; Germida et Siciliano 2001 ; van Overbeek et van Elsas 2008 ; Berg et Smalla 2009 ; Inceoglu *et al.* 2010). Il est important de remarquer que le génotype de plante a une influence importante sur la composition de la communauté microbienne, mais plus faible sur l'abondance des microorganismes présents (Broz *et al.* 2007 ; Aira *et al.* 2008). De plus, des génotypes végétaux présentant une mutation qui entraîne une variation de leur profil d'exsudation racinaire vont recruter dans leur rhizosphère une communauté différente de celle associée au génotype sauvage (Brusetti *et al.* 2005 ; Aira *et al.* 2008). L'ensemble de ces données suggère que les différences de composition des exsudats racinaires pourraient être à l'origine des différences de composition des communautés microbiennes rhizosphériques (Grayston *et al.* 1998 ; Brusetti *et al.* 2005 ; Aira *et al.* 2008).

Ces différences de communautés microbiennes rhizosphériques entre génotypes de plante suggèrent, comme nous l'avons décrit pour les communautés endophytes, que l'histoire évolutive des plantes pourrait jouer un rôle dans ce recrutement. Toutefois, aucune étude à notre connaissance n'a évalué le lien potentiel entre phylogénie végétale et capacité des lignées à recruter une communauté bactérienne rhizosphérique. Ce travail de thèse vise à apporter des éléments de réponse sur cet enjeu scientifique.

### III.3 Impact de l'histoire évolutive végétale sur le fonctionnement microbien

#### Analyse du fonctionnement microbien

Les communautés microbiennes présentes dans la phyllosphère (surface des parties aériennes de la plante), au sein de la rhizosphère ou dans les racines des plantes (endophytes) peuvent être analysées en termes taxonomiques et fonctionnels. Du point de vue taxonomique, il s'agit de caractériser les populations et taxons présents, en identifiant la totalité des espèces, actives et dormantes dans le compartiment analysé. Du point de vue fonctionnel, l'objectif est d'identifier les populations participant spécifiquement à des activités et fonctions microbiennes et contribuant ainsi au fonctionnement biologique de la rhizosphère, en analysant des populations fonctionnelles de microorganismes. Cette seconde approche de la communauté microbienne correspond à l'analyse d'un ensemble d'espèces (ou d'une partie de leurs membres) participant à une fonction donnée, aussi appelé groupe fonctionnel ou communauté fonctionnelle. Leur étude peut être effectuée en analysant un gène marqueur représentant cette fonction, comme le gène *nifH* (codant la protéine Fe de la nitrogénase) dans

le cas du groupe fonctionnel des bactéries fixatrices d'azote. De manière plus générale, il est possible d'analyser l'activité d'un groupe fonctionnel par des mesures directes du produit d'une réaction enzymatique (par exemple quantifier la production d'antibiotique), et/ou des mesures indirectes en analysant un produit intermédiaire ou un indicateur du processus (par exemple la réduction d'acétylène en éthylène). La mesure directe d'azote accumulé par les organismes diazotrophes dans les environnements naturels se heurte à des problèmes techniques et de précision. Or, l'acétylène est un substrat plus compétitif (Barney *et al.* 2009) que l'azote pour la nitrogénase, aussi pour mesurer l'activité fixatrice d'azote la mesure de la réduction de l'acétylène en éthylène peut être employée (Poly *et al.* 2001 ; Herridge *et al.* 2008). Cependant, la mesure d'activité ne renseigne pas sur les populations actives. Seule l'analyse d'un gène représentatif de la fonction et donc du groupe fonctionnel permet une analyse de la taille et de la diversité de ce dernier, ce qui permet de définir le potentiel du groupe fonctionnel (Poly *et al.* 2001). Et, au sein de la communauté fonctionnelle, seule une partie des individus va exprimer la fonction et être responsable de l'activité métabolique dans le biotope étudié. L'étude de ces populations est possible à travers l'analyse des ARNm (transcrits du gène) ou des protéines (Dixon et Khan 2004 ; Zak *et al.* 2006 ; Baelum *et al.* 2008).

### *Communautés fonctionnelles phytobénéfiques*

Nous avons vu dans les parties II.3 et II.4, que de nombreuses espèces microbiennes phytobénéfiques sont au contact des plantes et agissent de manière particulière au niveau de la symbiose. Cependant, des propriétés communes sont retrouvées chez différents genres ou embranchements comprenant des bactéries phytobénéfiques, comme la capacité à fixer l'azote atmosphérique. Dans le cadre d'interactions directes, des groupes fonctionnels de bactéries agissant directement sur le développement de la plante (nutrition, production de phytohormones) ont été analysés. L'un des plus étudiés est le groupe fonctionnel des bactéries fixatrices d'azote qui est particulièrement important, du fait de son rôle dans la nutrition azotée de la plante et dans la réalisation d'un cycle biogéochimique majeur (Knauth *et al.* 2005 ; Izquierdo et Nusslein 2006 ; Hsu et Buckley 2009 ; Turk *et al.* 2011). C'est une fonction retrouvée au sein de bactéries très diverses, aussi bien des symbiotes mutualistes, des bactéries libres que des pathogènes (Herridge *et al.* 2008). Le gène *nifH* codant la sous-unité Fe de la nitrogénase étant bien conservé, il est possible de suivre la communauté en analysant la diversité de ce gène (Poly *et al.* 2001 ; Dixon et Kahn 2004). Ainsi plusieurs approches de

DDGE et analyses T-RFLP mirent en évidence que la structuration de la communauté des bactéries fixatrices d'azote est influencée en termes de quantité et/ou de composition par l'espèce végétale hôte (niveau interspécifique) (Perin *et al.* 2006), et/ou par la variété de plante (niveau infraspécifique) (Coelho *et al.* 2009 ; Wu *et al.* 2009). Des analyses des transcrits du gène *nifH* extraits de rhizosphère de différentes variétés d'une même espèce de plante montrent que seule une fraction de la communauté fonctionnelle exprime le gène *nifH* et que cette fraction est composée d'espèces bactériennes différentes selon la variété de plante (Orr *et al.* 2011; Knauth *et al.* 2005; Warttainen *et al.* 2008; Mårtensson *et al.* 2009), suggérant une influence du génotype de plante sur le fonctionnement des bactéries fixatrices d'azote. Parallèlement, des études ont mis en évidence que d'autres groupes fonctionnels participant au cycle de l'azote, comme les bactéries nitrifiantes (Briones *et al.* 2002 ; Patra *et al.* 2006 ; Morgan *et al.* 2008 ; Ollivier *et al.* 2010) et dénitrifiantes (Patra *et al.* 2006 ; Bremer *et al.* 2007 ; Morgan *et al.* 2008 ; Ruiz-Rueda *et al.* 2009 ; Ollivier *et al.* 2010), étaient également influencés par l'espèce ou la variété de plante. Ces observations sont transposables au groupe fonctionnel des solubilisateurs de phosphate. Le phosphore, autre élément essentiel pour la croissance des plantes, est assimilé par ces dernières sous forme d'ions (essentiellement  $\text{HPO}_4^{2-}$  and  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), qui sont présents en faible quantité à l'état soluble dans le sol (Richardson *et al.* 2009 ; Ramaekers *et al.* 2010). Le recrutement de populations de microorganismes capables de solubiliser les formes minérales du phosphate et le rendant alors biodisponible (Richardson et Simpson 2011), est également influencé par l'espèce végétale hôte (Kaepler *et al.* 2000 ; Chen *et al.* 2002 ; Ramaekers *et al.* 2010).

Dans les systèmes bactéries-plantes, il y a aussi des interactions indirectes qui influenceront le développement du végétal. Ainsi, au sein de la rhizosphère, des bactéries vont protéger la plante des agressions de pathogènes par compétition ou antagonisme vis-à-vis de ces derniers. L'influence du génotype végétal sur le recrutement de bactéries phytoprotectrices au sein des rhizosphères a été mis en évidence pour plusieurs groupes fonctionnels, comme celui des *Pseudomonas* fluorescents produisant du 2,4-diacétylphloroglucinol (antifongique, antibiotique) (Gu et Mazzola 2003 ; Picard *et al.* 2004 ; Bergsma-Vlami *et al.* 2005 ; Picard et Bosco 2006 ; Frapolli *et al.* 2010 ; Meyer *et al.* 2010), ou les producteurs de cyanure d'hydrogène (HCN) (Jamali *et al.* 2009 ; Rochat *et al.* 2010).

Ces différentes études sur des groupes fonctionnels montrent que le génotype de plante influence le recrutement de communautés fonctionnelles du sol, et influencerait également l'expression génique au sein des populations les constituant (analyse des ARNm). Nous pouvons nous demander si ces différences mesurées entre cultivars et entre espèces sont

issues des adaptations liées à l'évolution du végétal. Il est donc important de prendre en compte l'évolution de l'hôte végétal lors d'études sur la formation des communautés microbiennes. Nous pourrions peut-être alors décrypter un peu mieux la construction des interactions dans la rhizosphère, et générer de nouveaux outils pour faciliter le pilotage des groupes fonctionnels phytobénéfiques selon les cultivars utilisés.

## **Conclusion**

En conclusion, les interactions durables et les processus de coévolution ont fortement modulé l'évolution des hôtes eucaryotes. Dans le cas des plantes, l'évolution a abouti à une très grande diversité d'espèces et de variétés, dont les effets sur les communautés microbiennes associées peuvent être importants mais varier selon le génotype de plante. Les différents génotypes végétaux peuvent avoir un impact sur les interactions plantes-bactéries des premières étapes de colonisation microbienne sur la racine à l'établissement de la communauté microbienne. Il est important d'analyser les communautés microbiennes dans un contexte d'évolution végétale, afin de déterminer si cette évolution a eu un rôle important dans la sélection des bactéries du sol au contact des plantes, et si oui, s'il est possible d'identifier des lignées recrutant plus efficacement les populations indigènes de bactéries phytobénéfiques.



---

## Partie expérimentale 1

Influence de l'histoire évolutive du maïs sur  
la sélection bactéries du sol dans la  
rhizosphère

---

## **Introduction**

Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, le microbiologiste hollandais Martinus Beijerinck postulat que « *Alles is overal: maar het milieu selecteert* » (tout est partout: mais l'environnement sélectionne, dans de Wit et Bouvier (2006) qui citent : Beijerinck 1913 ; Baas-Becking 1934). Selon cette proposition, tous les microorganismes seraient présents dans toute la biosphère, mais dans un environnement particulier la majorité de ces organismes est présente de manière latente, c'est-à-dire à de faibles niveaux d'effectif et d'activité, alors que les autres sont sélectionnés (Baas-Becking 1934). Les conditions de l'environnement peuvent effectivement représenter une pression de sélection forte (Martiny *et al.* 2006), mais la vision de Beijerinck a été souvent décriée, car il s'avère que tous les microorganismes ne colonisent pas tous les milieux de la biosphère (Loupzone *et al.* 2007, Tamames *et al.* 2010). Néanmoins, les interactions biologiques sont évolutivement conservées à travers l'arbre de la vie, selon les résultats de Gomez et collègues (2010) compilés pour 116 clades appartenant aux 7 règnes (Archées, Bactéries, Chromalveolata, Excavata, Champignons, Plantes et Animaux) des 3 domaines cellulaires (archées, bactéries et eucaryotes). Prenant également en compte les niveaux de redondance fonctionnelle dans la plupart des communautés, on peut s'attendre à ce que chaque communauté microbienne suffisamment diversifiée puisse accomplir les mêmes fonctions, bien que les taxons/organismes présents ne soient pas forcément les mêmes partout.

Le sol présente une très grande diversité de microorganismes, qui vont interagir avec la plante au niveau de la rhizosphère. Les exsudats racinaires des plantes jouent un rôle essentiel dans ce processus de colonisation de la rhizosphère par les bactéries, car ils comprennent des nutriments organiques, des signaux et des toxines (Berg et Smalla 2009). Il est établi que les exsudats varient selon l'espèce de plante (Vančura et Hanzlíková 1972), mais également entre variétés d'une même espèce de plante (Czarnota *et al.* 2003), ce qui signifie que différents génotypes végétaux ne vont pas recruter les mêmes microorganismes rhizosphériques. Ces différences de recrutement et donc de composition de la communauté bactérienne vont avoir, en retour, un impact sur les conditions de croissance et de développement des plantes, car cette communauté bactérienne peut inclure à la fois des taxons avec des effets phytobénéfiques (El Zemrany *et al.* 2006) et d'autres qui sont au contraire des phytopathogènes (Escobar et Dandekar 2003). Cependant, ces interactions plante-bactérie n'ont souvent été étudiées qu'à l'échelle de taxons bactériens particuliers (Dalmastri *et al.* 1999; Picard *et al.* 2004), sans prendre en compte explicitement l'histoire évolutive du

partenaire végétal. Nous nous sommes donc demandé quel pouvait être l'impact de l'histoire évolutive de l'espèce végétale sur la totalité de la communauté bactérienne du sol, avec l'hypothèse que des variétés génétiquement proches sélectionneraient des communautés microbiennes plus similaires que des variétés phylogénétiquement plus éloignées au sein de l'espèce. Nous avons considéré cette hypothèse dans le cas du maïs.

Les différentes techniques de biologie moléculaire d'analyse de la diversité bactérienne ciblent généralement le gène codant l'ARNr 16S, qui est bien conservé chez les bactéries mais possède des régions variables permettant de discriminer des taxons bactériens. Ces méthodes ont été largement utilisées pour l'analyse de la diversité microbienne dans le sol (Ranjard *et al.* 2000 ; Torsvik et Ovreas 2002 ; Zhao *et al.* 2011). Elles incluent des approches de type puce à ADN taxonomique 16S (Sanguin *et al.* 2006 ; deAngelis *et al.* 2009 ; Kyselková *et al.* 2009). Cette technique présente l'avantage de permettre une identification directe des taxons présents, contrairement aux techniques d'empreintes moléculaires, qui nécessitent en plus une étape de clonage-séquençage, et nous l'avons choisie pour cette étude.

Pour déterminer l'influence de l'histoire évolutive du maïs sur la composition de la communauté bactérienne rhizosphérique, nous avons pris en compte la structuration du maïs en cinq groupes génétiques principaux définis sur la base de 67 marqueurs microsatellites (Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006). Pour cette étude, 10 lignées de maïs appartenant à ces cinq groupes génétiques de maïs ont été cultivées en serre dans un même sol européen (un luvisol provenant de La Côte Saint André) pendant 21 jours. Les communautés bactériennes présentes dans la rhizosphère de ces différentes lignées de maïs ou dans le sol non planté ont été analysées en utilisant une puce à ADN taxonomique 16S développée au laboratoire (Sanguin *et al.* 2006 ; Kyselková *et al.* 2009). Les résultats montrent que l'appartenance de la lignée à un groupe génétique de maïs, résultant de la diversification de l'espèce après la domestication, est un facteur influençant la composition de la communauté bactérienne rhizosphérique. Toutefois, les distances génétiques entre les lignées ne permettent pas d'expliquer les différences entre les communautés rhizobactériennes correspondantes. L'ensemble de ces données fait l'objet d'un manuscrit accepté pour publication dans *Molecular Ecology*.



## **Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots ?**

MARIE-LARA BOUFFAUD<sup>1,2,3</sup>, MARTINA KYSELKOVA<sup>1,2,3,4</sup>,  
BRIGITTE GOUESNARD<sup>5</sup>, GENEVIEVE GRUNDMANN<sup>1,2,3</sup>,  
DANIEL MULLER<sup>1,2,3</sup> and YVAN MOËNNE-LOCCOZ<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> *Université de Lyon, F-69622, Lyon, France*

<sup>2</sup> *Université Lyon 1, Villeurbanne, France*

<sup>3</sup> *CNRS, UMR5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, France*

<sup>4</sup> *Biology Centre AS CR, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic*

<sup>5</sup> *INRA, UMR 1334 AGAP, F- 34398 Montpellier, France*

*Current address of MK: Biology Centre AS CR, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic*

*Keywords:* rhizosphere, taxonomic microarray, plant diversity, *Zea mays*, bacterial community

Correspondence: Yvan Moënne-Loccoz, Fax: +33 472 43 12 23; E-mail: yvan.moenne-loccoz@univ-lyon1.fr

*Running title:* Maize diversification and root bacteria

## **Abstract**

A wide range of plant lines has been propagated by farmers during crop selection and dissemination, but consequences of this crop diversification on plant-microbe interactions have been neglected. Our hypothesis was that crop evolutionary history shaped the way the resulting lines interact with soil bacteria in their rhizospheres. Here, the significance of maize diversification as a factor influencing selection of soil bacteria by seedling roots was assessed by comparing rhizobacterial community composition of inbred lines representing the five main genetic groups of maize, cultivated in a same European soil. Rhizobacterial community composition of 21-day-old seedlings was analyzed using a 16S rRNA taxonomic microarray targeting 19 bacterial phyla. Rhizobacterial community composition of inbred lines depended on the maize genetic group. Differences were largely due to the prevalence of certain *Betaproteobacteria* and especially *Burkholderia*, as confirmed by quantitative PCR and cloning/sequencing. However, these differences in bacterial root colonization did not correlate with plant microsatellite genetic distances between maize genetic groups or individual lines. Therefore, the genetic structure of maize that arose during crop diversification (resulting in five main groups), but not the extent of maize diversification itself (as determined by maize genetic distances), was a significant factor shaping rhizobacterial community composition of seedlings.

## **Introduction**

Soil microbial community displays high taxonomic and functional diversity, and plays key roles in nutrient cycling and biotic interactions, especially with plants (Raaijmakers *et al.* 2009). Plant roots are colonized by a wide range of microorganisms, which use organic exudates and other rhizodeposits as growth substrates (Berg & Smalla 2009). These microorganisms may have neutral, detrimental or beneficial effects on growth and functioning of the host plant (Escobar & Dandekar 2003; Alabouvette *et al.* 2006; Tyler & Triplett 2008; Aroca & Ruiz-Lozano 2009; Raaijmakers *et al.* 2009). Therefore, understanding how plant roots select soil microbes to form the microbial community of the rhizosphere is an important scientific issue when considering plant growth and health, and this information may be useful to better exploit plant germplasm stemming from crop diversification (Den Herder *et al.* 2010).

A high number of studies have dealt with the diversity of the microbial community of the rhizosphere, especially in the case of cultivated plants (Kandeler *et al.* 2002; Smalla *et al.* 2001; Sun *et al.* 2008). Most cultivated plants are characterized by evolutionarily recent (i.e. within the last 12,000 years) events of domestication and man-driven selection (Purugganan & Fuller 2009). The latter have accompanied their dissemination to different regions of the world, leading to different species or subspecies according to local environmental conditions of culture (reviewed by Salamini *et al.* 2002). This has resulted in morphological modifications that make the crops easier to harvest, especially increasing seed size. Maize arose from the domestication of a teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) in Mexico around 9,000 years ago (Matsuoka *et al.* 2002; Doebley 2004). Dissemination and diversification of maize resulted in a wide range of maize genotypes, which were divided in five main genetic groups (Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006). Most inbred lines within a group display similar agronomic properties (kernel texture, earliness), and often also a similar geographical origin (Dubreuil *et al.* 1996).

The Tropical group is rather large and close to the ancestral gene pool, as it includes the Mexican subgroup as well as the Caribbean and Andean subgroups that arose after early dissemination towards Caribbean islands and South America, respectively (Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006). The Northern Flint group emerged in North America, after spreading of ancestral maize, and is quite different genetically from the other northern American groups (Doebley *et al.* 1986). The Corn Belt Dent group is a North American group

that arose later, when European settlers crossed lines from Northern Flint group and tropical maize. The last northern American group (Stiff Stalk) was shaped by modern breeding during the second half of the twentieth century. The European Flint group resulted from hybridization of Tropical and Northern Flint populations following their importation in Europe and further selection process (Rebourg *et al.* 2003; Dubreuil *et al.* 2006). In the last century, the main change in maize breeding has been the development and use of hybrid cultivars (largely from European Flint and Corn Belt Dent landraces).

Genetic diversity may be quite extensive within a plant species (Mariette *et al.* 2001; Qian *et al.* 2006; Azizi *et al.* 2009). Cultivated varieties may differ in terms of root exudation (Czarnota *et al.* 2003), and since root exudation is a key factor shaping community assembly and structure (Grayston & Campbell 1996; Baudoin *et al.* 2003; Haichar *et al.* 2008), it was not surprising that plant cultivars differ in terms of root colonization by soil bacteria (Germida & Siciliano 2001; Adams & Kloepper 2002; van Overbeek & van Elsas 2008). In the case of maize, bacterial rhizosphere colonization of different genotypes has been assessed for seed inoculants (Garcia de Salomone *et al.* 1996; Riggs *et al.* 2001; El Zemrany *et al.* 2006), particular taxonomic populations e.g. *Paenibacillus* spp. (Araujo da Silva *et al.* 2003), functional groups e.g. culturable phloroglucinol-producing pseudomonads (Picard *et al.* 2004; Picard & Bosco 2006), as well as the entire community (Bruseti *et al.* 2005). The maize genotypes in these studies were chosen for their phenotypic characteristics (e.g. root morphology) or agricultural importance, and cultivar comparisons were typically carried out without knowledge on the history of these plants. The only studies where maize genotypes were explicitly taken in consideration focused on the heterosis effect of hybrids (Picard *et al.* 2004; Picard & Bosco 2005) and transgenic modifications (Bruseti *et al.* 2005).

The hypothesis in this study was that the evolutionary history of maize has shaped patterns of soil bacteria selection by individual maize lines. This means, at the level of the crop diversification process, that differences between rhizobacterial communities would increase with the genetic distance between lines. It also means, considering this time the outcome of the diversification process, that membership of individual lines to a particular genetic group of maize would be a significant factor determining their rhizobacterial community composition. On this basis, the objective of this work was to determine the relation between diversification of maize and the selection of soil bacteria in the rhizosphere. This issue was addressed by comparing ten characterized inbred lines representing the five main groups of maize. The rhizobacterial community of seedlings was assessed using a 16S rRNA taxonomic microarray previously validated for soil and rhizosphere studies (Sanguin *et*

*al.* 2006; Kyselkova *et al.* 2009), and results were analyzed by considering the genetic distance between maize inbred lines.

## **Materials and methods**

### Selection of maize genotypes

Inbred lines were obtained by self-pollination from American and European traditional maize landraces. Two inbred lines for each of the five groups of maize defined by Camus-Kulandaivelu *et al.* (2006) were selected from a collection of 393 inbred lines, as follows. To start with, inbred lines characteristic of a heterotic group and largely used for hybrid development were chosen (including genome-sequenced B73) based on analysis of neutral markers corresponding to simple sequence repeat (SSR) data at 67 non-coding loci (microsatellite analysis). Then, a sample of inbred lines maximizing the diversity from this first sample was selected using software Mstrat (Gouesnard *et al.* 2001). Finally, inbred lines having a high contribution to a group were chosen from this sample. For all groups, this could be achieved with a contribution threshold as high as 0.85 based on analysis with software STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000), which generates clusters based on both transient Hardy-Weinberg disequilibrium and linkage disequilibrium caused by admixture between populations. All seeds were obtained by J. Laborde (INRA, St Martin de Hinx).

### Greenhouse experiment

The ten inbred lines were cultivated in soil taken from the surface horizon of a field located at La Côte Saint-André near Lyon (France), which was cropped with maize for several years. The soil was a luvisol with a loamy surface horizon (clay 16.2%, silt 43.9%, sand 40.1%, organic matter 2.1%, pH(water) 7.0, N 1.4 g kg<sup>-1</sup>) (El Zemrany *et al.* 2006). Soil was sieved (6 mm) and 2.5 kg used to fill 3-dm<sup>3</sup> pots.

Seeds were surface-disinfected by soaking 10 min in 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, followed with one rinse with sterile distilled water, one wash with 70% ethanol, and three rinses with sterile distilled water. For each maize genotype, five pots sown with three seeds (thinned to two seedlings on day 10) were used. Five non-planted pots were also included. They were placed following a randomized block design in a greenhouse with 16 h of light (25°C) and 8 h of darkness (18°C). Water was adjusted to soil retention capacity using an automated irrigation system.

Sampling was carried out at 21 days after sowing. The root systems were dug up and shaken vigorously to separate soil loosely adhering to the roots. Each root system with closely adhering soil was transferred to a bottle containing 300 ml of sterile distilled water. The bottles were shaken manually for 1 min, then 15 min in a stirrer at 180 rpm. The soil fraction (considered as rhizosphere sample) was recovered by centrifugation for 30 min at 4600 g and kept at -20°C. The root systems were picked up and blotted dry.

Plant analysis included determination of seed weight (10 seeds per genotype), shoot height at 15 and 20 days, number of leaves at 10, 15 and 20 days, and fresh biomass of roots and shoots at 21 days ( $n = 5$ ). Two-way ANOVA and Tukey's tests were done to compare the effects of maize genetic groups and of individual maize lines ( $P < 0.05$ ), using R software (<http://www.r-project.org>).

#### Microarray analysis of rhizosphere samples

Total DNA from 0.5 g of rhizosphere or non-planted (control) soil was extracted using FastDNA spin kit for soil (Q-Biogene, Illkirch, France), according to the manufacturer's instructions. The universal primers T7-PA and PH (derived from Bruce *et al.* 1992) were used to obtain 1.5-kb amplicons of the 16S rRNA gene *rrs* from the total community (Edwards *et al.* 1989), as described by Kyselkova *et al.* 2009).

PCR products were purified with a MinElute PCR purification kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions. DNA concentration was determined spectrophotometrically and adjusted to 50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ . For fluorescent labeling, purified PCR products were converted to RNA by in vitro transcription, purified, fragmented, and hybridized as described by Sanguin *et al.* (2008).

The 1033 probes (described in Kyselková *et al.* 2009) were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium) with a 5' C6-NH<sub>2</sub> modification and spotted, as described by Sanguin *et al.* (2008). Each probe was repeated four times per slide. Hybridization was performed in temperature-controlled Belly Dancer (Stovall Life Sciences, Greensboro, NC), as described by Sanguin *et al.* (2008).

#### Analysis of microarray data

The slides were scanned at 532 nm with 10- $\mu\text{m}$  resolution using a GeneTac LS IV scanner (GenomicSolutions, Huntingdon, UK), and images were analyzed with GENEPIX 4.01 (Axon, Union City, CA), as described (Sanguin *et al.* 2008). Spots of poor quality (presence

of dust or hybridization signal saturation) were excluded from further analyses, as described (Sanguin *et al.* 2008). Data filtration was done using R 2.8.0 (<http://www.r-project.org>). Hybridization of a given spot was considered positive when 80% of the spot pixels had intensity higher than the median local background pixel intensity plus twice the standard deviation of the local background, as done previously (Sanguin *et al.* 2008; Kyselková *et al.* 2009). The intensity of the signal (median of signal minus background) was replaced by its square root, and the intensity of each spot was expressed as a fraction of the total intensity signal of the basic pattern it belongs to (Sanguin *et al.* 2006). A given probe was considered to be positive when at least three of the four spot replicates were hybridized.

Microarray data were treated by Principal Component Analysis (PCA), based on the correlation matrix. Between-Group Analysis, which ordines groups and then projects individual samples on the resulting axes (Dolédec & Chessel 1987; Culhane *et al.* 2002), was also performed, followed by Mantel test (Mantel 1967) to examine relations between treatments. These analyses were done using the ADE4 package of R (Thioulouse *et al.* 1997). ANOVA and Fisher's LSD tests (using DSAASTAT 1.0192 for Excel; Onofri, 2006) ( $P < 0.05$ ) were used (i) to compare treatments along each of the first two PCA axes, i.e. based on PC1 coordinates as well as on PC2 coordinates, and (ii) for each probe to compare bulk soil versus rhizosphere (of each maize line, i.e. 10 comparisons). The comparison of the effects of maize groups and of individual lines on total rhizobacterial community composition was also studied with 50-50 MANOVA (Langsrud 2002) at  $P < 0.05$ , using R software. Probes differing in intensity between the five groups (compared two by two) were identified with Mann Whitney tests ( $P < 0.05$ ).

### Quantitative PCR

Relative amounts of *rrs* sequences of *Burkholderia cepacia* complex in maize genotypes was confirmed by quantitative PCR (qPCR), after development of a real-time protocol based on the forward primer QPCR-Bcep16s2-F (Whitby *et al.* 2006) and the *B. cepacia* probe Burcep (Kyselková *et al.* 2009) as reverse primer. PCR reaction was carried out in 20  $\mu$ l containing 4  $\mu$ l of PCR grade water, 2  $\mu$ l of each primer (final concentration 0.75  $\mu$ M), 10  $\mu$ l of LightCycler-DNA Master SYBR Green I master mix (Roche Applied Science, Meylan, France) and 60 pg of sample DNA (in triplicate for each of five plants per line). The cycling program included a 10-min incubation at 95°C, followed by 50 cycles of 95°C for 15 s, 65°C for 15 s and 72°C for 10 s. Amplification specificity was studied by melting curve analysis of

the PCR products performed by ramping the temperature to 95°C for 10 s and back to 65°C for 15 s, followed by incremental increases of 0.1°C s<sup>-1</sup> up to 95°C. Melting curve calculation and determination of T<sub>m</sub> values were performed using the polynomial algorithm function of LightCycler Software v.1 (Roche Applied Science).

Genomic DNA from *Burkholderia cenocepacia* LMG 16656 (which belongs to the *B. cepacia* complex) was used to generate standard curves, after dilution from 5 × 10<sup>-9</sup> to 5 × 10<sup>-15</sup> g DNA µl<sup>-1</sup> (in triplicate). Sterile water was used as negative control. PCR efficiency was calculated from standard curves according to the equation  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ . The five samples for each of the two inbred lines of groups Corn Belt Dent and Northern Flint (chosen because they were the most distant in rhizobacterial community PCA) were analyzed. Results were expressed as ng of DNA from *B. cepacia* complex bacteria per µg of total soil DNA.

For cloning/sequencing, the quantitative PCR products described above were purified with the MinElute PCR purification kit (Qiagen) and re-amplified, using the same primer set. PCR was done in 50 µl containing 1 µl DNA (~ 50 ng), 5 µl 10× reaction buffer, 2.5 µl of each primer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 5 µl dNTP, and 1 µl *Taq* polymerase (Invitrogen). Amplification was done in an Eppendorf Mastercycler with 5 min denaturation at 94°C, 30 cycles of 25 s at 94°C, 25 s at 57°C and 25 s at 72°C, and a final elongation of 5 min at 72°C. After purification, the PCR products were cloned (pGEMs-T Easy Vector System kit; Promega, Charbonnières, France) and 12 clones from each of the four lines studied were sequenced on both strands (CoGenics, Meylan, France). Sequences (EMBL accession numbers FR670611 to FR670618) were checked and edited with BioEdit version 7.0.5.3 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). Sequence affiliation was performed using BlastN with default parameters at NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

#### *Comparison of genetic distance between maize inbred lines with rhizobacterial community molecular data*

The microsatellite sequences obtained by Camus-Kulandivelu *et al.* (2006) were used to compute genetic distances between maize inbred lines, based on a distance derived from Rogers (1972) hereafter termed modified distance of Rogers (MDR<sup>2</sup>). MDR<sup>2</sup> was computed as follows (Rebourg *et al.* 2003):

$$MDR_{XY}^2 = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \sum_{j=1}^{A_i} \frac{1}{2} (P_{ijX} - P_{ijY})^2$$



where  $L$  is the number of loci (here 67),  $A_i$  the number of alleles at the  $i^{\text{th}}$  locus, and  $P_{ijX}$  and  $P_{ijY}$  are the frequencies of the  $j^{\text{th}}$  allele at the  $i^{\text{th}}$  locus for the lines X and Y. The mean inter-group genetic distance between the four lines of two genetic groups (i.e. each line being compared with the two lines from the other group;  $n = 4$  comparisons in total) was used to estimate the genetic distance between these groups.

The Bray-Curtis distance (Bray & Curtis 1957) was used to compare rhizobacterial communities of different lines, using normalised hybridisation intensity data. When comparing maize groups, the mean inter-group Bray-Curtis distance ( $n = 4$ ) between rhizobacterial communities of the four lines of two genetic groups was used. The comparison of the two types of matrices was assessed by Mantest test (1967).

## **Results**

### *Genetic comparison of maize groups*

Inbred lines displaying a high contribution to their genetic group (meaning that their genetic make-up was representative of the group) and maximizing intra-group diversity were obtained. The contribution levels of the two lines to their group were just above the 0.85 threshold in the Tropical group, whereas they were higher than 0.92 in the Corn Belt Dent and Northern Flint groups and even 0.97 in the European Flint and Stiff Stalk groups (Table 1).

The genetic distance between the two inbred lines of a same group differed extensively according to the genetic group considered. The two closest inbred lines were those selected for the Stiff Stalk group ( $MDR_{XY}^2 = 0.35$ ), which results from recent breeding and has a narrow genetic base. A short distance ( $MDR_{XY}^2 = 0.36$ ) was also found with Northern Flint group. In contrast, the distance for the Tropical group was almost twice as high ( $MDR_{XY}^2 = 0.60$ ) and somewhat higher for the European Flint ( $MDR_{XY}^2 = 0.67$ ) and Corn Belt Dent ( $MDR_{XY}^2 = 0.71$ ) groups.

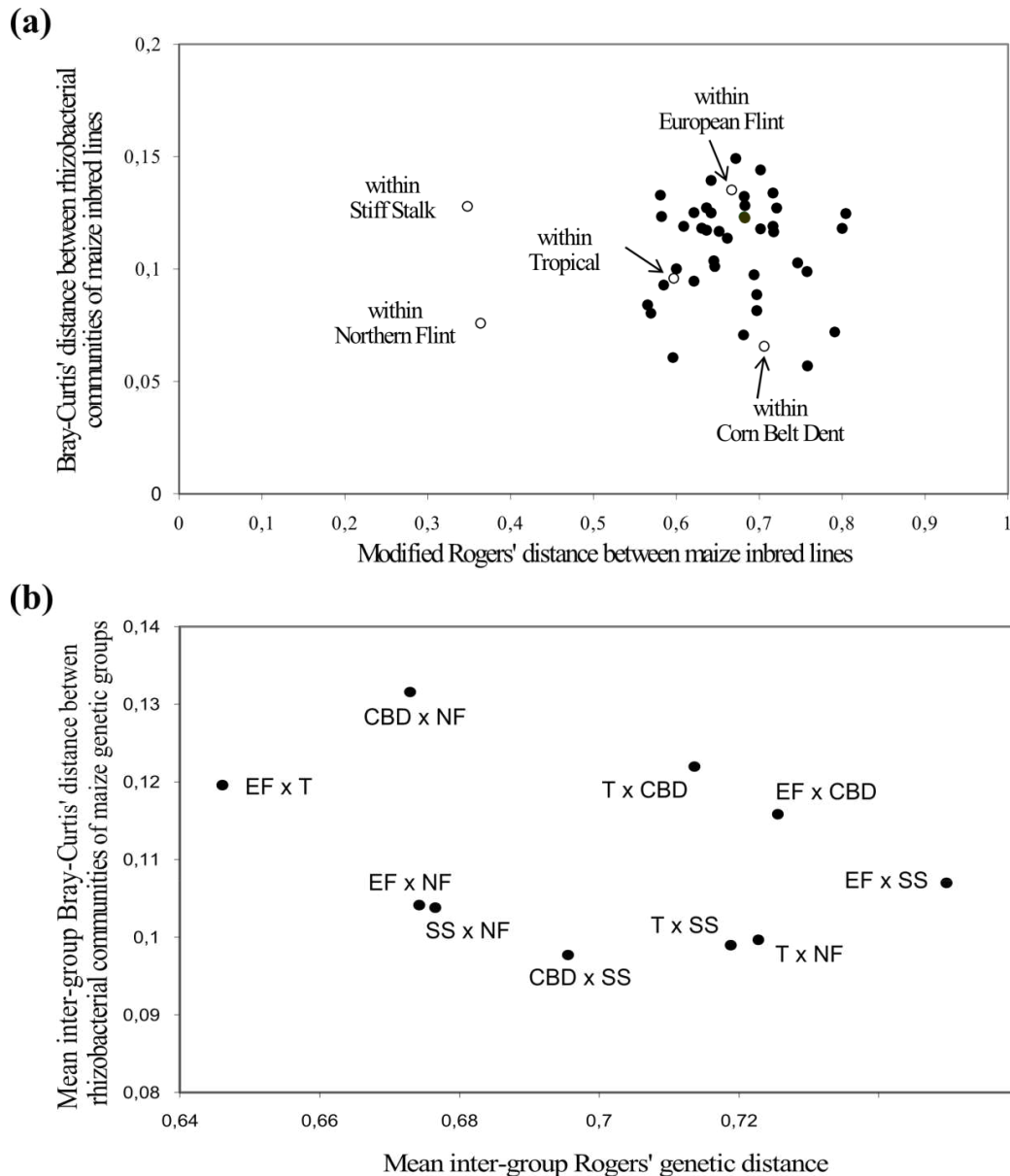
When all lines from the five maize groups were considered together, it appeared that the intra-group genetic distances between the two lines within groups Stiff Stalk and Northern Flint (but not within the three other groups Tropical, Corn Belt Dent and European Flint) were smaller than the inter-group distances, i.e. distances between lines from different groups (summarized in Fig. 1a and detailed in Fig. S1), which is fully compatible with the findings above. This is in accordance with PCA comparisons (based on 33% of data variability; Fig. S2). The mean genetic distance between lines of distinct groups ranged from about 0.65 (between European Flint and Tropical) to 0.75 (between European Flint and Stiff Stalk) (Fig. 1b).

**Table 1** Phenotypic properties, geographic origin and genetic contribution to the genetic groups of the ten inbred lines of maize.

Inbred line <sup>a</sup>	Line properties			Genetic contribution to the five genetic groups <sup>b</sup>				
	Grain texture	Flowering earliness	Geographic origin	Tropical	Corn Belt Dent	Stiff Stalk	Northern Flint	European Flint
ZN6_inra	Flint	Late	South America	0.852	0.012	0.004	0.045	0.087
EM1433_inra	Dent	Late	South of Spain	0.901	0.025	0.050	0.01	0.014
Mo17_usa	Dent	Semi-late	Corn Belt US	0.010	0.924	0.022	0.013	0.032
FV252_inra	Dent	Early	France	0.007	0.973	0.008	0.007	0.005
B73_inra	Dent	Late	Corn Belt US	0.006	0.006	0.978	0.004	0.005
B14a_usa	Dent	Late	Corn Belt US	0.002	0.003	0.991	0.002	0.002
W85_inra	Flint	Early	Canada	0.007	0.010	0.014	0.950	0.019
FV4_inra	Flint	Early	France	0.005	0.008	0.004	0.969	0.014
FV2_inra	Flint	Early	South of France	0.005	0.004	0.010	0.009	0.971
EP1_usa	Flint	Early	North of Spain	0.006	0.007	0.002	0.006	0.979

<sup>a</sup> Each line name is followed by a term indicating collection origin (inra or usa).

<sup>b</sup> Values correspond to allelic frequency of membership to a group (i.e. proportion of alleles corresponding to the group). The genetic group to which each inbred line belongs is indicated in grey.



**Fig. 1** Relationship between maize genetic distances and rhizobacterial community composition. **(a)** Comparison of plant genetic distance between maize inbred lines (X axis) and similarity distance between total rhizobacterial communities associated to different maize inbred lines (Y axis). Distances were calculated for all 10 inbred lines taken two by two, using modified Rogers' distance for maize genotypes and Bray-Curtis's distance for rhizobacterial communities. Full circles represent intergroup comparisons and empty circles intragroup comparisons. The correlation between both distances was not significant ( $r = 0.04$ ,  $P = 0.78$ ,  $n = 45$ ). **(b)** Comparison of mean genetic distance between maize genetic groups (X axis) and similarity distance between total rhizobacterial communities (Y axis). The inter-group genetic distances were the means ( $n = 4$ ) of modified Rogers' distances between the four lines of two genetic groups, and the mean Bray-Curtis distance was used for rhizobacterial communities. NF = Northern Flint group; EF = European Flint group; CBD = Corn Belt Dent group; T = Tropical group; SS = Stiff Stalk group. The correlation between both distances was not significant ( $r = 0.31$ ,  $P = 0.38$ ,  $n = 10$ ).

16S Microarray analysis of the rhizosphere effect of seedlings

Among the 1033 probes, 162 hybridized with at least one bulk soil sample, versus 165 (line EP1) to 187 (line Mo17) with at least one rhizosphere sample (giving 249 hybridized probes in at least one sample from any line), and 151 probes hybridized with both one bulk soil sample (or more) and one rhizosphere sample (or more). Between-Group Analysis separated rhizosphere soil from bulk soil (not shown), which was confirmed by Mantel test. With PCA, the separation between rhizosphere and bulk soil was along the first axis (41% of the total variability; Fig. S3).

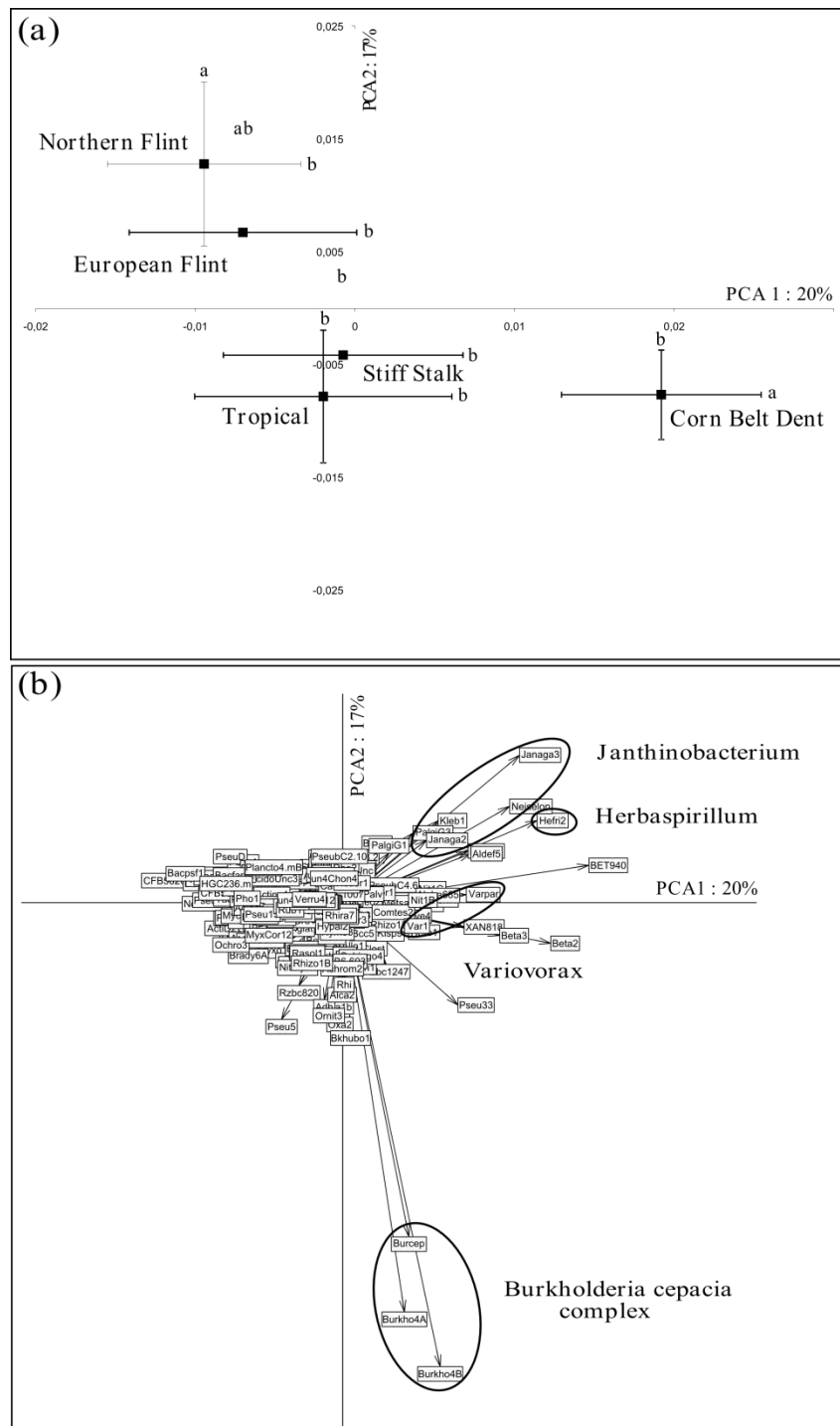
Among the 260 probes that hybridized with at least one bulk soil or rhizosphere sample, hybridization intensity with bulk soil was statistically lower for 24 probes and higher for 53 probes when compared with each of the ten lines. The probes giving higher signals in these rhizosphere samples were especially those targeting the *Betaproteobacteria* genera *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Achromobacter*, *Neisseria* and *Variovorax*, as well as the *Gammaproteobacteria* genus *Pseudomonas*, whereas those giving lower signals included noticeably probes for the order *Clostridiales* and genus *Bacillus* (both within *Firmicutes*), the *Bacteroidetes* order *Flavobacteriales*, the *Alphaproteobacteria* orders *Rhizobiales* and *Rhodospirillales*, the *Deltaproteobacteria* order *Myxococcales*, the *Acidobacteria*, the *Planctomycetes*, and the *Actinobacteria* (Fig. S3).

Effect of maize groups on rhizobacterial community

When the 10 inbred lines were compared with one another, 249 of the 1033 probes hybridized with at least one rhizosphere sample from one line. PCA and subsequent ANOVA/Fisher analyses of PCA coordinates for microarray results from rhizosphere samples separated (i) Corn Belt Dent, (ii) Stiff Stalk and Tropical, and (iii) Northern Flint from one another, whereas European Flint was intermediate (Fig. 2a). When microarray results were analyzed directly (50-50 MANOVA), treatments differed again according to maize genetic groups, and the inbred lines within groups had also a significant effect. We repeated in a different soil the same experiment, with the lines from groups Northern Flint and Corn Belt Dent, and found again group differences in rhizobacterial community composition at 21 days (data not shown).

Hybridization results differed statistically (Mann Whitney tests) between maize groups for 86 probes. Discriminating probes with higher signals for the Corn Belt Dent group (with similar signals for both inbred lines) were especially those targeting *Betaproteobacteria* such as *Herbaspirillum*, *Janthinobacterium* and *Variovorax*, and especially the *Burkholderia*

*cepacia* species complex (Fig. 2b). For the four genetic groups at the left side of the first PCA axis, the main observation was that probes for *Alphaproteobacteria* genera *Azospirillum* and *Sphingomonas* showed higher intensity with the Northern Flint group, and those for the *Deltaproteobacteria* genus *Myxococcus* and *Betaproteobacteria* genera *Oxalobacter* and *Methylophilus* with the Tropical and Stiff Stalk groups (Fig. 2b). Within each of these four maize groups, signal intensity for some of these probes varied significantly between the two lines.



**Fig. 2** Principal component analysis of 16S microarray results for rhizosphere samples from the five genetic groups of maize. **(a)** Maize groups were compared using data from two inbred lines per group, each studied in five replicates. For each group, mean and standard deviation computed using all data are represented ( $n = 10$ ). Statistical relations between genetic groups are indicated along PC1 and PC2 axes by letters a and b (ANOVA and Fisher's LSD tests;  $P < 0.05$ ). **(b)** Contribution of microarray probes to the principal components. The bacterial taxa targeted are indicated for the probes contributing most to group separations.

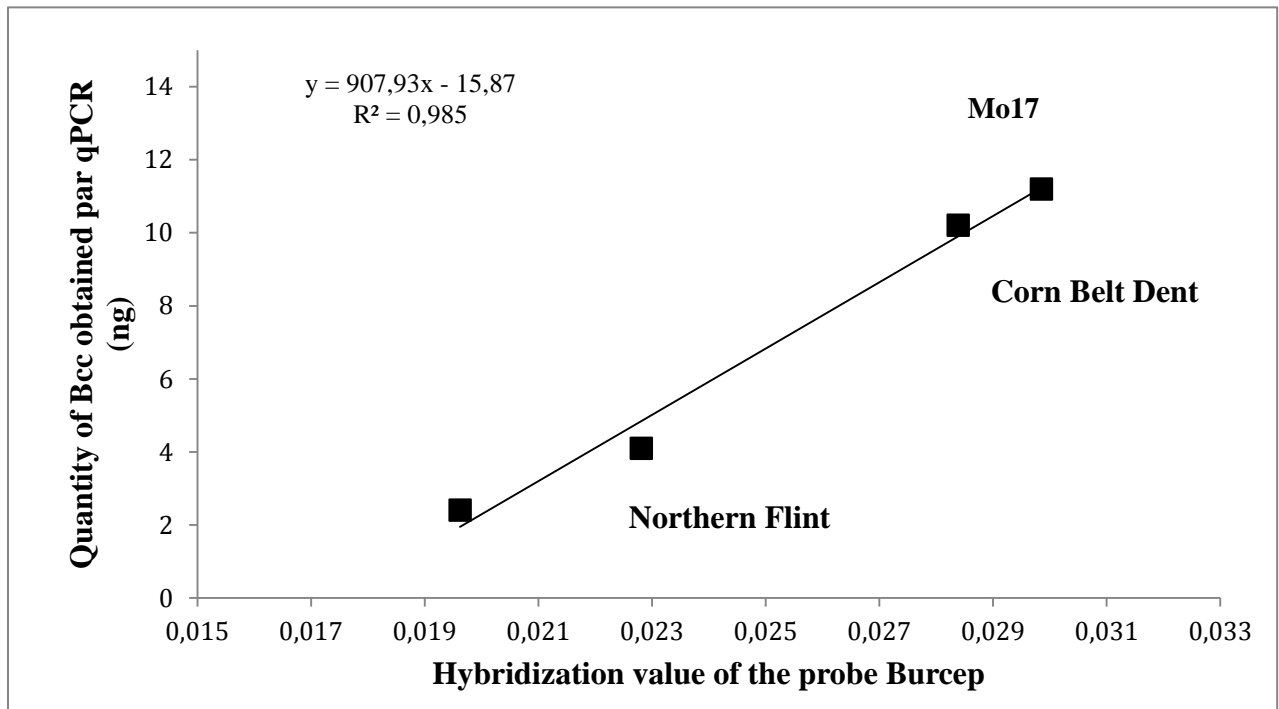
*Validation of selected microarray results by qPCR and sequencing*

Validation of the main microarray results was sought after development of a real-time qPCR protocol for the species complex *B. cepacia*. qPCR displayed an efficiency of 100% and a low error level (3%). All 48 sequences obtained from qPCR products corresponded to the *B. cepacia* complex (Fig. S4), confirming primer specificity. They formed three groups, which clustered in the vicinity of species *B. cepacia*, *B. seminalis*, *B. ambifaria*, *B. metallica*, *B. diffusa* and *B. arboris* from the *B. cepacia* complex (Fig. S4). With the four inbred lines studied, a  $R^2$  value of 0.99 ( $P < 0.05$ ) was found when comparing quantitative PCR and microarray hybridization data (Fig. 3), thereby validating the latter (and quantitative PCR data were statistically higher for Corn Belt Dent than Northern Flint based on ANOVA at  $P < 0.05$ ).

*Relation between maize diversity and rhizobacterial diversity based on distance analyses*

No relationship was found overall when comparing the genetic distance between maize inbred lines (based on microsatellite plant neutral markers from Camus-Kulandaivelu *et al.* (2006)) with that between rhizobacterial communities (Fig. 1a and S1). Furthermore, the genetic distance between bacterial communities was not lower within maize genetic groups than in comparisons across different maize genetic groups, i.e. bacterial communities selected by maize lines of a same genetic group were often more distant than those selected by maize lines from different groups. This was even the case when considering the two homogenous groups Stiff Stalk and Northern Flint. No significant correlation (at  $P < 0.05$ ) was found either when comparing maize genetic groups, i.e. when replacing the genetic distance between maize inbred lines by the mean inter-group genetic distance (Fig. 1b).





**Fig. 3** Comparison of microarray hybridization level (expressed as relative fluorescence intensity for 400 ng of total rhizosphere DNA) and qPCR data (expressed as ng of DNA per 400 ng of total rhizosphere DNA) for bacteria of the *Burkholderia cepacia* complex in samples from the Corn Belt and Northern Flint groups. Each point is the mean for the two lines studied (each investigated with five plant replicates). The equation of the linear regression between the two datasets is shown.

## **Discussion**

Once domesticated, cultivated plants have undergone diversification according to anthropic dissemination of seeds, local pedoclimatic and farming conditions, and selection by farmers or breeders (Doebley 2004; Purugganan & Fuller 2009). One consequence is that genotypes selected in particular locations may be readily disseminated to other regions of the world, leading to more cosmopolitan distributions and influencing diversification further. In the case of crops like maize, this has several important implications. First, lines emblematic of a given genetic group may be found in other regions, where lines from other group(s) are prevalent. Here for instance, lines FV252 (Corn Belt Dent group) originated from France, EM1433 (Tropical group) from Spain, and FV4 (Northern Flint) from France (Table 1).

Second, man-driven dissemination of seeds favors hybridization/recombination events, which may blur neutral genetic differences between genetic groups. Here, the Northern Flint and Stiff Stalk groups appeared well differentiated compared with the other groups, in accordance with Camus-Kulandeivelu *et al.* (2006). The three other groups were larger, as found by Vigouroux *et al.* (2008), to the point that certain genetic distances across groups were not longer than distances within genetic groups (Fig. 1a). The European Flint group includes germplasm from several European regions/countries, so its genetic base is quite broad, and the two inbred lines FV2 and EP1 belong to distant clusters within the group (Dubreuil *et al.* 1996). The Corn Belt Dent is also quite diverse (Labate *et al.* 2003); its representatives Mo17 and Fv252 differed in flowering earliness (Table 1) and belonged to distinct RFLP subgroups (Dubreuil *et al.* 1996).

Third, a wide range of maize genotypes, originating from all parts of America, have been imported in the last hundred years to Europe (Rebourg *et al.* 2003; Dubreuil *et al.* 2006), where the European Flint group formed (mainly from Tropical and Northern Flint populations). This process has continued in more recent times, but in a context of hybrid development. Therefore, soil microorganisms in Europe may be exposed to a rather large range of maize genotypes, and thus it was ecologically relevant to compare lines from all maize genetic groups in a same European soil. Indeed differences in rhizobacterial community composition of seedlings were found between these maize lines as well as between the genetic groups they belong to.

The current 16S microarray data revealed a clear rhizosphere effect of maize seedlings on soil bacterial community composition (Fig. S3). Despite the selection pressure exerted by

roots on soil bacteria (Berg & Smalla 2009; Raaijmakers *et al.* 2009), the number of probes hybridized was not lower in the rhizosphere, probably because the proportion of taxa numerically minor (and eluding microarray detection) is higher in bulk soil (Gomes *et al.* 2001). Although selection of *B. cepacia* complex (Balandreau *et al.* 2001; Salles *et al.* 2006) and counter-selection of *Myxococcales* (Haichar *et al.* 2008) by roots confirmed previous findings, the lower prevalence of the *Alphaproteobacteria* orders *Rhizobiales* and *Rhodospirales* on roots was not expected. Indeed, many *Rhizobiaceae* genera/species were found to be in higher proportion in the maize rhizosphere than in bulk soil in previous studies (Gomes *et al.* 2001; Sanguin *et al.* 2006; Haichar *et al.* 2008), but experiments were done with different soil type and/or maize phenology (Baudoin *et al.* 2009). Additionally, this study showed the possibility (Jung *et al.* 2007) that the typically endophytic bacterium *Herbaspirillum* (Olivares *et al.* 1996) could establish in the rhizosphere. More importantly, here the rhizosphere effect of maize seedlings was documented at the scale of the genetic diversity of this plant species, unlike in previous work focusing on a single or a few closely-related genotypes only (Gomes *et al.* 2001; Sanguin *et al.* 2006). In this context, the mean Bray-Curtis similarity distance between bulk soil and rhizobacterial communities varied between 0.35 (European Flint) and 0.41 (Corn Belt Dent), whereas that between rhizobacterial communities of different maize groups varied between 0.07 and 0.14. This means that most of the rhizosphere effect was common to the five genetic groups, despite the extent of maize diversification events (Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006). It also means that maize monoculture (20 years) was unlikely to have significantly enriched bacterial taxa more specific of certain maize genetic groups.

Even though of lesser extent, differences were also found when comparing rhizobacterial community composition between the five genetic groups of maize. There were mostly variations in signal intensities rather than in the range of hybridized probes, suggesting differences in taxa abundance, as confirmed by qPCR for the *B. cepacia* complex. These bacteria, which have a wide ecological role in soil (Parke & Gurian-Sherman 2001), display high species diversity in the soil of the study (Viallard *et al.* 1998; Balandreau *et al.* 2001). Some of the clones from the *B. cepacia* complex recovered in the current study clustered with established species, whereas three others (cluster W85 3/7/12) did not and may represent a novel species (Fig. S4). Root isolates of *B. cepacia* differed between three maize cultivars (Dalmastri *et al.* 1999), but these cultivars were not characterized genetically. Here, the *B. cepacia* complex contributed along with other *Betaproteobacteria* to the particularity of Corn Belt Dent group. In this regard, it could be unexpected to find such a distinction in

rhizobacterial community composition between Corn Belt Dent and the two other northern American groups, since all three formed in the same region of the world. Furthermore, a distinction between the Tropical group and the four temperate groups was not found, even when considering PCA axis 3 (not shown), despite soil type and climatic differences in both parts of the world.

The Tropical group is the closer to the ancestral maize genetic pool, which means that part of its genetic make-up is also found in the four other groups (Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006), and this might account for its (unexpected) rather central position when comparing rhizobacterial communities (Fig. 2). The position of the European Flint group between Tropical and Northern Flint groups in rhizobacterial community comparisons is consistent with the fact that it formed by hybridization of these two groups (Rebourg *et al.* 2003; Dubreuil *et al.* 2006). Similarly, the position of the Stiff Stalk rhizobacterial community between those of the two other American groups Corn Belt Dent and Northern Flint is in accordance with the formation of Stiff Stalk group by modern breeding in the USA. Thus, on one hand, the formation of the five *Z. mays* genetic groups, which is an outcome of the crop diversification process, was a significant factor determining soil bacteria selection by seedlings and, in turn, rhizobacterial community composition. This is in accordance with the facts that (i) SSR microsatellite makers are relevant to delineate genetic structures within Poaceae species (Figliuolo & Perrinao 2004) including maize (Dubreuil *et al.* 2006), and (ii) key plant traits such as flowering time fluctuate according to maize population structure (Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006). Indeed, lines from groups Corn Belt Dent and Stiff Stalk displayed higher root biomass (Table S1), which may mean higher amounts of rhizodeposits (Benizri *et al.* 2002; Wichern *et al.* 2008) for root-colonizing bacteria. Qualitative differences in rhizodeposit composition (Czarnota *et al.* 2003) and other rhizosphere properties (Miyasaka *et al.* 1989) may also be expected and could explain differences in rhizobacterial community composition between groups (Haichar *et al.* 2008; Bressan *et al.* 2009).

On the other hand, the crop diversification process itself was not a significant factor determining rhizobacterial community composition, since the differences between rhizobacterial communities did not relate to the genetic distances (derived from microsatellite plant neutral markers i.e. non-coding SSR data) between maize groups or lines. Perhaps post-domestication diversification process was too short (estimated as only 9000 years for maize; Doebley 2004) for such an effect to materialize. Indeed, our results suggest that this genetic distance was not representative of the phenotypic differences important for selection of bacteria by seedling roots when considering recent (i.e. post-domestication) diversification of

maize. Accordingly, no significant correlation was found when comparing pairwise differences in shoot and/or root biomass with genetic distances between maize lines (or with Bray-Curtis similarity distances between associated rhizobacterial communities) (not shown). A significant correlation was found between SSR-based genetic distance and maize morphological and yield markers by Heckenberger *et al.* (2005), but traits were assessed for mature plants and not seedlings. Therefore, it could also be that our lack of correlations was due to our focus on seedlings, as both (i) the relationship between plant genetic distance and plant phenotypic properties (Coque *et al.* 2006) and (ii) rhizobacterial community genetic structure (Baudoin *et al.* 2009) depend on maize phenology.

In conclusion, the genetic structure of maize resulting from crop diversification (giving five main groups) but not the extent of diversification in itself (determining maize genetic distances) influenced selection of soil bacteria by maize seedlings.

### **Acknowledgement**

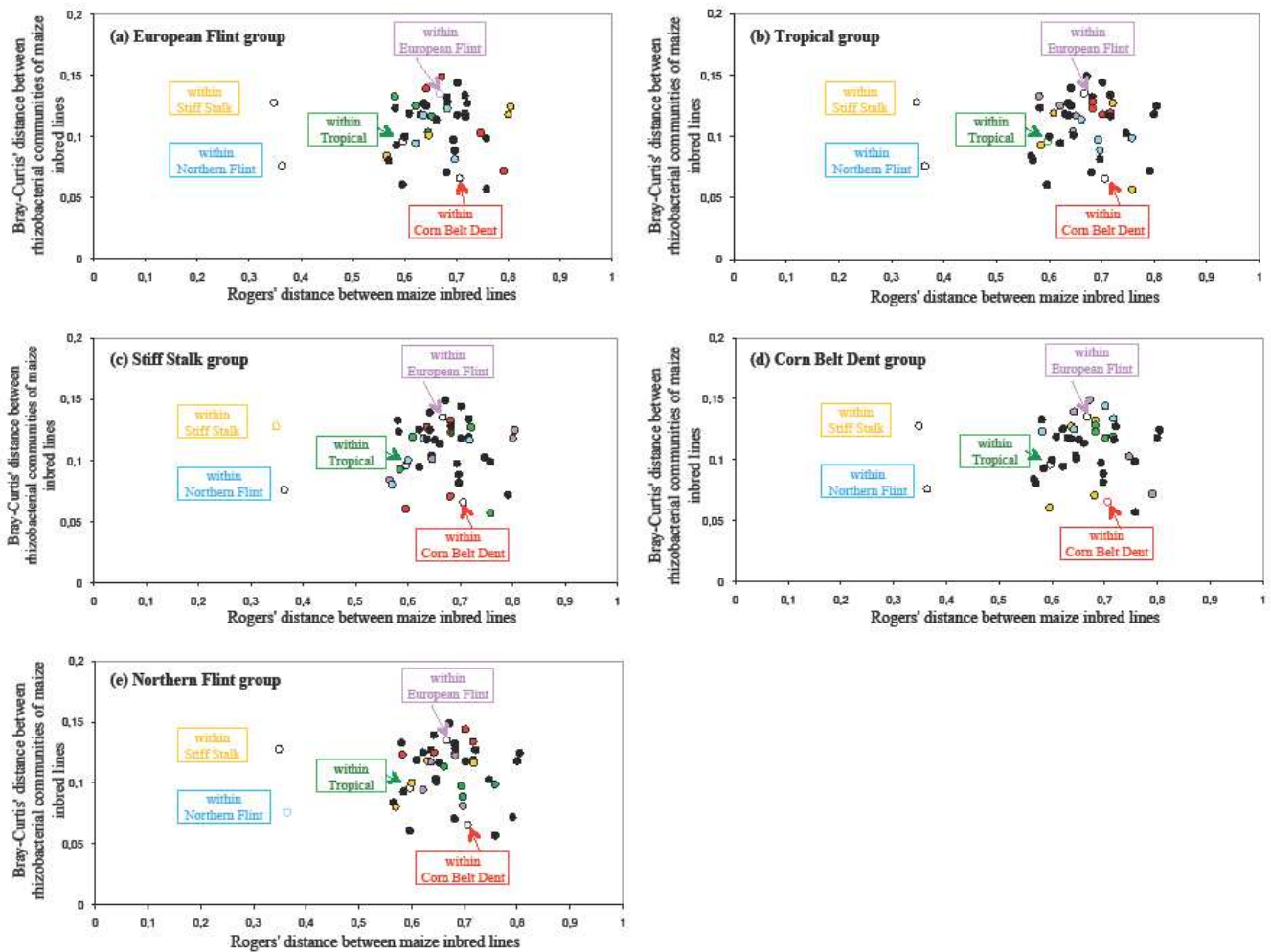
We are grateful to J. Laborde (INRA, Station Expérimentale du Maïs, St Martin de Hinx, France) for hybrid development and supply of seed, J.P. Magnière (Ferme expérimentale, La Côte Saint André, France) for choice of soil, and A. Charcosset (UMR de Génétique Végétale, INRA-UPS-CNRS-INA PG, Gif-sur-Yvette, France) for advice and help. This work was supported by the Ministère Français de la Recherche and the FW6 STREP project MicroMaize (European Union). We are grateful to M.-A. Poirier and J. Haurat (UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne), C. Gauthier (PRABI), A-B. Dufour (UMR CNRS 5558 LBBE), J. Bernillon (DTAMB) and C. Oger (DTAMB/PRABI) at Université Lyon 1 for technical help and/or advice on statistics, and B. Cournoyer (UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne) for gift of strains. This work made use of the DTAMB, Serre and PRABI technical platforms at IFR 41 in Université Lyon 1.

### **Data Accessibility :**

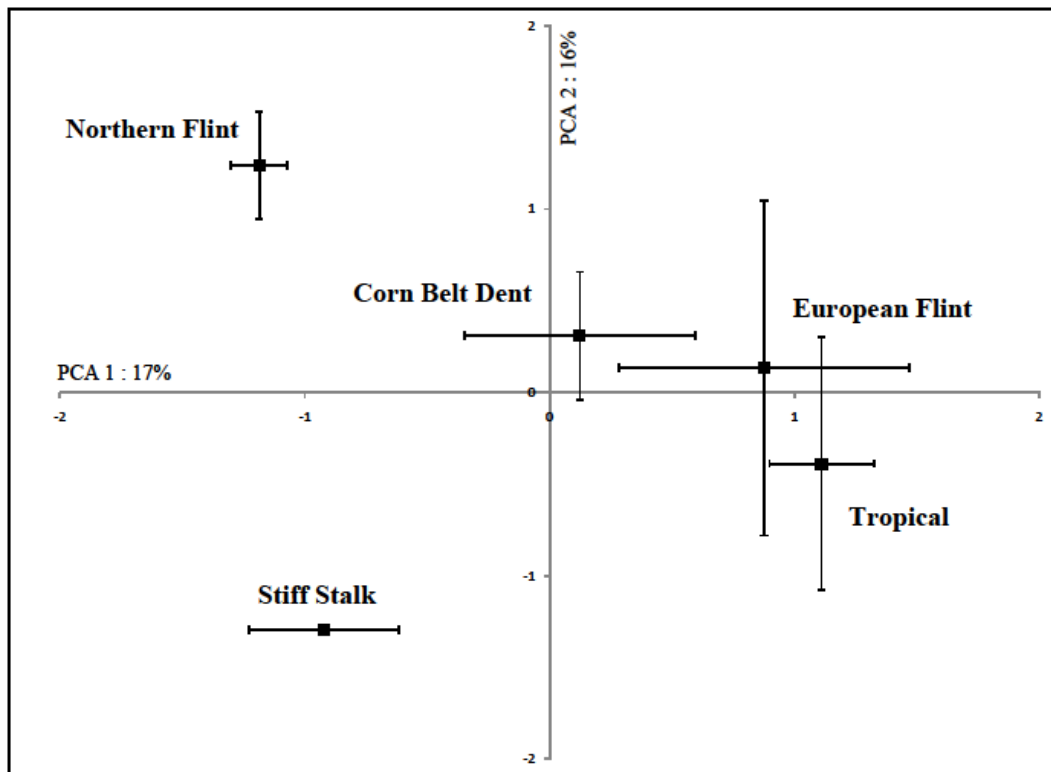
DNA sequences : EMBL accession numbers FR670611 - FR670618

Microarray and qPCR data : Dryad repository doi:10.5061/dryad.51dd2gd0

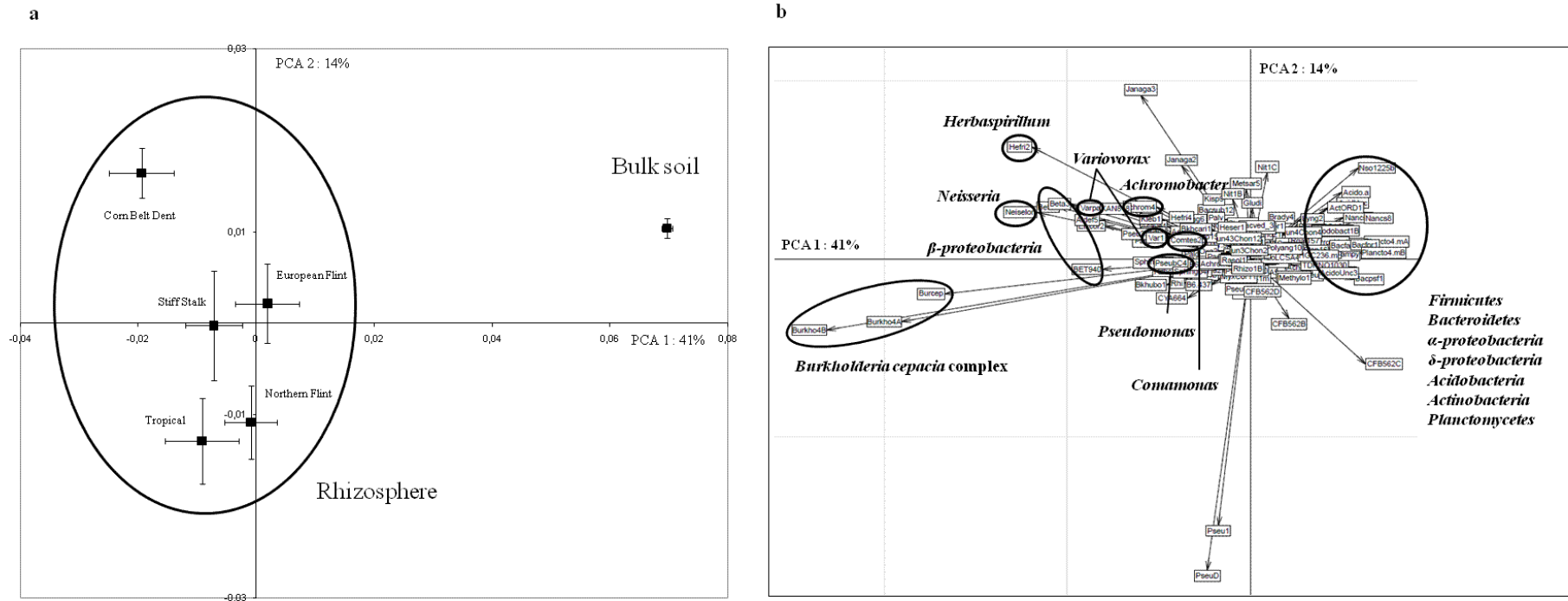
## Supporting Information



**Figure S1** Detailed comparison of plant genetic distance between maize inbred lines (X axis) and similarity distance between total rhizobacterial communities associated to different maize inbred lines (Y axis). Distances were calculated for all 10 inbred lines taken two by two, using modified Rogers' distance for maize genotypes and Bray-Curtis's distance for rhizobacterial communities. Blue is used for Northern Flint group, green for Tropical group, orange for Stiff Stalk group, red for Corn Belt Dent group, and violet for European Flint group. Full circles represent intergroup comparisons and empty circles intragroup comparisons. Comparisons involve the two lines of the group European Flint (**a**), the two lines of the group Tropical (**b**), the two lines of the group Stiff Stalk (**c**), the two lines of the group Corn Belt Dent (**d**), or the two lines of the group Northern Flint (**e**). In each panel, relevant comparisons (i.e. involving the group in focus) are shown with colored full/empty symbols, and the others (i.e. not involving the group in focus) with black full/empty symbols.



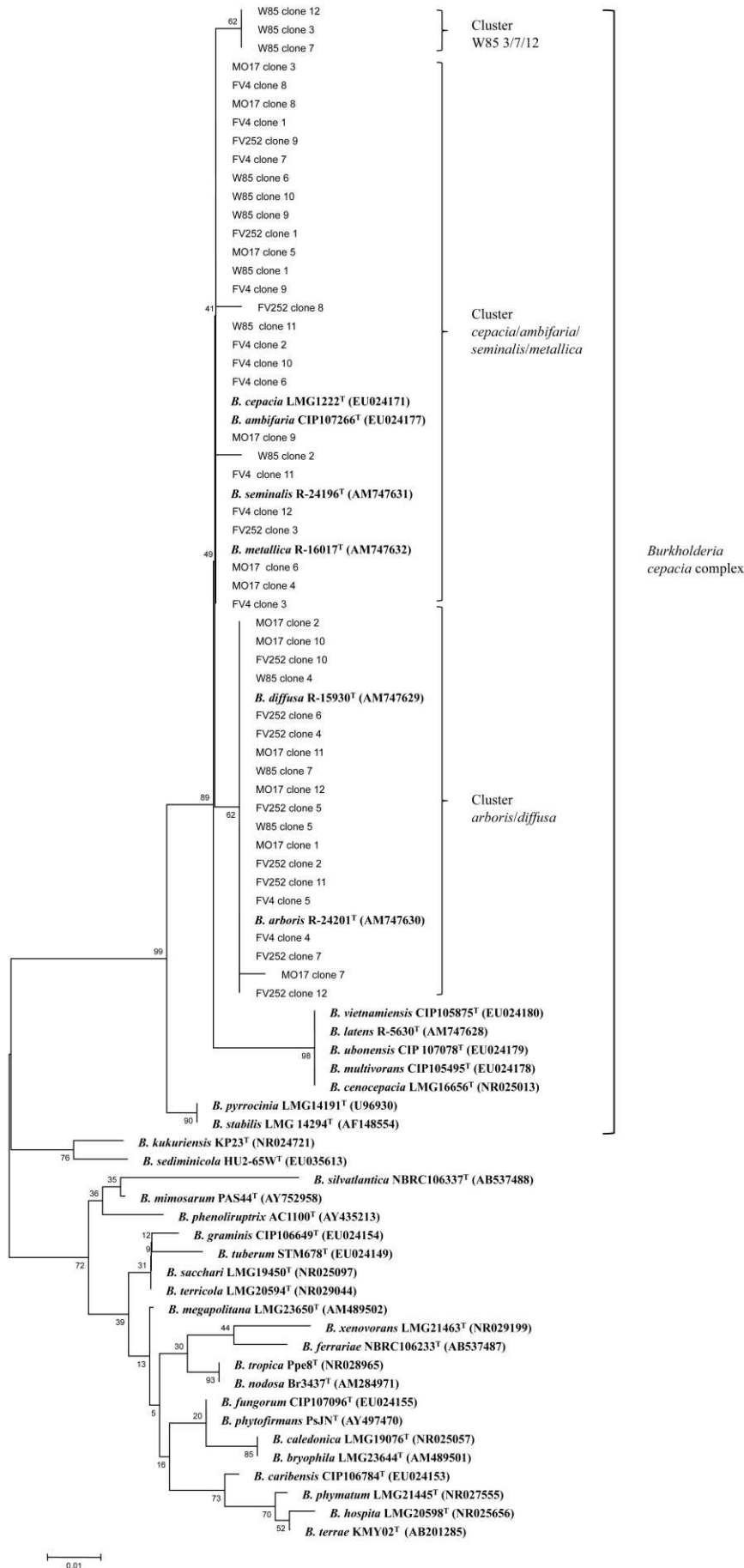
**Figure S2** Principal component analysis of the five maize groups based on allelic data at 67 loci for each of two inbred lines per group. For each group, mean and standard deviation computed are represented ( $n = 2$ ).



**Figure S3** Principal component analysis of 16S microarray results for bulk soil and rhizosphere samples from the five genetic groups of maize. **(a)** Bulk soil and each of the two inbred lines per group were studied in five replicates. Means and standard deviations are shown for bulk soil (n = 5) and each maize group (n = 10). **(b)** Distribution of microarray probes. The taxa targeted are indicated in grey for the main probes contributing significantly to the rhizosphere effect, and by a circle for the bulk soil.



Partie exp. 1 : Influence de l'histoire évolutive du maïs sur les bactéries rhizosphériques



**Figure S4** Phylogenetic relationship between partial 16S rRNA sequences (214 bp) from (i) rhizosphere clones from maize lines FV252 and Mo17 (Corn Belt Dent group), W85 and FV4 (Northern Flint), (ii) type strains of representative species from the *B. cepacia* complex, and (iii) type strains of representative species from other *Burkholderia* species. The phylogenetic tree was constructed using the Kimura-two parameter for distance correction and the neighbour-joining method (bootstrap values from 1000 resamplings), using MEGA 4.0 software (Tamura *et al.*, 2007). One cluster did not contain any sequence of established *Burkholderia* species and is noted cluster W85 3/7/12. The tree shows that the 48 clones were found in four different clusters, which were all within the *B. cepacia* complex. Sequence identities of clones were 98.0% or higher with a species from the complex.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599.

**Table S1** Effect of maize genetic group on seed weight or fresh biomass at 21 days. Seed weight varied according to the genetic group considered (lower in the European group than in the Stiff Stalk, Corn Belt Dent or Tropical groups), as well as the inbred line within groups (except within the Northern Flint group). At 21 days, fresh shoot biomass did not vary significantly according to the genetic group or the inbred line considered, whereas fresh root biomass differed between maize groups (higher in groups Stiff Stalk and Corn Belt Dent) as well as when comparing individual inbred lines.

Genetic group	Seed weight <sup>a</sup>	Number of leaves <sup>a</sup>	Fresh shoot biomass <sup>b</sup>	Fresh root biomass <sup>b</sup>	Total fresh biomass <sup>b</sup>
Tropical	0.28 ± 0.01 a *	3.75 ± 0.10	0.79 ± 0.08	1.53 ± 0.15 bc	2.33 ± 0.22
Corn Belt Dent	0.30 ± 0.02 a *	3.65 ± 0.11	1.06 ± 0.13	2.03 ± 0.16 a	3.08 ± 0.27
Stiff Stalk	0.28 ± 0.01 a *	3.80 ± 0.16	1.00 ± 0.09	2.16 ± 0.21 a	3.16 ± 0.28
Northern Flint	0.22 ± 0.01 b	3.90 ± 0.12	1.06 ± 0.16	1.59 ± 0.20 b	2.64 ± 0.34
European Flint	0.23 ± 0.01 b *	3.75 ± 0.10	1.11 ± 0.11	1.19 ± 0.06 c	2.30 ± 0.16

<sup>a</sup> Statistical differences between treatments are indicated by letters (Fisher LSD test,  $P < 0.05$ ), on 20 replicates.

<sup>b</sup> Statistical differences between treatments are indicated by letters (Fisher LSD test,  $P < 0.05$ ), on 10 replicates.

\* Statistical difference between the two lines within the genetic group.

## **References**

- Adams PD, Kloepper JW (2002) Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant and Soil*, **240**, 181-189.
- Alabouvette C, Olivain C, Steinberg C (2006) Biological control of plant diseases: the european situation. *European Journal of Plant Pathology*, **114**, 329-341.
- Araújo da Silva KR, Salles JF, Seldin L, van Elsas JD (2003) Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods*, **54**, 213-231.
- Aroca R, Ruiz-Lozano J (2009) Induction of plant tolerance to semi-arid environments by beneficial soil microorganisms – A review. In: *Climate change, intercropping, pest control and beneficial microorganisms*, pp.121-135. Springer Dordrecht, Netherlands.
- Azizi A, Wagner C, Honermeier B, Friedt W (2009) Intraspecific diversity and relationship between subspecies of *Origanum vulgare* revealed by comparative AFLP and SAMPL marker analysis. *Plant Systematics and Evolution*, **281**, 151-160.
- Balandreau J, Viallard V, Cournoyer B *et al.* (2001) *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 982-985.
- Baudoin E, Nazaret S, Mougel C, Ranjard L, Moëgne-Loccoz Y (2009) Impact of inoculation with the phytostimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize. *Soil Biology and Biochemistry*, **41**, 409–413.
- Baudoin E, Benizri E, Guckert A (2003) Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**, 1183-1192.
- Benizri E, Dedourge O, Dibattista-Leboeuf C *et al.* (2002) Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure. *Applied Soil Ecology*, **21**, 261-265.
- Berg G, Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, **68**, 1-13.
- Bray JR, Curtis JT (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, **27**, 325-349.

- Bressan M, Roncato M, Bellvert F *et al.* (2009) Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. *ISME Journal*, **3**, 1243-1257.
- Bruce KD, Hiorns WD, Hobman JL *et al.* (1992) Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 3413-3416.
- Brusetti L, Francia P, Bertolini C *et al.* (2005) Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. *Plant and Soil*, **266**, 11-21.
- Camus-Kulandaivelu L, Veyrieras J, Madur D *et al.* (2006) Maize adaptation to temperate climate: relationship between population structure and polymorphism in the Dwarf8 gene. *Genetics*, **172**, 2449-2463.
- Coque M, Bertin P, Hirel B, Gallais A (2006) Genetic variation and QTLs for <sup>15</sup>N natural abundance in a set of maize recombinant inbred lines. *Field Crops Research*, **97**, 310-321.
- Culhane AC, Perrière G, Considine EC, Cotter TG, Higgins DG (2002) Between-group analysis of microarray data. *Bioinformatics*, **18**, 1600 -1608.
- Czarnota MA, Rimando AM, Weston LA (2003) Evaluation of root exudates of seven sorghum accessions. *Journal of Chemical Ecology*, **29**, 2073-2083.
- Dalmastri C, Chiarini L, Cantale C, Bevivino A, Tabacchioni S (1999) Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. *Microbial Ecology*, **38**, 273-284.
- Den Herder G, Van Isterdael G, Beeckman T, De Smet I (2010) The roots of a new green revolution. *Trends in Plant Science*, **15**, 600-607.
- Doebley J (2004) The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics*, **38**, 37-59.
- Doebley JF, Goodman MM, Stuber CW (1986) Exceptional genetic divergence of Northern Flint corn. *American Journal of Botany*, **73**, 64-69.
- Dolédec S, Chessel D (1987) Rythmes saisonniers et composantes stationnelles en milieu aquatique. I: Description d'un plan d'observation complet par projection de variables. *Acta Oecol (Oecol Gen)*, **8**, 403-426.
- Dubreuil P, Dufour P, Krejci E *et al.* (1996) Organization of RFLP diversity among inbred lines of maize representing the most significant heterotic groups. *Crop Science*, **36**, 790-799.
- Dubreuil P, Warburton M, Chastanet M, Hoisington D, Charcosset A (2006) More on the

- introduction of temperate maize into Europe: large-scale bulk SSR genotyping and new historical elements. *Maydica*, **51**, 281-291.
- Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, **17**, 7843-7853.
- El Zemrany H, Cortet J, Peter Lutz M *et al.* (2006) Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**, 1712-1726.
- Escobar MA, Dandekar AM (2003) *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, **8**, 380-386.
- Figliuolo G, Perrino P (2004) Genetic diversity and intra-specific phylogeny of *Triticum turgidum* L. subsp. *dicoccon* (Schrank) Thell. revealed by RFLPs and SSRs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **51**, 519-527.
- García de Salomone I, Döbereiner J (1996) Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biology and Fertility of Soils*, **21**, 193-196.
- Germida J, Siciliano S (2001) Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. *Biology and Fertility of Soils*, **33**, 410-415.
- Gomes NCM, Heuer H, Schönfeld J *et al.* (2001) Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*, **232**, 167-180.
- Gouesnard B, Bataillon TM, Decoux G *et al.* (2001) MSTRAT: An algorithm for building germ plasm core collections by maximizing allelic or phenotypic richness. *The Journal of heredity*, **92**, 93-94.
- Grayston S, Campbell C (1996) Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiology*, **16**, 1031-1038.
- Haichar FEZ, Marol C, Berge O *et al.* (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME Journal*, **2**, 1221-1230.
- Heather L. Tyler, Eric W. Triplett (2008) Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **46**, 53-73.
- Heckenberger M, Bohn M, Klein D, Melchinger AE (2005) Identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines: II. Morphological distances and heterosis in comparison with simple sequence repeat and

- amplified fragment length polymorphism data in maize. *Crop Science*, **45**, 1132–1140.
- Jung S-Y, Lee M-H, Oh T-K, Yoon J-H (2007) *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**, 2284-2288.
- Kandeler E, Marschner P, Tschirko D, Singh Gahoonia T, Nielsen NE (2002) Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize. *Plant and Soil*, **238**, 301-312.
- Kyselková M, Kopecky J, Frapolli M *et al.* (2009) Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. *ISME Journal*, **3**, 1127-1138.
- Labate JA, Lamkey KR, Mitchell SE *et al.* (2003) Molecular and historical aspects of Corn Belt Dent diversity. *Crop Science*, **43**, 80-91.
- Langsrud Ø (2002) 50–50 multivariate analysis of variance for collinear responses. *Journal of the Royal Statistical Society: Series D (The Statistician)*, **51**, 305–317.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209-220.
- Mariette S, Chagne D, Lezier C *et al.* (2001) Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. *Heredity*, **86**, 469-479.
- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM *et al.* (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 6080-6084.
- Miyasaka SC, Kochian LV, Shaff JE, Foy CD (1989) Mechanisms of aluminum tolerance in wheat : an investigation of genotypic differences in rhizosphere pH, K<sup>+</sup>, and H<sup>+</sup> transport, and root-cell membrane potentials. *Plant Physiology*, **91**, 1188-1196.
- Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI, Döbereiner J (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, **21**, 197-200.
- Onofri A (2006) Enhancing Excel capability to perform statistical analyses in agriculture applied research. In: International Association for statistical Computing (ed). Computational Statistics and Data Analysis & Statistical Software Newsletters, 15/02/2006.
- Parke JL, Gurian-Sherman D (2001) Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review of*

*Phytopathology*, **39**, 225-258.

- Picard C, Frascaroli E, Bosco M (2004) Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing rhizobacteria are differentially affected by the genotype of two maize inbred lines and their hybrid. *FEMS Microbiology Ecology*, **49**, 207-215.
- Picard C, Bosco M (2005) Maize heterosis affects the structure and dynamics of indigenous rhizospheric auxins-producing *Pseudomonas* populations. *FEMS Microbiology Ecology*, **53**, 349-357.
- Picard C, Bosco M (2006) Heterozygosity drives maize hybrids to select elite 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* strains among resident soil populations. *FEMS Microbiology Ecology*, **58**, 193-204.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Purugganan MD, Fuller DQ (2009) The nature of selection during plant domestication. *Nature*, **457**, 843-848.
- Qian W, Ge S, Hong D (2006) Genetic diversity in accessions of wild rice *Oryza granulata* from south and southeast asia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **53**, 197-204.
- Raaijmakers J, Paulitz T, Steinberg C, Alabouvette C, Moënne-Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, **321**, 341-361.
- Rebourg C, Chastanet M, Gouesnard B *et al.* (2003) Maize introduction into Europe: the history reviewed in the light of molecular data. *Theoretical and Applied Genetics*, **106**, 895-903.
- Riggs PJ, Chelius MK, Iniguez AL, Kaeppler SM, Triplett EW (2001) Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Functional Plant Biology*, **28**, 829-836.
- Rogers JS (1972) Measures of genetic similarity and genetic distance. *The University of Texas Publications*, 145-153.
- Salamini F, Ozkan H, Brandolini A, Schafer-Pregl R, Martin W (2002) Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 429-441.
- Salles JF, Samyn E, Vandamme P, Van Veen JA, Van Elsas JD (2006) Changes in agricultural management drive the diversity of *Burkholderia* species isolated from soil on PCAT medium. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**, 661-673.
- Sanguin H, Remenant B, Dechesne A *et al.* (2006) Potential of a 16S rRNA-based taxonomic



- microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 4302-4312.
- Sanguin H, Kroneisen L, Gazengel K *et al.* (2008) Development of a 16S rRNA microarray approach for the monitoring of rhizosphere *Pseudomonas* populations associated with the decline of take-all disease of wheat. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 1028-1039.
- Smalla K, Wieland G, Buchner A *et al.* (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4742-4751.
- Sun L, Qiu F, Zhang X *et al.* (2008) Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, **55**, 415-424.
- Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S, Olivier JM (1997) ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and computing*, **7**, 75-83.
- Tyler HL, Triplett EW (2008) Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **46**, 53-73.
- van Overbeek L, van Elsas JD (2008) Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, **64**, 283-296.
- Viallard V, Poirier I, Cournoyer B *et al.* (1998) *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinium*, [*Pseudomonas*] *pyrrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**, 549-563.
- Vigouroux Y, Glaubitz JC, Matsuoka Y *et al.* (2008) Population structure and genetic diversity of New World maize races assessed by DNA microsatellites. *American Journal of Botany*, **95**, 1240-1253.
- Whitby PW, VanWagoner TM, Taylor AA *et al.* (2006) Identification of an RTX determinant of *Burkholderia cenocepacia* J2315 by subtractive hybridization. *Journal of Medical Microbiology*, **55**, 11-21.
- Wichern F, Eberhardt E, Mayer J, Joergensen RG, Müller T (2008) Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: Methods, estimates and future prospects. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 30-48.

---

## Partie expérimentale 2

Influence de l'évolution des céréales  
(*Poaceae*) sur la composition de la  
communauté bactérienne rhizosphérique

---

## Introduction

Le génotype de plante peut avoir une influence importante sur la communauté bactérienne rhizosphérique, comme nous avons pu le voir dans la synthèse bibliographique. Cependant, les résultats du chapitre précédent montrent que l'impact de l'histoire évolutive d'une espèce sur la communauté rhizobactérienne pouvait être difficile à mettre en évidence. Peut-être l'histoire évolutive post-domestication du maïs est-elle trop courte (environ 9000 ans). C'est pourquoi nous nous sommes demandé si l'histoire évolutive à une plus grande échelle que celle du maïs, par exemple à l'échelle d'une partie des Poacées, permettrait de mettre en évidence une relation avec la capacité des plantes à sélectionner les communautés bactériennes rhizosphériques.

Pour étudier l'influence de l'histoire évolutive des Poacées, nous avons comparé des céréales plus ou moins éloignées phylogénétiquement du maïs. Nous avons utilisé quatre lignées pures de maïs appartenant à deux groupes génétiques de maïs distincts (Northern Flint et Corn Belt Dent), une téosinte (même espèce que le maïs, et dont un ancêtre récent est à l'origine du maïs cultivé suite à un événement de domestication), un sorgho (proche phylogénétiquement du maïs, appartenant à la même sous-famille), un blé (plus éloigné, appartenant à une autre sous-famille), et la tomate, une référence extérieure aux poacées. Les différentes plantes ont été cultivées pendant 21 jours dans du sol de La Côte Saint André cultivé depuis plus de 15 ans avec du maïs, comme lors de l'expérience précédente. Les communautés bactériennes rhizosphériques de ces différentes plantes ainsi que la communauté du sol non planté ont été analysées par puce à ADN taxonomique 16S.

Contrairement au chapitre précédent, les distances génétiques entre génotypes de plante n'ont pas été obtenues à partir de marqueurs microsatellites, car ces derniers n'étaient pas disponibles hors du maïs. Pour cette étude, nous avons calculé les distances phylogénétiques entre les différentes plantes en concaténant les séquences de trois gènes chloroplastiques. Les gènes chloroplastiques, transmis de façon verticale, permettent de retracer l'histoire évolutive des plantes, notamment chez les poacées (Shaw *et al.* 2007 ; Hodge *et al.* 2010 ; Peterson *et al.* 2010). Toutefois, ces gènes sont moins résolutifs pour obtenir une distance phylogénétique entre variétés de la même espèce (ce qui était le cas avec les lignées du maïs dans le chapitre précédent), car la conséquence de leur lente évolution est une grande conservation et une faible différenciation entre variétés.

Les résultats indiquent que l'histoire évolutive des poacées est un facteur significatif déterminant la composition taxonomique de la communauté bactérienne rhizosphérique totale, ainsi que la prévalence de populations particulières y-compris pour des taxons comme *Azospirillum* qui incluent des souches phytobénéfiques. Les résultats ont été également comparés, pour deux lignées de maïs, la tomate et le sol nu, avec ceux obtenus (i) dans un sol voisin laissé en prairie depuis plus de 50 ans, ou (ii) dans le même sol mais pour des plantes cultivées 42 jours au lieu de 21. L'ensemble des données obtenues fait l'objet d'un manuscrit qui sera soumis à une revue scientifique.

**Significance of the evolution of *Zea mays* and other Poaceae for  
rhizobacterial community composition**

Marie-Lara Bouffaud<sup>1,2,3</sup>, Marie-André Poirier<sup>1,2,3</sup>, Daniel Muller<sup>1,2,3</sup>, and Yvan Moënne-  
Loccoz<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> *Université de Lyon, F-69622, Lyon, France*

<sup>2</sup> *Université Lyon 1, Villeurbanne, France*

<sup>3</sup> *CNRS, UMR5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, France*

\*Correspondence: Yvan Moënne-Loccoz, Fax: +33 472 43 12 23; E-mail: yvan.moenne-  
locco@univ-lyon1.fr

## **Abstract**

Domestication, dissemination and agricultural improvement of animals and plants entail man-driven selection of traits that are likely to impact on ecological conditions experienced by associated microbial communities. Therefore, it can be expected that the evolutionary history of domesticated eukaryotic hosts will determine their microbiome composition. This hypothesis was tested in the case of plants, by comparing in greenhouse experiment the bacterial communities present in bulk soil or associated to the roots of four maize genotypes, one teosinte (representing maize's pre-domestication ancestor), two more distant cultivated Poaceae (i.e. sorghum from the same *Panicoideae* subfamily and wheat from neighboring *Pooideae* subfamily), and the dicot tomato as external reference. 16S rRNA taxonomic microarray analysis of bacterial communities showed that the genetic distance between rhizobacterial communities correlated significantly with the phylogenetic distance (derived from chloroplastic sequences) between Poaceae genotypes. This was also the case when considering specific bacterial populations from all main bacterial divisions, instead of the community as a whole. The fact that more closely related plant genotypes displayed more similar rhizobacterial communities was not affected when changing field soil management or plant phenology. These results suggest that the evolutionary history of maize and related Poaceae was a significant factor shaping rhizobacterial community composition.

## **Introduction**

Soil microbial community structure is influenced by various environmental factors, such as season, soil type and structure, cropping history, or presence of plant (Marschner *et al.* 2001; Smalla *et al.* 2001; Sanguin *et al.* 2006a; Ma *et al.* 2008; Reeve *et al.* 2010). When considering the plant rhizosphere, differences in bacterial community composition can also be found when comparing different plant species or lines ((Marschner *et al.* 2001; van Overbeek & van Elsas 2008). Indeed, plant genotypes may differ from one another in terms of root system development and thus bacterial root-colonization sites (de Dorlodot *et al.* 2007), nutrient uptake and rhizosphere depletion of minerals (Comas & Eissenstat 2009), root mycorrhization (Becerra *et al.* 2007), and root exudation patterns (Czarnota *et al.* 2003). However, the role played by each of these root properties during rhizobacterial community formation remains poorly understood. Many (if not all) of these root properties should differ more and more as the genetic distance between plant genotypes increases, but very little has been done to test the implications in terms of bacterial recruitment by roots and rhizobacterial community composition. Thus, our hypothesis is that plant evolutionary history is a significant factor shaping rhizobacterial community formation.

In a previous investigation, this hypothesis was tested in the case of maize, which was domesticated from teosinte in Mexico and disseminated in southern and northern America and later to Europe (Doebley 2004; Dubreuil *et al.* 2006). This diversification process resulted in the formation of five main genetic groups of maize (Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006). Greenhouse comparison of selected maize lines showed that rhizobacterial community composition differed according to the genetic group they belong to, following in part maize evolution history (Bouffaud *et al.* 2012). However, membership to a particular genetic group of maize was a better predictor of the rhizobacterial recruitment than plant microsatellite neutral markers. This means that the latter did not provide sufficient information to reflect functional differences between maize lines. Perhaps it is due to the facts that all lines belonged to the same species (*Zea mays*) and originated from rather recent (about 9,000 years ago) domestication of teosinte. Therefore, the hypothesis that plant evolutionary history could in itself be a significant factor determining rhizobacterial community composition deserves further appraisal based on a wider range of plant genotypes, and this was the focus of the current work.

In this study, the relation between plant evolution and rhizobacterial community

composition was assessed using genotypes from maize and related Poaceae. The work was carried out using two lines from each the two maize genetic groups displaying the most different rhizobacterial communities in Bouffaud *et al.* (2012). The experiment also included another *Z. mays* genotype (i.e. a teosinte; *Z. mays* ssp. *parviglumis*), another member of the *Panicoideae* subfamily (i.e. sorghum), a member of another subfamily within the monocots (i.e. wheat; *Pooideae* subfamily), and a member of another family, which belongs to the dicots (i.e. tomato; *Solanaceae* family). Chloroplastic genes, which have been widely studied to reveal plant phylogeny (Hausner *et al.* 2006) including for Angiosperms subfamilies (Shaw *et al.* 2007; Hodge *et al.* 2010; Peterson *et al.* 2010), were used here to estimate genetic distances between these plant genotypes.

In the current work, the eight plant genotypes selected were grown in a same soil originating from a cultivated field in Europe, as described in Bouffaud *et al.* (2012), and rhizobacterial community composition was assessed using a 16S rRNA taxonomic microarray previously validated for rhizosphere studies (Sanguin *et al.* 2006; Kyselkova *et al.* 2009) and used to compare maize lines (Bouffaud *et al.* 2012). However, in addition to the protocol of Bouffaud *et al.* (2012), the current study expanded the assessment in two directions. First, the analysis was carried out at two samplings instead of one, i.e. with 21-day-old seedlings (Bouffaud *et al.* 2012) as well as with better-established plants at 42 days after sowing, for which rhizobacterial community structure is expected to differ (Baudoin *et al.* 2009). Second, since the rhizobacterial community can be influenced by cropping history, the experiment included also soil from a neighboring field, which corresponds to the same pedon but has been for more than 50 years managed as meadow instead of being cultivated with maize.



## **Materials and methods**

### Plant genotypes

Four maize (*Zea mays* L.) inbred lines from two genetic groups, i.e. FV4 and W85 (group Northern Flint) and FV252 and Mo17 (Corn Belt Dent) were used (provided by INRA, St Martin d'Hynx, France). The study also included one teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*; provided by UNAM, Cuernavaca, Mexico), one sorghum (*Sorghum bicolor* cv. Arprim; Semences de Provence, Fourques, France) and one wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Fiorina; provided by AgroScope, Changins, Switzerland), as well as tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Marmande; Vilmorin, La Méniltré, France) used as non-Poaceae reference.

Plant phylogenetic distances within the Poaceae were estimated using three chloroplastic sequences established for phylogeny assessment (Shaw *et al.* 2007; Hodge *et al.* 2010), i.e. gene *rps16* and the intergenic spacers *rps16-trnK* and *atpI-atpH*. To obtain their sequences, seeds of the different plant lines were surface-disinfected (as described above), germinated on water agar (8 g l<sup>-1</sup>) in plates for 2 days in the dark at 28°C, and the plates were placed for 7 days in a growth chamber (16 h of light at 28°C and 8 h of darkness at 22°C). DNA was extracted from 200 mg of fresh leaves crushed in liquid nitrogen (as described below). PCR procedures were adapted from Shaw *et al.* (2007) and Hodge *et al.* (2010). DNA was amplified using an Eppendorf Mastercycler, in a 50- $\mu$ l volume containing 1 $\times$  PCR buffer with MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP (Promega, Charbonnière, France), 0.5  $\mu$ M of each primer, 5% dimethyl sulfoxide, 1.75 U of Expand high fidelity *Taq* polymerase (Roche Applied Science, Meylan, France), and 1  $\mu$ l of template DNA (~30 ng). PCR amplification was done with 1 cycle of 5 min at 80°C, followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 56°C, 1 min at 72°C, and a final cycle at 72°C for 5 min. PCR primers were rps16F/rps16R for *rps16* (Hodge *et al.* 2010), rpS16x2F2/trnK<sup>(UUU)</sup>x1 for *rps16-trnK* spacer, and atpI/atpH for *atpI-atpH* spacer (Shaw *et al.* 2007).

PCR products were cleaned using a MinElute PCR purification kit (Qiagen) following the manufacturer instructions. DNA sequencing was performed on both strands (Beckman Coulter Genomics, Takeley, UK). The DNA sequences were aligned using BioEdit version 7.0.5.3 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). Phylogenetic analysis was performed by MEGA5 (Tamura *et al.* 2011), using the Maximum Likelihood method, and phylogenetic distances were obtained using the Kimura 2 parameter model.

### Greenhouse experiment

Plant lines were cultivated in two soils from adjacent fields located at La Côte Saint-André near Lyon (France), one cropped with maize for more than 15 years, and the second under permanent meadow (for at least 40 years). Both are lusivols with loamy topsoil (clay 15-16%, silt 41-45%, sand 41-43%), but their chemical compositions differ. In particular, the soil under meadow displays lower pH and higher organic matter content, nitrogen content and cation exchange capacity (Table S1). The two topsoils were collected in September 2009 and sieved at 6 mm.

Wheat seeds were surface-disinfected by soaking 3 min in 70% ethanol, 30 min in 3% calcium hypochlorite containing 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), and then 20 min in a 2% sodium thiosulfate solution. After each immersion, the seeds were rinsed five times with demineralized sterile water. Maize, teosinte, sorghum and tomato lines were surface-disinfected using a 3% sodium hypochlorite solution (60 min for maize lines, 20 min for the others) and rinsed five times with demineralized sterile water. At the end of the disinfection process, seeds of maize, sorghum, wheat and tomato were left in demineralized sterile water (1 hour for teosinte, 4 hours for the others) to favor germination.

For each plant line, five pots (2.5 kg soil per 3-dm<sup>3</sup> pot) sown with three seeds each (thinned to one seedling on day 10) were used. Five non-planted pots were also included. They were placed following a randomized block design in a greenhouse with 16 h of light (25°C) and 8 h of darkness (18°C). Each day, water was adjusted manually to soil retention capacity.

Sampling was carried out at 21 days for each plant line in cropped field soil, and for maize lines FV4 and W85 (group Northern Flint) and tomato in meadow field soil. Another sampling was carried at 42 days for maize lines FV4 and W85 and tomato in the cropped field soil. The root systems were dug up and shaken vigorously to separate soil loosely adhering to the roots. Each root system with closely-adhering soil was frozen in liquid nitrogen immediately, then lyophilized and stored at -20°C. Both bulk soils were sampled (5 g in each of the non-planted pots) at 21 and 42 days in both soils, lyophilized and stored at -20°C.

### Extraction and labeling of soil DNA

Total DNA from 0.5 g of rhizosphere or bulk soil were extracted using a protocol derived from Burgmann *et al.* (Burgmann *et al.* 2003). Briefly, 0.5 g soil, 0.5 g zirconium

beads (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), 0.5 ml extraction buffer (5% hexadecyltrimethylammonium bromide, 1 mM 1,4-dithio-DL-threitol, in a 0.12 M phosphate buffer [pH 8]) were processed in a bead beater (TissueLyser II Retsch; Qiagen, Courtaboeuf, France) for 90 s at 30 m s<sup>-1</sup>. After 10 min centrifugation at 16,000 g, supernatants were extracted two times with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (24:24:1 v/v/v), and then with chloroform-isoamyl alcohol (24:1 v/v). Nucleic acids were precipitated overnight with potassium acetate (3 M, pH 4.8) and absolute ethanol at -20°C. After centrifugation 30 min at 16,000 g, pellets were washed with 70% ethanol, and then dissolved in RNase- and DNase-free water.

The universal primers T7-PA and PH (derived from (Bruce *et al.* 1992) were used to obtain 1.5-kb amplicons of the 16S rRNA gene *rrs* from the total community (Edwards *et al.* 1989), as described by Kyselkova *et al.* 2009). PCR products were purified with a MinElute PCR purification kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions, and DNA concentration was adjusted to 50 ng µl<sup>-1</sup>. Amplified DNA was converted to RNA by in vitro transcription, purified and fragmented, as described by Sanguin *et al.* (2008).

### Microarray analysis

The 1033 probes (described in were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium) with a 5' C6-NH<sub>2</sub> modification and spotted, as described by Sanguin *et al.* (Sanguin *et al.* 2008). Each probe was repeated four times per slide. Hybridization was performed in temperature-controlled Belly Dancer (Stovall Life Sciences, Greensboro, NC), as described by Sanguin *et al.* (2008).

The slides were scanned at 532 nm with 10-µm resolution, using a GeneTac LS IV scanner (GenomicSolutions, Huntingdon, UK), and images were analyzed with GENEPIX 4.01 (Axon, Union City, CA), as described (Sanguin *et al.* 2008). Data filtration was done using R 2.10.1 (<http://www.r-project.org>), and hybridization of a given spot was considered positive when 80% of the spot pixels had intensity higher than the median local background pixel intensity plus twice the standard deviation of the local background, as done previously (Sanguin *et al.* 2008; Kyselková *et al.* 2009). The intensity of the signal (median of signal minus background) was replaced by its square root, and the intensity of each spot was expressed as a fraction of the total intensity signal of the basic pattern it belongs to (Sanguin *et al.* 2006). A given probe was considered to be positive when at least two of the three spot replicates were hybridized.

### Data analysis

Microarray data were treated by Principal Component Analysis (PCA) based on the correlation matrix, using the ADE4 package of R (Thioulouse *et al.* 1997). One-way ANOVA and Fisher's LSD tests ( $P < 0.05$ ) were used to compare treatments, based on (i) treatment position along each of the first two PCA axes, i.e. based on PC1 coordinates as well as on PC2 coordinates, and (ii) on hybridization signals for each probe.

In addition, the effects of field management and plant growth stage were considered, for each probe in each treatment, by dividing the normalized hybridization value of each replicate for meadow field soil by the mean value for cropped field soil (all obtained at 21 d) and the normalized hybridization value of each replicate at 42 d by the mean value at 21 d (all obtained with cropped field soil), respectively. These ratios were then analyzed statistically, as described above.

Finally, similarity level between rhizobacterial communities was estimated, using (i) the Bray-Curtis distance (Bray & Curtis 1957) from normalized hybridization intensity data, and (ii) the phylogenetic distance between plants or the Euclidean distance from treatment positions along each of the first two PCA axes. Correlation analyses were performed using Pearson correlation coefficient. All analyses were done using R 2.10.1 software, and (when relevant)  $P < 0.05$  level.

## **Results**

### Bacterial community composition

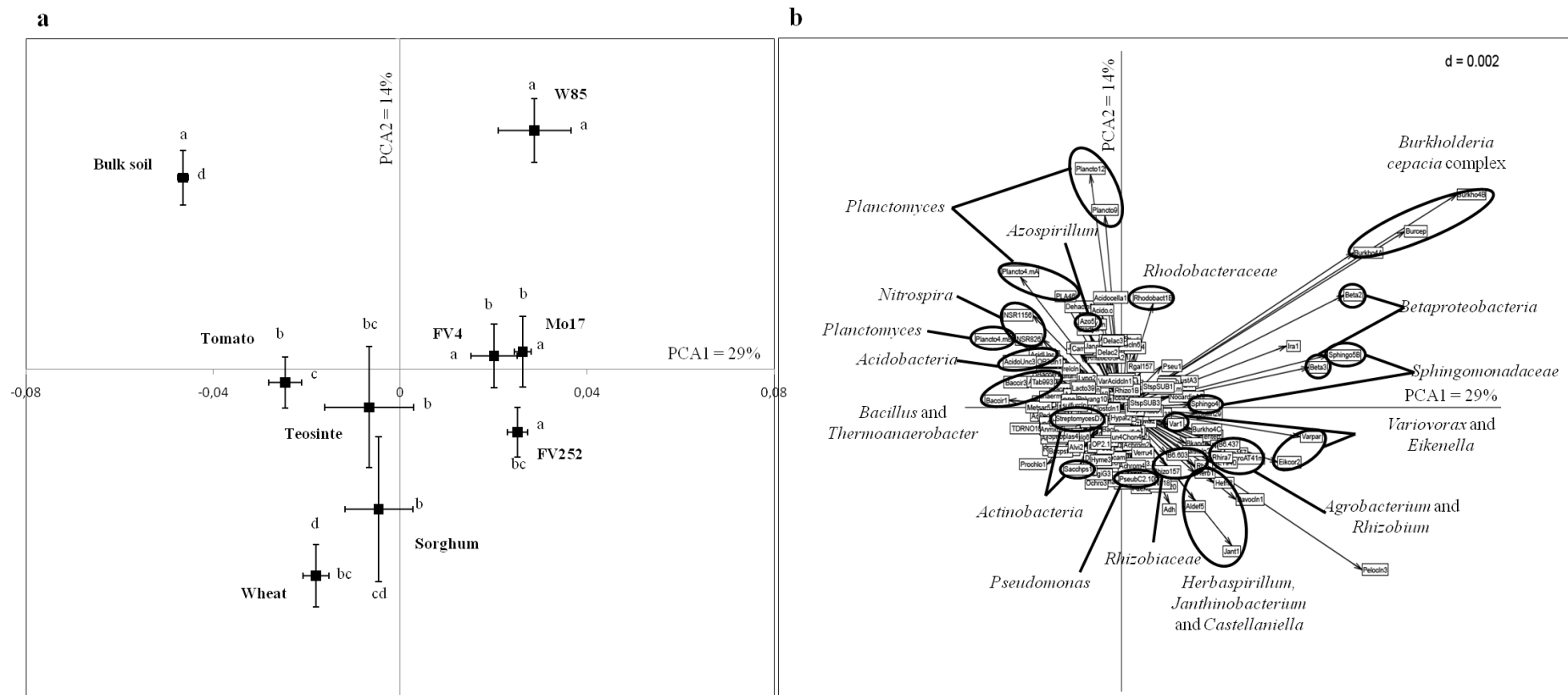
Among the 1033 probes of the microarray, those hybridized with at least one sample amounted to 275 (cropped field at 21 days), 208 (meadow field at 21 days) and 201 (cropped field at 42 days), giving a total of 300 hybridized probes. When all samples were analyzed together, PCA separated treatments according to field of origin, soil cultivation (i.e. planted vs non-planted pots), plant genotype and sampling time (Figure S1; 50% of total variability), which was confirmed by ANOVA and Fisher's LSD tests. Among them, the field of origin was the most influential factor determining bacterial community composition.

Rhizosphere and plant genotype effects

At 21 days, ANOVA/Fisher analyses on PCA coordinates indicated that bulk soil samples differed from all rhizosphere samples along at least one of the first two PCA axes (Figure 1). Among rhizosphere samples, the first axis (29% of total variability) distinguished between (i) the four maize lines, (ii) teosinte and sorghum, and (iii) tomato, with wheat as intermediate between the last two groups (Figure 1a). The second axis (14% of total variability) separated maize samples, and in particular line W85 (Northern Flint genetic group) from the three other maize lines.

Regarding individual probes, as many as 168 of the 275 hybridized probes differed statistically between treatments, mostly due to differences in probe intensity than in presence/absence. In comparison with bulk soil, probes of lower intensity in rhizosphere samples (i.e. 29 probes) targeted *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Polyangium*, *Campylobacter*, *Bacillus*, *Acidobacteria*, *Nitrospira* and *Planctomyces*, whereas probes of higher intensity (13 probes) targeted *Agrobacterium*, some *Rhizobiaceae* and *Variovorax*.

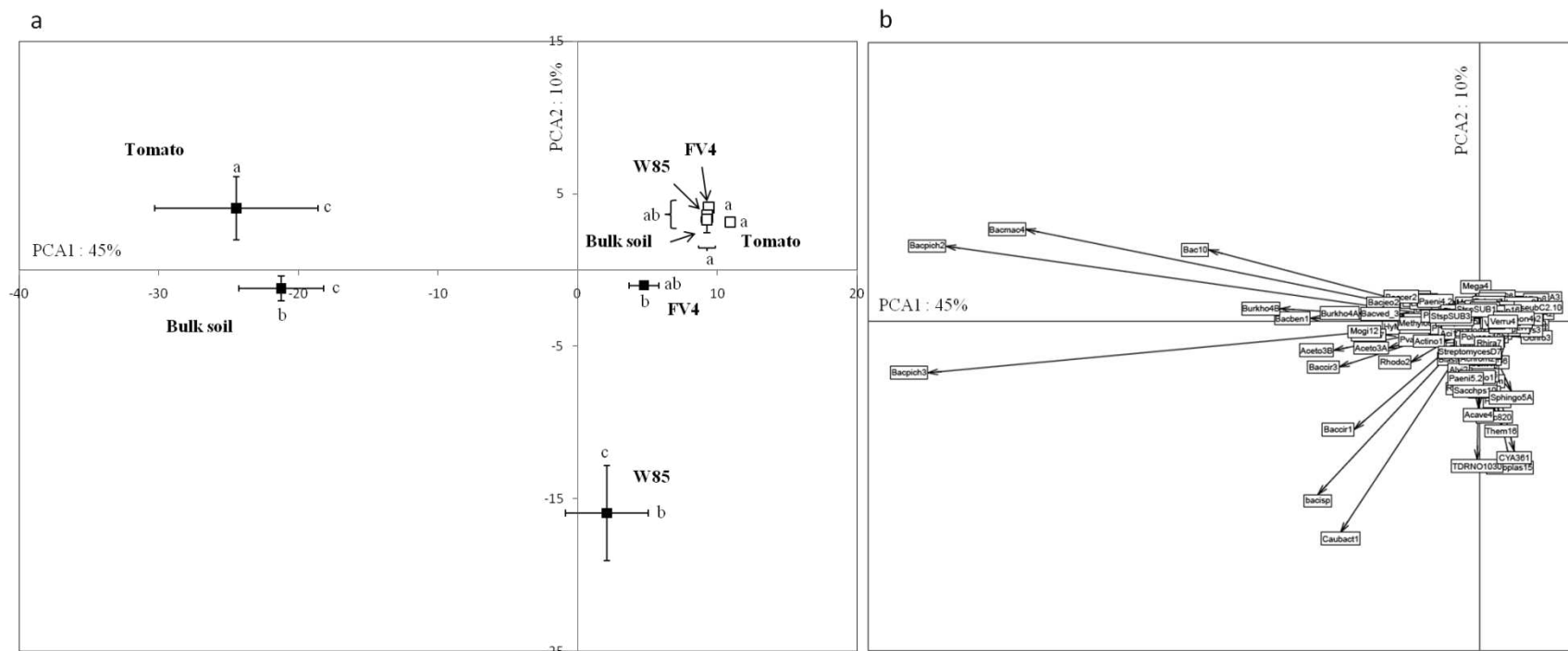
Plant species separation (which in the PCA materialized along the first PCA axis; Figure 1) was due to probes targeting certain *Alphaproteobacteria* (including some *Rhizobiaceae* like *Agrobacterium*, *Sphingomonadaceae*), *Betaproteobacteria* (including *Herbaspirillum* and *Burkholderia*), *Myxococcales*, *Bacillales*, *Acidobacteria* and *Nitrospira* (109 probes in total). Within maize, genotype separation (which in the PCA was significant along the second axis) involved probes targeting particularly certain *Alphaproteobacteria* (including *Azospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhizobium* and *Methylobacterium*), *Betaproteobacteria* (*Burkholderia*, *Variovorax*, *Nitrosospira*, *Delftia* and *Castellaniella*), *Gammaproteobacteria* (including some *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Methylosarcina*), *Myxococcales*, *Actinobacteria* (including *Agromyces* and *Streptomyces*), *Nitrospira*, *Planctomyces*, as well as the *Epsilonproteobacteria* genus *Campylobacter* and the *Firmicute* genus *Paenibacillus* (77 probes; Figure 1b).



**Figure 1** Principal component analysis of 16S microarray results at 21 days for rhizosphere and bulk soil samples in relation to cropped field soil. **(a)** Comparison of rhizosphere and bulk soil samples. For each treatment, mean and standard deviation are represented ( $n = 5$ ). Statistical relations are indicated along PC1 and PC2 axes by letters a-d (ANOVA and Fisher's LSD tests;  $P < 0.05$ ). **(b)** Distribution of microarray probes. The taxa targeted are indicated for the main probes contributing significantly to treatment separations.

Effect of field management and plant growth stage on the rhizosphere effect

Rhizobacterial community composition may change according to soil properties (Reeve *et al.* 2010) or plant phenology (Baudoin *et al.* 2009). The current analysis, based on data for bulk soil, FV4 maize, W85 maize and tomato samples (Figures S1 and 2), showed that changes were of higher magnitude when comparing bacterial communities of cropped soil with meadow soil, than when comparing 42 with 21 d. Comparing field management effects, two-fold differences or more in probe signal intensity were found in at least one treatment (bulk soil or rhizospheres) for 165 probes, with often higher signals with cropped soil. These probes targeted *Firmicutes* (19% of the 165 probes), *Alphaproteobacteria* (18%), *Betaproteobacteria* (15%), *Actinobacteria* (11%), *Deltaproteobacteria* (10%) and *Gammaproteobacteria* (9%). When comparing samplings, a two-fold difference or more in signal intensity was found in at least one treatment (often a rhizosphere treatment) for 128 probes, with often higher signals with samples at 21 d. These probes targeted *Alphaproteobacteria* (22% of the 128 probes), *Betaproteobacteria* (20%), *Actinobacteria* (14%), *Firmicutes* (13%), *Deltaproteobacteria* (10%) and *Gammaproteobacteria* (8%). Considering the whole rhizobacterial community, probe hybridization changes taking place when considering soil management differences were closer for the two maize lines FV4 and W85 (with a difference only along PCA axis 2; Figure 2) than for tomato vs. either maize line (with a difference along PCA axis 1). In addition, probe hybridization changes taking place at rhizobacterial community level when letting plants grow another 21 days in cropped field soil were the same for the two maize lines (no difference along the first two PCA axes), whereas they differed between tomato and either maize line (along PCA axis 1). These results obtained with three selected plant genotypes mean that a similar relation between plant evolution and rhizobacterial community difference can also be found when considering another soil management regime or plants at a later development stage.



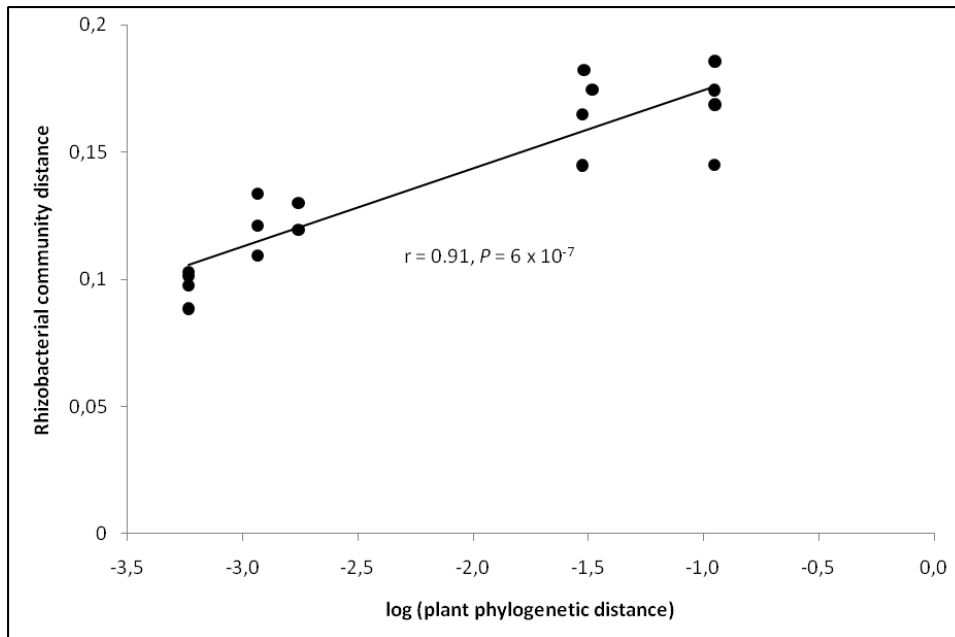
**Figure 2** Principal component analysis of bulk soil and rhizosphere samples (maize lines FV4 and W85, tomato), using normalized 16S rRNA microarray hybridization values obtained at 21 d in meadow soil (divided by the mean value for cropped field soil obtained also at 21 d) and at 42 d in cropped soil (divided by the mean value at 21 d in the same cropped field soil). **(a)** Comparison of rhizosphere and bulk soil samples based on meadow/cropped ratios at 21 d (filled squares) and 42/21-day ratios (empty squares). For each treatment, mean and standard deviation are represented (n = 5). Statistical relations are indicated along PC1 and PC2 axes by letters a-c (ANOVA and Fisher's LSD tests;  $P < 0.05$ ). **(b)** Contribution of microarray probes.



Relationship between maize/Poaceae evolution and rhizobacterial community

A significant positive correlation (Pearson coefficient  $r = 0.91$ ,  $n = 20$ ,  $P = 6 \times 10^{-7}$ ) was found when comparing the log value of the Maximum-Likelihood phylogenetic distance between plant pairs (i.e. between individual maize lines or between a maize line and another Poaceae; without including the FV4/Mo17 comparison as distance was 0) and the Bray-Curtis distance (based on normalized hybridization intensity data) between the corresponding rhizobacterial communities (Figure 3). This was also the case when replacing the Bray-Curtis distance between communities by the Euclidean distance (Figure 1) between treatment positions along axis PC1 ( $r = 0.62$ ,  $n = 20$ ,  $P = 8 \times 10^{-4}$ ).

A significant positive correlation was found when comparing the log value of the Maximum-Likelihood phylogenetic distance (between individual maize lines or between a maize line and another Poaceae) and normalized signal level for 65 of 275 probes at  $P < 0.01$  (Table 1), and for 25 probes more at  $P < 0.05$  (Table S2). These probes targeted especially some *Rhodospirillales* (*Azospirillum*, *Shingomonadaceae* and *Rhodospirillum rubrum*), *Burkholderiales* (*Alcaligenes faecalis* cluster, *Acidovorax avenae* cluster, *Hydrogenophaga palleronii* and *Burkholderia glathei*), *Bacillales* (*Bacillus* and *Peanibacillus*) and *Actinomycetales* (*Kocuria*, *Propionibacterium*, *Actinomyces* and *Corynebacterium*). No significant negative correlation was found for any of the 210 other probes.



**Figure 3** Pairwise comparison of phylogenetic distance between plant genotypes (X axis) and similarity distance between the associated total rhizobacterial communities (Y axis). Distances were calculated two by two, using Kimura 2 parameter model for plant phylogeny and Bray-Curtis's distance for rhizobacterial communities. The Pearson correlation coefficient and its probability level are indicated.

**Table 1** Individual 16S rRNA probes whose Poaceae rhizosphere signal is correlated to phylogenetic distance to maize.

Probe name	Bacterial target	Correlation test <sup>a</sup>	
		r	P
<b>Class Alphaproteobacteria (10/60 probes at <math>P &lt; 0.01</math>, incl. 7 at <math>P &lt; 0.001</math>) <sup>b</sup></b>			
<u>Order Rhodospirillales (8/20)</u>			
Azobr1	Some <i>Azospirillum</i> ( <i>A. brasilense</i> and <i>A. lipoferum</i> ) and <i>Roseomonas faurieae</i>	0.66	*
Ira1	<i>Azospirillum irakense</i> and <i>Rhodocista</i> sp. AR2107 and AT2107	0.70	*
Lipo1	<i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>A. doebereineriae</i> and <i>A. largomobile</i>	0.87	***
Sphingo5B	Most <i>Sphingomonadaceae</i>	0.76	**
Sphingo4	Most <i>Sphingomonadaceae</i>	0.84	***
Inteur1	<i>Gluconacetobacter intermedius</i> and <i>G. europaeus</i>	0.79	**
Rhodo2	<i>Rhodospirillum</i>	0.74	**
Rub1	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	0.93	***
<u>Order Rhizobiales (2/34)</u>			
B6.437	<i>Agrobacterium</i> spp. (G1, G3, G4, G7, some <i>A. rubi</i> and most <i>Rhizobium</i> )	0.85	***
Barto2	<i>Bartonella</i>	0.68	*
<b>Class Betaproteobacteria (9/43 probes at <math>P &lt; 0.01</math>, incl. 4 at <math>P &lt; 0.001</math>)</b>			
Beta2	<i>Betaproteobacteria</i>	0.70	*
Beta3	<i>Betaproteobacteria</i>	0.65	*
<u>Order Burkholderiales (7/35)</u>			
Hefri4	<i>Herbaspirillum huttiense</i> , <i>H. putei</i> , <i>H. magnetovibrio</i>	0.68	*
Bkhglat	<i>Burkholderia glathei</i>	0.84	***
Varpar	<i>Variovorax paradoxus</i>	0.60	**
Alfae1	<i>Alcaligenes faecalis</i> cluster	0.61	*
Alfae2	<i>Alcaligenes faecalis</i> cluster	0.68	*
Acave4	<i>Acidovorax avenae</i> cluster	0.85	***
Hypal2	<i>Hydrogenophaga palleronii</i>	0.86	***
<b>Class Gammaproteobacteria (9/28 probes at <math>P &lt; 0.01</math>, incl. 8 at <math>P &lt; 0.001</math>)</b>			
<u>Order Thiotrichales (2/3)</u>			
Frtul4	<i>Francisella tularensis</i>	0.77	**
Frtul7	<i>Francisella tularensis</i>	0.88	***
<u>Order Pseudomonadales (2/9)</u>			
Mor1	<i>Moraxella</i>	0.80	**
PseubC4.6	<i>Pseudomonas corrugata</i>	0.75	**
<u>Order Enterobacteriales (4/7)</u>			
Kleb1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.67	*
Pagg5	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.79	**
Pagg6	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.77	**
Pho1	<i>Photothabdus</i>	0.77	**
<u>Order Xanthomonadales (1/4)</u>			
Xancam	<i>Xanthomonas campestris</i>	0.80	**
<b>Class Deltaproteobacteria (4/22 probes at <math>P &lt; 0.01</math>, incl. 1 at <math>P &lt; 0.001</math>)</b>			
<u>Order Myxococcales (4/18)</u>			
Halian2	<i>Haliangium</i>	0.70	*
Anmxb6	<i>Anaeromyxobacter</i>	0.74	**
un43Chon10	Uncultured <i>Chondromyces</i>	0.64	*
Nancs7	<i>Nannocystis</i>	0.63	*
<b>Class Epsilonproteobacteria (3/5 probes at <math>P &lt; 0.01</math>, incl. 3 at <math>P &lt; 0.001</math>)</b>			
Alvi2	Unidentified <i>Epsilonproteobacteria</i> affiliated to <i>Alvinella</i>	0.89	***
<u>Order Campylobacterales (2/3)</u>			
HeliFel1	<i>Helicobacter heilmanni</i> cluster (including <i>H. felis</i> )	0.62	***
Wolin2	<i>Wolinella succinogenes</i>	0.86	***
<b>Phylum Firmicutes (14/41 probes at <math>P &lt; 0.01</math>, incl. 8 at <math>P &lt; 0.001</math>)</b>			
LGC354A	<i>Firmicutes</i> (excepted <i>Clostridia</i> and some <i>Lactobacillales</i> )	0.67	*

Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques

<b>Order <i>Bacillales</i> (9/32)</b>			
Bacpich2	<i>Bacillus pichinoty</i>	0.68	*
Bacpich3	<i>Bacillus pichinoty</i>	0.78	**
Bacjeo6	<i>Bacillus jeotgali</i>	0.68	*
Bacfor1	<i>Bacillus fortis</i> and related cluster	0.85	***
Bacfara2	<i>Bacillus fortis</i> and related cluster	0.86	***
Bacved_3	<i>Bacillus vedderi</i>	0.83	***
Palv	<i>Paenibacillus alvei</i>	0.63	*
Paeni4.2	<i>Paenibacillus popolliae</i> and related cluster (including <i>P. lentimorbus</i> , <i>P. thiaminolyticus</i> )	0.86	***
Pbo2	<i>Paenibacillus borealis</i>	0.82	***
<b>Order <i>Selenomonadales</i> (3/4)</b>			
Diali3	<i>Dialister</i>	0.69	*
Diali14	<i>Dialister</i>	0.71	*
Mega8	<i>Megasphaera</i>	0.87	***
<b>Order <i>Chlostridiales</i> (1/1)</b>			
Mogi12	<i>Mogibacterium</i>	0.90	***
<b>Phylum <i>Actinobacteria</i> (7/38 probes at <math>P &lt; 0.01</math>, incl. 5 at <math>P &lt; 0.001</math>)</b>			
<b>Order <i>Actinomycetales</i> (6/35)</b>			
ActiD2	<i>Actinomyces</i>	0.80	**
Agrm4	<i>Agromyces</i>	0.68	*
Cornba8	<i>Corynebacterium</i>	0.86	***
Glyc3	<i>Glycomyces</i>	0.68	*
Kocur10	<i>Kocuria</i>	0.90	***
Propio1	<i>Propionibacterium</i>	0.90	***
<b>Order <i>Coriobacteriales</i> (1/2)</b>			
Collin29	<i>Collinsella</i>	0.87	***
<b>Phylum <i>Cyanobacteria</i> (1/5 probes at <math>P &lt; 0.01</math>, incl. 1 at <math>P &lt; 0.001</math>)</b>			
Prochlol	<i>Prochlorothrix</i>	0.89	***
<b>Phylum <i>Tenericutes</i> (1/2 probes at <math>P &lt; 0.01</math>)</b>			
Spiroplas4	<i>Spiroplasma</i>	0.66	*
<b>Phylum <i>Bacteroidetes</i> (3/8 probes at <math>P &lt; 0.01</math>, incl. 2 at <math>P &lt; 0.001</math>)</b>			
<b>Order <i>Bacteroidales</i> (1/1)</b>			
Rik6	<i>Rikenella</i>	0.85	***
<b>Order <i>Cytophagales</i> (2/2)</b>			
Spiro5	<i>Spirosoma</i>	0.67	*
Hyme3	<i>Hymenobacter</i>	0.79	**
<b>Phylum <i>Deferribacteres</i> (1/2 probes at <math>P &lt; 0.01</math>, incl. 1 at <math>P &lt; 0.001</math>)</b>			
OP2.1	Candidate phylum OP2	0.78	**
<b>Phylum <i>Planctomycetes</i> (3/8 probes at <math>P &lt; 0.01</math>, incl. 1 at <math>P &lt; 0.001</math>)</b>			
Plancto9	<i>Gemmata</i> cluster	0.70	*
Plancto12	<i>Gemmata</i> cluster	0.70	*
Plancto16	Some <i>Pirrellula</i>	0.76	**

<sup>a</sup> Pearson correlation coefficient  $r$  and probability (\*:  $P < 0.01$ ; \*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*:  $P < 0.0001$ ) are indicated.

<sup>b</sup> For each Order, Class or Phylum targeted by probes, the number of probes giving a statistically-significant correlation among hybridized probes is indicated in parenthesis.

## **Discussion**

Genetic groups of eukaryotic hosts may display different types of microbial community, regardless of whether mammals and their gut microbes (Ley *et al.* 2008), insects and their endosymbionts (Chen *et al.* 1999; Moran *et al.* 2008), or plants and their rhizosphere microbiota (Bouffaud *et al.* 2012) are concerned. This makes sense, because eukaryotic hosts from a same genetic group will share a number of life history traits, and many of the latter determine selection pressures for associated microorganisms by conditioning host properties in terms of colonization surfaces, carbon and energy sources, and secondary metabolites (Ammar *et al.* 2009; Voges *et al.* 2010) to which these microorganisms will be exposed. Such group-related life history traits have been evidenced for animals and plants, regardless of whether these groups belong to a same species or correspond to different species (Ley *et al.* 2008; Ammar *et al.* 2009; Putten *et al.* 2009; Uga *et al.* 2009; Lee & Stock 2010; Voges *et al.* 2010; Hardoim *et al.* 2011). However, these genetic groups are typically very heterogeneous, even when defined at intra-species level (Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006; Uga *et al.* 2009), and members of a same genetic group of eukaryotic hosts can be quite different in terms of micro-evolutionary history and phenotypic properties (Nakamoto & Oyanagi 1996; Corral *et al.* 2008).

This work is based on the rationale that the phylogenetic groups usually defined to classify eukaryotic hosts are too heterogeneous to enable precise assessment of the relation between host evolution and the composition of the associated microbial community. If such a relationship exists, it would also mean that the more phylogenetically distant the hosts, the more distinct their associated bacterial communities. Such a correlation was not found at intra-species level, when studying cultivated maize (Bouffaud *et al.* 2012). However, a quantitative relation (positive and linear) was evidenced here when comparing plant phylogenetic distances for maize genotypes and related Poaceae (from intra-species to subfamily levels) to the pairwise community composition distances between their associated bacterial biomes (Figure 3). This means that any phenotypic particularity resulting from the evolutionary history of these Poaceae (and not only the main traits that members of a given plant group all have in common) has the potential to influence the ability of the resulting genotypes to select bacterial taxa.

Such a relationship might involve co-evolution (Kinkel *et al.* 2011), but probably to a restricted extent in the current experimental context. Indeed, coevolution is a process well

documented for symbionts/hosts or hosts/parasites (Heath 2008; Provorov & Vorobyov 2009; Brown & Tellier 2011), but which remains speculative at the scale of the entire rhizobacterial community (Lambers *et al.* 2009). In addition, although certain endophytic bacteria might be transmitted vertically (Johnston-Monje & Raizada 2011), this is very unlikely to happen for most rhizobacteria, which are selected from soil (Bais *et al.* 2006). Finally, the current experiments were performed with soils from a single geographic area rather than using for each genetic group a different soil taken in one region of the world where the corresponding plant genetic group formed and/or spread (Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006). The cropped soil of the study has a history of maize cultivation with commercial hybrids and not maize landraces, in a region where the crop has become important in the last 50 years only, and it has not been grown with wheat or sorghum in the last decades. For the meadow soil, there is no documented history of cropping in the records (dating back to 1955).

There is a paucity of data on the relationship between eukaryotes host evolution and associated bacteria. Indeed, the information available is restricted to the case of a single, plant-associated bacterial genus (*Bradyrhizobium*), for which genetic distances between strains were related to the genetic distances between their *Amphicarpaea bracteata* hosts (Parker & Spoerke 1998). Here, the assessment was extended to bacterial taxa with contrasting relations with plants, ranging from symbioses (noticeably for certain members of the *Rhodospirillales*, *Bacillales* and *Actinomycetales*) to parasitism (e.g. *Agrobacterium* and *Xanthomonas*) (Tables 1 and S2). Indeed, as many as 24% of the probes that hybridized displayed a significant correlation with plant distance (at  $P < 0.01$ ), meaning that the relationship was relevant for a significant fraction of the bacterial community.

In this work, one teosinte representing maize's pre-domestication ancestor was included, but the corresponding correlation data were in line with those obtained when comparisons were done between cultivated genotypes (Figure 2). This, which is consistent with the fact that teosinte, maize and sorghum (all three from the same *Panicoideae* subfamily; (Bouchenak-Khelladi *et al.* 2008)) have similar root morphology during vegetative stages (Aloni & Griffith 1991; Singh *et al.* 2010), suggests that the domesticated/wild status was of negligible significance compared with plant phylogenetic distances. It would mean that for interaction with soil bacteria domestication is only of importance as a factor triggering accelerated evolution. Indeed, domestication is a drastic change in the evolution process, selecting traits facilitating grain harvest (Purugganan & Fuller 2009a)

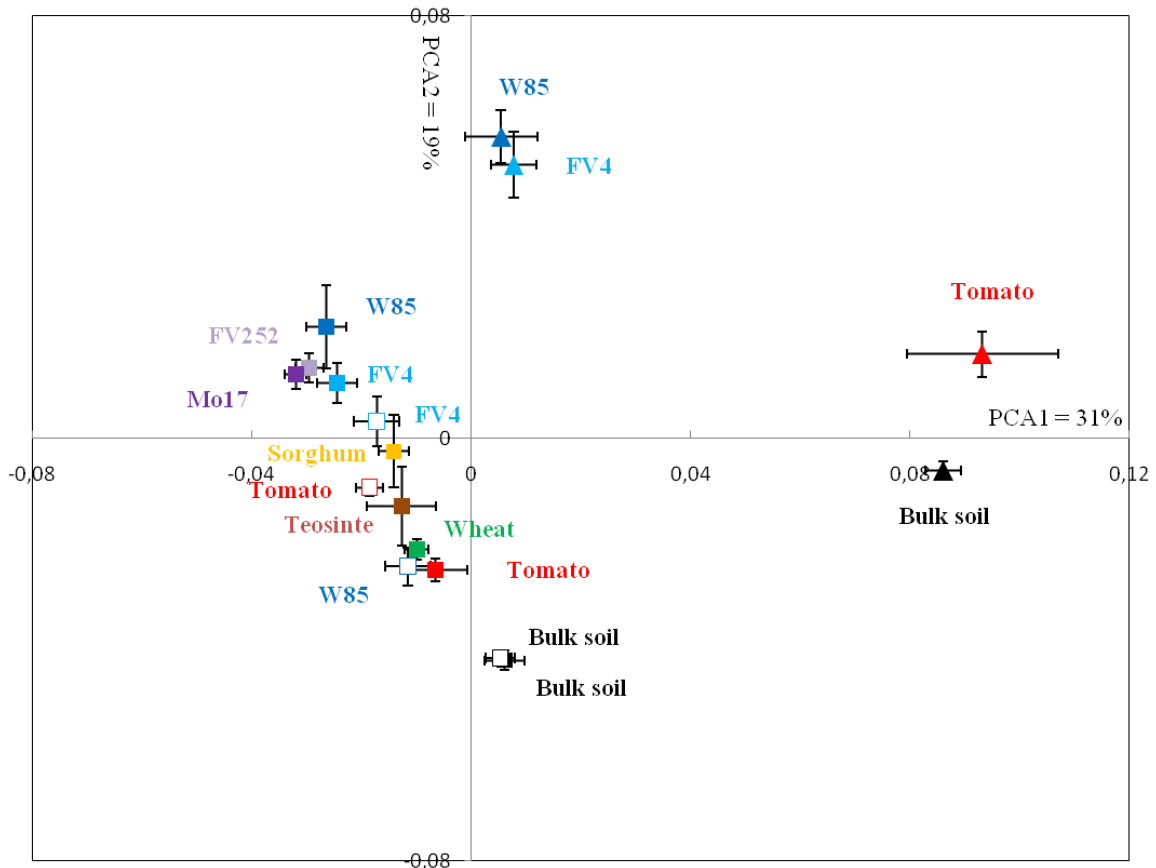
Large-scale post-domestication dissemination (Dubreuil *et al.* 2006; Dubcovsky & Dvorak 2007) and local selection according to particular environmental conditions have had a

strong influence on the resulting genetic structure of crop species (Purugganan & Fuller 2009b). Different plant species, and at a smaller scale different plant genotypes within species, have specific phenotypic properties, including root properties that are likely to influence rhizobacterial community composition (Fan *et al.* 2001; Bertin *et al.* 2003; Bais *et al.* 2006). Differences in rhizodeposits (carbon and energy sources) occur between genotypes of a same plant species (Czarnota *et al.* 2003; Micallef *et al.* 2009), different plant species (Fan *et al.* 2001) or different plant families, paralleling phylogenetic relations (Lambert *et al.* 2010). Indeed, rhizobacterial community composition depended both on plant species (Figure 1; 29% of total variability along axis 1) and plant genotype within the *Z. mays* species (Figure 1; 14% variability along axis 2).

Despite the significant effect of plant evolution on rhizobacterial community composition, common features were also evidenced when considering together the rhizosphere effect of all plant genotypes (Figure 1). For the most part, results confirmed previous findings (Reichenbach 1999; Sanguin *et al.* 2006a; Kielak *et al.* 2008; Thompson 2010; Jäderlund *et al.* 2011), but the lower signals for probes targeting *Azospirillum*, *Rhizobiaceae*, *Bacillus*, *Nitrospira* and *Planctomycetes* in rhizosphere than in bulk soil were unexpected (Gomes *et al.* 2001; Sanguin *et al.* 2006a; DeAngelis *et al.* 2008; Kumar *et al.* 2011), even though they confirm some of our previous results with this soil (Bouffaud *et al.* 2012).

The robustness of the current findings was shown when comparing very close genotypes (two maize lines) and distant ones (maize versus tomato) in the same soil subjected to different management (permanent meadow) or at a different sampling time (Figure 2). This approach also evidenced that soil management was a more influential factor than plant growth stage, as found for other crop species (Wieland *et al.* 2001; Rasche *et al.* 2006). Here, cropping modified soil properties (Table S1) known to influence bacterial community composition, such as pH (Lauber *et al.* 2009), organic matter (Baudoin *et al.* 2003) and nitrogen (Kennedy *et al.* 2004).

In conclusion, this analysis performed with maize genotypes and related Poaceae is the first study showing that the extent of plant diversification, which shapes genetic distances between plant genotypes, can be a significant factor determining selection of soil bacteria by roots and rhizobacterial community composition.



**Figure S1** Principal component analysis of 16S microarray results for all rhizosphere and bulk soil samples. Filled squares are used for cropped field soil at 21 days, empty squares for cropped field soil at 42 days, and filled triangles for meadow field soil at 21 days after sowing. For each treatment, mean and standard deviation are represented (n = 5).



**Table S1** Topsoil chemical composition.

	Cropped field	Permanent meadow field
Clay (%)	15.9	14.9
Silt (%)	41.4	44.6
Sand (%)	42.7	40.5
Texture	Loam	Loam
pH [water]	7.3	6.0
Organic matter (%)	2.3	5.5
N total (%)	0.16	0.32
C:N ratio	8.5	10.0
CaCO <sub>3</sub> total (%)	0.8	0
P total (mg kg <sup>-1</sup> )	220	630
K total (mg kg <sup>-1</sup> )	120	540
Cation exchange capacity (cmol kg <sup>-1</sup> )	88	120

**Supplementary Table S2** Statistical results for individual probes among rhizosphere or soil samples.

Probes	Bacterial target	Treatments (n=5) <sup>*</sup>									Correlation test <sup>**</sup>	
		FV252	Mo17	FV4	W85	Teosinte	Sorghum	Wheat	Tomato	Bulk soil	r	P
<b>Class Alphaproteobacteria (21/60)<sup>****</sup></b>												
Alpha685	Most <i>Alpha proteobacteria</i> , Most <i>Deltaproteobacteria</i> and <i>Fusobacteria</i>	cd	abc	a	bc	bcd	d	cd	abc	ab		
<b>Order Rhodospirillales (13/20)</b>												
Azo1	<i>Azospirillum</i> (excepted <i>A. irakense</i> and <i>A. amazonense</i> ), some <i>Roseomonas</i> spp., some <i>Rhodospirillum</i> spp., some <i>Rhodocista</i> spp., some <i>Skermanella</i> spp.	cd	d	ab	bcd	bc	cd	bc	bc	a		
Azobr1	Some <i>Azospirillum</i> ( <i>A. brasilense</i> and <i>A. lipoferum</i> ) and <i>Roseomonas faurieae</i>	c	c	bc	bc	bc	a	ab	bc	bc	0.66	4 × 10 <sup>-3</sup>
Azo5	<i>Azospirillum</i> (excepted <i>A. irakense</i> and <i>A. amazonense</i> ), some <i>Roseomonas</i> spp., some <i>Rhodospirillum</i> spp., some <i>Rhodocista</i> spp., some <i>Skermanella</i> spp.	d	cd	bc	b	bc	d	cd	b	a		
Ira1	<i>Azospirillum irakense</i> and <i>Rhodocista</i> sp. AR2107 and AT2107	b	a	a	b	c	cd	d	cd	d	0.70	2 × 10 <sup>-3</sup>
Lipo1	<i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>A. doebereineriae</i> and <i>A. largomobile</i>										0.87	6 × 10 <sup>-6</sup>
Sphingo5B	Most <i>Sphingomonadaceae</i>	ab	a	a	b	c	cd	cd	c	d	0.76	4 × 10 <sup>-4</sup>
Sphingo4	Most <i>Sphingomonadaceae</i>	a	a	a	ab	bc	cd	cd	c	d	0.84	2 × 10 <sup>-5</sup>
Aceto3A	Some <i>Acetobacteraceae</i>										0.49	5 × 10 <sup>-2</sup>
Aceto3B	<i>Acetobacteraceae</i>	b	b	b	b	ab	b	a	a	b	0.59	1 × 10 <sup>-2</sup>
Gludi	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	abc	a	abc	ab	bc	c	c	bc	ab	0.59	1 × 10 <sup>-2</sup>
Inteur1	<i>Gluconacetobacter intermedius</i> and <i>G. europaeus</i>	b	b	b	b	b	ab	b	a	b	0.79	2 × 10 <sup>-4</sup>
Ace2	<i>Acetobacter</i>	ab	abc	bcd	cd	cd	ab	bcd	a	d		
Acidocella1	<i>Acidocella</i> and <i>Acidiphilium</i>	abc	bcd	ab	ab	bc	d	cd	bcd	a	0.56	2 × 10 <sup>-2</sup>
Acdp821	<i>Acidiphilium</i>	a	b	ab	b	a	a	a	a	a		
Aci2	<i>Acidocella</i> and <i>Acidiphilium</i>	c	c	c	c	bc	c	bc	b	a	0.53	3 × 10 <sup>-2</sup>
Rhodo2	<i>Rhodospirillum</i>										0.74	7 × 10 <sup>-4</sup>
Rub1	<i>Rhodospirillum rubrum</i>										0.93	4 × 10 <sup>-8</sup>
<b>Order Rhizobiales (8/34)</b>												
Rzbc1247	<i>Rhizobiaceae</i> , <i>Brucellaceae</i> , <i>Bartonella</i> , <i>Phyllobacteriaceae</i> , <i>Blastochloris</i> , <i>Azospirillum irakense</i> and <i>A. amazonense</i>	a	abc	bc	bc	ab	d	cd	cd	bc		

Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques

Rzbc820	<i>Rhizobiaceae, Brucella and Bartonella</i>	a	bcd	ab	d	ab	bc	bc	cd	d		
Rhi	<i>Rhizobiaceae (excepted Agrobacterium), Bradyrhizobiaceae, Brucellaceae and Brevundimonas</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	b		
Rhizo157	<i>Rhizobiaceae (excepted Agrobacterium), Bradyrhizobiaceae, Brucellaceae and Brevundimonas</i>	a	bcd	cd	d	ab	d	abc	cd	e		
Rhira7	<i>Rhizobium radiobacter</i> cluster (including <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )	a	a	ab	ab	ab	ab	ab	bc	c		
Rhizo1B	Some <i>Rhizobium</i>	cd	bc	a	b	de	cd	e	de	b		
Phyllobact	<i>Mesorhizobium/Rhizobium</i>										0.52	$3 \times 10^{-2}$
Agro157	<i>Agrobacterium</i> (Biovar 1, 2 and 3)	a	ab	ab	ab	ab	bc	bc	c	d	0.53	$3 \times 10^{-2}$
AgroAT41m	<i>Agrobacterium</i> (Biovar 1 and <i>A. rubi</i> )	a	ab	ab	b	ab	b	b	b	b		
B6.437	<i>Agrobacterium</i> sp. (G1, G3, G4, G7, some <i>A. rubi</i> and most <i>Rhizobium</i> )	a	ab	ab	ab	ab	bc	bc	c	d	0.85	$2 \times 10^{-5}$
B6.603	<i>Agrobacterium</i> (G1, G3, G4, G7), <i>A. rubi</i> , <i>A. larrymoorei</i> , some <i>Rhizobium</i> and some <i>Brevundimonas</i>	a	abc	c	bc	abc	c	ab	c	d		
Davocln1	<i>Devosia</i> and some <i>Rhizobiales</i>	ab	a	ab	bc	abc	c	ab	c	d		
Hypho5	Some <i>Hyphomicrobium</i>	c	c	ab	bc	ab	ab	ab	a	a		
Xan	<i>Xanthobacter</i>	b	b	ab	b	bc	c	bc	b	a	0.51	$4 \times 10^{-2}$
Aficln1	<i>Afipia</i> and <i>Nitrobacter</i>	b	b	b	b	b	a	b	b	b		
Nitro1	<i>Nitrobacter</i>	cd	d	bcd	d	ab	bcd	ab	a	abc		
Blastochlo6	<i>Blastochloris</i> and <i>Ochrobactrum</i>	ab	b	b	b	a	a	a	a	ab	0.54	$3 \times 10^{-2}$
Ochro3	<i>Ochrobactrum</i>	bcd	cd	cd	d	ab	abc	a	ab	bcd	0.52	$3 \times 10^{-2}$
Blast1	<i>Blastochloris</i>	e	e	c	bc	de	ab	cd	bc	a		
Brady6A	Most <i>Bradyrhizobium</i> and <i>Afipia</i>	cd	bcd	b	bc	bcd	d	cd	bcd	a		
Rhodopseud	<i>Rhodopseudomonas</i>	c	bc	ab	c	ab	a	a	a	a	0.53	$3 \times 10^{-2}$
Pedo2	<i>Pedomicrobium</i>	c	c	a	b	ab	ab	a	ab	a		
Methy7	<i>Methylocystis</i> and <i>Methylosinus</i>	ab	ab	bcd	bcd	cd	abc	a	d	d		
Methylo1	<i>Methylobacterium</i>	a	d	abc	cd	a	bcd	abc	ab	abc		
Barto2	<i>Bartonella</i>										0.68	$3 \times 10^{-3}$
<u>Order Rhodobacterales (0/2)</u>												
Rhodobact1B	<i>Rhodobacteraceae</i> (excepted <i>Paracoccus</i> , <i>Amaricoccus</i> , <i>Rhodobacter</i> and <i>Rhodovulum</i> )	bc	b	b	a	bcd	d	bcd	cd	b		
<u>Order Rickettsiales (0/2)</u>												
Cow1	<i>Ehrlichia</i>	abc	bcd	cd	abc	abcd	d	ab	abcd	a		

Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques

<b>Class Betaproteobacteria (13/43)</b>												
Beta2	<i>Betaproteobacteria</i>	ab	ab	bc	a	bcd	cde	e	e	de	0.70	$2 \times 10^{-3}$
Beta3	<i>Betaproteobacteria</i>	ab	ab	ab	a	b	b	c	c	c	0.65	$5 \times 10^{-3}$
BET940	<i>Beta proteobacteria</i> (excepted <i>Comamonadaceae</i> , <i>Nitrosomonadaceae</i> , and <i>Methylophilaceae</i> )	a	bc	ab	bcd	bcd	cd	bc	cd	d		
<b>Order Burkholderiales (10/35)</b>												
Herb1	<i>Herbaspirillum</i>	ab	a	ab	ab	a	ab	ab	bc	c		
Hefri2	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	a	ab	a	bc	abc	bc	bc	c	bc	0.68	$3 \times 10^{-3}$
Hefri4	<i>Herbaspirillum huttiense</i> , <i>H. putei</i> , <i>H. magnetovibrio</i>											
Burkho4A	Most <i>Burkholderia</i>	b	b	b	a	cd	bc	d	d	d		
Bkand	<i>Burkholderia andropogonis</i>	a	cd	cd	ab	bcd	bcd	bcd	bc	d		
Burcep	Some <i>Burkholderia</i> ( <i>B. cepacia</i> , <i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i> , <i>B. vietnamiensis</i> , <i>B. thailandensis</i> , <i>B. pyrrocinia</i> ) and some <i>Herbaspirillum</i>	bc	b	b	a	cd	b	e	cde	de		
Burkho4B	Some <i>Burkholderia</i> ( <i>B. hospita</i> , <i>B. cepacia</i> , <i>B. caribensis</i> , <i>B. caryophylli</i> , <i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i> , <i>B. pyrrocinia</i> , <i>B. ambifaria</i> , <i>B. gladioli</i> , <i>B. glumae</i> )	b	b	b	a	cd	bc	d	d	d		
Bkhglat	<i>Burkholderia glathei</i>										0.84	$2 \times 10^{-5}$
Jant1	<i>Janthinobacterium</i>										0.57	$2 \times 10^{-2}$
Nit1A	Most <i>Nitrosospira</i>										0.57	$2 \times 10^{-2}$
Var1	<i>Variovorax</i>	ab	a	bc	bc	abc	bc	cd	bc	d		
Varpar	<i>Variovorax paradoxus</i>	a	a	ab	bc	bc	d	d	cd	e	0.60	$1 \times 10^{-4}$
Pelocln3	<i>Pelomonas</i> and <i>Alcaligenes</i>	ab	a	ab	c	abc	bc	bc	d	d		
Aldef5	<i>Alcaligenes defragans</i>	a	ab	ab	cd	bc	ab	bc	c	d		
Alfae1	<i>Alcaligenes faecalis</i> cluster										0.61	$9 \times 10^{-3}$
Alfae2	<i>Alcaligenes faecalis</i> cluster										0.68	$3 \times 10^{-3}$
Acave4	<i>Acidovorax avenae</i> cluster	b	b	b	b	b	a	a	b	b	0.85	$2 \times 10^{-5}$
Metpet1	Some <i>Burkholderiales</i>	b	b	b	b	b	a	b	b	b	0.54	$2 \times 10^{-2}$
Aquacln2	Some <i>Burkholderiales</i>	b	b	b	b	b	a	b	b	b		
Delf1	<i>Delftia</i>	b	b	b	b	ab	a	b	b	ab		
Delac2	<i>Delftia acidovorans</i>	d	b	bc	a	bc	bc	cd	bc	a		
Delac3	<i>Delftia acidovorans</i>	cde	cd	cde	a	bc	de	e	cd	ab		
Comtes2	<i>Comamonas</i> (mainly <i>C. testosteroni</i> )	bc	bc	b	bc	c	a	bc	bc	bc		
Hypal2	<i>Hydrogenophaga palleronii</i>										0.86	$9 \times 10^{-6}$

Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques

<u>Order Nitrosomonadales (0/2)</u>												
Nit1B	Most <i>Nitrosospira</i>	abc	a	cde	ab	abcd	abcd	e	de	bcd		
Nitcryo1	<i>Nitrosomonas cryotolerans</i>	b	b	b	b	b	a	b	b	b		
<u>Order Neisseriales (1/2)</u>												
Neiselon	<i>Neisseria elongata</i>	a	a	a	ab	abc	a	abc	bc	c		
Eikcor2	<i>Eikenella corrodens</i> and <i>Neisseria meningitidis</i>	a	a	ab	bc	bc	bc	cd	d	e	0.56	$2 \times 10^{-2}$
<b>Class Gammaproteobacteria (14/28)</b>												
<u>Order Thiotrichales (3/3)</u>												
Achro1	<i>Achromatium</i>	cd	d	cd	d	bc	ab	bcd	ab	a	0.56	$2 \times 10^{-2}$
Frtul4	<i>Francisella tularensis</i>	c	c	bc	c	bc	a	ab	ab	a	0.77	$3 \times 10^{-4}$
Frtul7	<i>Francisella tularensis</i>	b	b	b	b	b	a	a	ab	ab	0.88	$4 \times 10^{-6}$
<u>Order Alteromonadales (1/1)</u>												
Alter2	<i>Alteromonas</i>	cd	cd	bcd	d	bcd	a	abc	ab	a	0.55	$2 \times 10^{-2}$
<u>Order Pseudomonadales (3/9)</u>												
Mor1	<i>Moraxella</i>										0.80	$1 \times 10^{-4}$
Pseu1	<i>Pseudomonas</i>										0.50	$4 \times 10^{-2}$
PseubC4.6	<i>Pseudomonas corrugata</i>	b	b	b	b	b	a	a	b	b	0.75	$6 \times 10^{-4}$
PseubC2.10	<i>Pseudomonas</i> clusters C3, C4, C5	a	a	b	b	a	a	a	a	b		
<u>Order Enterobacteriales (5/7)</u>												
Kleb1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	c	bc	c	c	bc	a	ab	bc	abc	0.67	$3 \times 10^{-3}$
Pagg5	<i>Pantoea agglomerans</i>	b	b	b	b	b	a	a	b	b	0.79	$2 \times 10^{-4}$
Pagg6	<i>Pantoea agglomerans</i>	b	b	b	b	b	a	a	b	b	0.77	$3 \times 10^{-4}$
Ptol1	<i>Pantoea toletana</i>	b	b	ab	b	b	a	ab	b	b	0.55	$2 \times 10^{-2}$
Pho1	<i>Photorhabdus</i>	d	d	d	d	cd	a	abc	bcd	ab	0.77	$3 \times 10^{-4}$
<u>Order Methylococcales (0/1)</u>												
Metsar5	<i>Methylosarcina quisquillarum</i> and <i>M. fibrata</i>	d	cd	b	bc	ab	ab	ab	ab	a		
<u>Order Xanthomonadales (1/4)</u>												
XAN818	<i>Xanthomonas</i>	a	a	bc	c	abc	bc	ab	abc	c		
Xancam	<i>Xanthomonas campestris</i>	bcd	cd	d	d	abcd	ab	a	abc	d	0.80	$1 \times 10^{-4}$
<u>Order Chromatiales (1/2)</u>												
Nitmob	<i>Nitrosococcus mobilis</i>	d	bcd	cd	abcd	ab	abc	ab	abc	a	0.52	$3 \times 10^{-2}$

Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques

<b>Class Deltaproteobacteria (6/22)</b>												
<u>Order Myxococcales (6/18)</u>												
CystbSUB1	<i>Cystobacterineae</i>									0.54	$2 \times 10^{-2}$	
Halian2	<i>Haliangium</i>	bc	c	c	c	ab	a	ab	ab	a	0.70	$2 \times 10^{-3}$
Halian3	<i>Haliangium</i>	c	b	bc	bc	bc	bc	bc	bc	a		
Halian5	<i>Haliangium</i>	bc	ab	bc	bc	abc	bc	c	abc	a		
StigMyx9	<i>Stigmatella</i>	b	b	b	b	b	b	b	b	a		
Anmxb5	<i>Anaeromyxobacter</i>	c	bc	ab	c	ab	a	a	a	a	0.56	$2 \times 10^{-2}$
Anmxb6	<i>Anaeromyxobacter</i>	d	d	cd	d	bcd	ab	abc	bcd	a	0.74	$7 \times 10^{-4}$
un4Chon4	Uncultured <i>Chondromyces</i>	bcd	a	cd	bcd	abc	abc	ab	d	cd		
un43Chon8	Uncultured <i>Chondromyces</i>	b	b	b	b	ab	b	b	b	a		
un43Chon10	Uncultured <i>Chondromyces</i>	e	cde	bcd	de	abc	ab	ab	ab	a	0.64	$6 \times 10^{-3}$
Polyang10	<i>Polyangium</i>	cd	bcd	bcd	b	d	ab	bcd	bc	a		
MyxCor1	<i>Myxococcus</i> and <i>Corallocooccus</i>	cd	ab	abc	ab	bcd	cd	d	d	a		
Nancs7	<i>Nannocystis</i>	c	ab	ab	bc	c	bc	bc	c	a	0.63	$6 \times 10^{-3}$
Nancs8	<i>Nannocystis</i>	d	bc	bcd	cd	cd	abc	ab	abc	a		
<u>Order Syntrophobacterales (0/1)</u>												
TDRNO1030	<i>Thermodesulforhabdus norvegica</i>	bc	cd	cd	d	abc	ab	ab	ab	a		
<b>Class Epsilonproteobacteria (3/5)</b>												
Alvi2	Unidentified <i>Epsilonproteobacteria</i> affiliated to <i>Alvinella</i>	cd	cd	d	d	bcd	ab	a	bc	abc	0.89	$2 \times 10^{-6}$
<u>Order Campylobacterales (2/3)</u>												
Campy	<i>Campylobacter</i>	e	de	bc	b	cd	cd	bc	cd	a		
HeliFel1	<i>Helicobacter heilmanni</i> cluster (including <i>H. felis</i> )	d	d	d	d	cd	bc	ab	bcd	a	0.62	$1 \times 10^{-8}$
Wolin2	<i>Wolinella succinogenes</i>										0.86	$1 \times 10^{-5}$
<b>Phylum Firmicutes (14/41)</b>												
LGC354A	<i>Firmicutes</i> (excepted <i>Clostridia</i> , and some <i>Lactobacillales</i> )										0.67	$3 \times 10^{-3}$
<u>Order Bacillales (9/32)</u>												
Bacil1	<i>Bacillus</i>	b	b	b	b	a	ab	b	b	b		
Bacisp	<i>Bacillus</i>	cd	d	bcd	d	bc	ab	bcd	b	a		
Baccir1	<i>Bacillus circulans</i>	d	d	cd	d	ab	bc	bc	ab	a		
Baccir3	<i>Bacillus circulans</i>	de	e	bcd	cde	b	bc	bcd	b	a		

Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques

Bacpich2	<i>Bacillus pichinoty</i>	b	b	b	b	b	b	a	b	b	0.68	$3 \times 10^{-3}$
Bacpich3	<i>Bacillus pichinoty</i>	b	b	b	b	b	b	a	b	b	0.78	$2 \times 10^{-4}$
Baccer2	<i>Bacillus cereus</i> and related cluster	c	c	c	c	a	c	c	bc	ab		
Baccer7	<i>Bacillus cereus</i> and related cluster	bc	c	c	c	a	bc	bc	bc	b		
Bac10	Some <i>Bacillus cereus</i> and <i>B. thuringiensis</i>	b	b	b	b	a	b	b	b	b		
Bacjeo6	<i>Bacillus jeotgali</i>	b	b	b	b	b	b	a	b	b	0.68	$3 \times 10^{-3}$
Bacpsf1	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	ab	b	b	b	b	a	b	a	ab		
Bacfor1	<i>Bacillus fortis</i> and related cluster	b	b	b	b	b	a	a	b	b	0.85	$2 \times 10^{-5}$
Bacfara2	<i>Bacillus fortis</i> and related cluster										0.86	$1 \times 10^{-5}$
Bacved_3	<i>Bacillus vedderi</i>	c	c	c	c	c	a	ab	bc	c	0.83	$4 \times 10^{-5}$
Behi1	<i>Bacillus ehimensis</i> (within <i>Paenibacillus koreensis</i> cluster)	b	b	b	b	b	b	b	a	b		
Paen5	<i>Paenibacillus</i>	ab	de	bcd	cde	abc	bcd	a	cde	e		
Paen6	<i>Paenibacillus</i>	a	bcd	ab	cd	ab	ab	a	bc	d		
Palv	<i>Paenibacillus alvei</i>										0.63	$7 \times 10^{-3}$
PalgiG1	<i>Paenibacillus alginoliticus</i> and related cluster	a	bc	bc	bc	abc	c	a	ab	bc		
PalgiG3	<i>Paenibacillus alginoliticus</i> and related cluster	ab	d	bcd	cd	bc	cd	a	bc	cd		
Paeni4.2	<i>Paenibacillus popolliae</i> and related cluster (including <i>P. lentimorbus</i> , <i>P. thiaminolyticus</i> )	c	c	c	c	b	b	a	c	c	0.86	$8 \times 10^{-6}$
Pvalnaf	<i>Paenibacillus validus</i> , <i>Paenibacillus naphthalenovorans</i>	b	b	b	b	b	a	b	b	ab		
Pbo2	<i>Paenibacillus borealis</i>	b	b	b	b	b	b	a	b	b	0.82	$5 \times 10^{-5}$
<u>Order Selenomonadales (3/4)</u>												
Diali3	<i>Dialister</i>	c	c	c	c	bc	ab	bc	ab	a	0.69	$2 \times 10^{-3}$
Diali14	<i>Dialister</i>	b	b	b	b	b	a	b	b	b	0.71	$1 \times 10^{-3}$
Mega4	<i>Megasphaera</i>	b	b	b	b	b	a	b	b	b		
Mega8	<i>Megasphaera</i>										0.87	$7 \times 10^{-6}$
<u>Order Thermoanaerobacterales (0/1)</u>												
Tab993	<i>Thermoanaerobacter</i>	de	e	cd	bc	ab	bc	bcd	b	a		
<u>Order Clostridiales (1/1)</u>												
Mogi12	<i>Mogibacterium</i>										0.90	$7 \times 10^{-7}$
<u>Order Lactobacillales (0/1)</u>												
Lacto39	<i>Lactobacillus</i>	c	bc	bc	bc	bc	abc	bc	ab	a		
<b>Phylum Acidobacteria (0/5)</b>												

Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques

Acido.a	Uncultured <i>Acidobacteria</i> (Acidobacteria_6 cluster)	bc	bc	bc	c	ab	bc	abc	bc	a		
Acido.c	Uncultured <i>Acidobacteria</i> (Acidobacteria_4 cluster)	bc	bc	bc	a	b	c	c	ab	a		
AcidoUnc3	Uncultured <i>Acidobacteria</i> (Acidobacteria_4 cluster)	d	d	d	cd	bc	bc	bcd	b	a		
AcidUnc	Uncultured <i>Acidobacteria</i> (Acidobacteria_6 cluster)	cd	cd	cd	cd	bc	d	bc	ab	a		
<b>Phylum Actinobacteria (10/38)</b>												
HGC236-m	Most <i>Actinobacteria</i>										0.52	$3 \times 10^{-2}$
<u>Order Actinomycetales (8/35)</u>												
ActiD2	<i>Actinomyces</i>	b	b	b	b	b	a	ab	b	b	0.80	$1 \times 10^{-4}$
Agro.clustA3	<i>Agromyces</i>	abc	a	ab	bcde	abcd	e	cde	abcd	de		
Agm4	<i>Agromyces</i>										0.68	$3 \times 10^{-3}$
Actino1	<i>Streptosporangineae</i>	a	ab	a	bc	a	abc	abc	ab	c		
Cornba8	<i>Corynebacterium</i>	b	b	b	b	b	a	a	b	b	0.86	$1 \times 10^{-5}$
Frank16	<i>Frankia</i>	a	ab	a	bc	a	ab	a	ab	c		
Glyc3	<i>Glycomyces</i>										0.68	$3 \times 10^{-3}$
Kocur10	<i>Kocuria</i>										0.90	$1 \times 10^{-6}$
Mob4	<i>Mobiluncus</i>	b	b	b	b	b	a	b	b	b		
Mycoba2	<i>Mycobacterium</i>	ab	a	abc	bc	ab	abc	ab	a	c		
NocardioA5	<i>Nocardioides</i>	ab	abc	a	abc	abc	c	c	bc	c		
NocardioB2	<i>Nocardioides</i>	b	b	b	b	b	b	b	b	a		
Nono1	<i>Nonomuraea</i>										0.52	$3 \times 10^{-2}$
Propio1	<i>Propionibacterium</i>	c	c	c	c	bc	ab	a	c	c	0.90	$9 \times 10^{-7}$
Rhodrub	<i>Rhodococcus</i>	b	b	b	b	b	a	b	b	b	0.57	$2 \times 10^{-2}$
Sacchps10	<i>Saccharopolyspora</i>	ab	bc	ab	c	ab	a	a	ab	ab		
StreptomycesD7	<i>Streptomyces</i>	c	c	a	c	abc	ab	bc	abc	ab		
StspSUB1	<i>Streptosporangineae</i>	cd	bc	a	ab	cde	cde	e	de	bc		
<u>Order Coriobacteriales (1/2)</u>												
Collin29	<i>Collinsella</i>	a	ab	ab	ab	abc	c	bc	abc	c	0.87	$6 \times 10^{-6}$
<b>Phylum Chloroflexi (0/1)</b>												
CFX109	Most <i>Chloroflexi</i>	abcd	abc	a	abcd	bcd	d	cd	abc	ab		
<b>Phylum Cyanobacteria (1/5)</b>												
CYA361	Most <i>Cyanobacteria</i> and <i>Chloroplast</i>	a	bc	c	c	c	b	c	b	c		
Gloe2	<i>Chlorogloeopsis</i>	a	a	ab	bc	abc	ab	ab	a	c		
Lyng2	<i>Lyngbya</i>	bcd	bcd	cd	bcd	bc	d	bcd	b	a		
Micys3	<i>Microcystis</i>	b	b	b	b	b	a	b	b	b		



Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques

Prochlo1	<i>Prochlorothrix</i>	d	cd	cd	d	bc	a	a	ab	ab	0.89	$1 \times 10^{-6}$
<b>Phylum Nitrospira (0/2)</b>												
NSR826	<i>Nitrospira</i>	e	de	cde	bcd	bc	bcd	bcd	b	a		
NSR1156	<i>Nitrospira</i>	d	cd	b	b	bc	bc	bc	b	a		
<b>Phylum Tenericutes (1/2)</b>												
Spiroplas4	<i>Spiroplasma</i>	bc	c	bc	c	ab	ab	a	a	ab	0.66	$4 \times 10^{-3}$
Spiroplas15	<i>Spiroplasma</i>	a	cd	cd	d	d	bc	d	ab	d		
<b>Phylum Bacteroidetes (3/8)</b>												
CFB562B	Most <i>Bacteroidales</i> (excepted <i>Porphyromonas</i> and related)	ab	cd	cd	cd	c	bc	c	a	d		
CFB562C	Few <i>Bacteroidetes</i>	ab	bc	c	bc	bc	ab	a	bc	bc		
<u>Order Bacteroidales (1/1)</u>												
Rik6	<i>Rikenella</i>	c	c	c	c	bc	a	ab	a	a	0.85	$1 \times 10^{-5}$
<u>Order Cytophagales (2/2)</u>												
Spiro5	<i>Spirosoma</i>	c	c	c	c	c	ab	bc	c	a	0.67	$3 \times 10^{-3}$
Hyme3	<i>Hymenobacter</i>	b	b	b	b	b	a	ab	ab	b	0.79	$2 \times 10^{-4}$
<u>Order Flavobacteriales (0/2)</u>												
Flavo2	<i>Flavobacterium columnare</i>	c	bc	ab	c	abc	a	ab	a	a		
<b>Phylum OP 11 (0/2)</b>												
OP11.5	Uncultured eubacteria WCHB1 (OP11 division)	bc	c	ab	bc	ab	a	ab	ab	ab		
<b>Phylum Deferribacteres (1/2)</b>												
OP2.1	Candidate phylum OP2	c	c	c	c	c	a	ab	bc	bc	0.78	$2 \times 10^{-4}$
<b>Phylum Planctomycetes (3/8)</b>												
EUB338II	Most <i>Planctomycetes</i>	e	cde	de	b	bcd	bc	bcd	bcd	a		
Plancto4.mA	Most <i>Planctomycetes</i>	ab	cd	d	bcd	bc	d	d	ab	a		
Plancto4.mB	Most <i>Planctomycetes</i>	d	cd	cd	cd	bc	bcd	cd	ab	a		
Plancto9	<i>Gemmata</i> cluster	ab	ab	bc	ab	ab	c	c	ab	a	0.70	$2 \times 10^{-3}$
Plancto12	<i>Gemmata</i> cluster	bc	b	bc	ab	b	cd	d	b	a	0.70	$2 \times 10^{-3}$
Plancto16	Some <i>Pirrellula</i>	d	d	d	d	cd	bc	cd	ab	a	0.76	$4 \times 10^{-4}$

Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques

PLA46	<i>Planctomycetes, Lentipshaerae</i> and OP3 candidate phylum	bcd	bcd	d	ab	bc	d	cd	ab	a
<b>Phylum Verrucomicrobia (0/2)</b>										
Verru4	Some <i>Verrucomicrobia</i> and <i>Prostheco bacter</i>	a	a	b	b	a	a	ab	b	b
<b><i>Deinococcus-Thermus</i> (0/1)</b>										
Thus.0438	<i>Thermus</i>	b	b	b	b	b	a	b	b	b

\* Treatments were compared using ANOVA and Fisher's LSD tests ( $P < 0.05$ ), and results are indicated using letters (a-e).

\*\* Correlation between plant evolution and probes intensity was tested using Pearson correlation coefficient  $r$  and probability.

\*\*\* For each Order, Class or Phylum targeted by probes, the number of probes giving a statistically-significant correlation to Poaceae evolution ( $P < 0.05$ ) among hybridized probes is indicated in parenthesis.

## **References**

- Aloni, R. & Griffith, M. (1991). Functional xylem anatomy in root-shoot junctions of six cereal species. *Planta*, 184, 123-129.
- Ammar, E.-D., Tsai, C.-W., Whitfield, A.E., Redinbaugh, M.G. & Hogenhout, S.A. (2009). Cellular and molecular aspects of *Rhabdovirus* interactions with insect and plant hosts. *Annual Review of Entomology*, 54, 447-468.
- 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*, 57, 233-266.
- Baudoin, E., Benizri, E. & Guckert, A. (2003). Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1183-1192.
- Baudoin, E., Nazaret, S., Mougel, C., Ranjard, L. & Moëgne-Loccoz, Y. (2009). Impact of inoculation with the phyto-stimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 409-413.
- Becerra, A., Cabello, M. & Chiarini, F. (2007). Arbuscular mycorrhizal colonization of vascular plants from the Yungas forests, Argentina. *Annals of Forest Science*, 64, 8.
- Bertin, C., Yang, X. & Weston, L.A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 256, 67-83.
- Bouchenak-Khelladi, Y., Salamin, N., Savolainen, V., Forest, F., Bank, M. van der, Chase, M.W., *et al.* (2008). Large multi-gene phylogenetic trees of the grasses (*Poaceae*): Progress towards complete tribal and generic level sampling. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47, 488-505.
- Bouffaud, M.-L., Kyselkova, M., Gouesnard, B., Grundmann, G., Muller, D. & Moëgne-Loccoz, Y. (2012) Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots ? *Molecular Ecology*, 21, 195-206.
- Bray, J.R. & Curtis, J.T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27, 325-349.
- Brown, J. & Tellier, A. (2011). Host-Parasite Coevolution. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 345-367.

*Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques*

- Bruce, K.D., Hiorns, W.D., Hobman, J.L., Osborn, A.M., Strike, P. & Ritchie, D.A. (1992). Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3413-3416.
- Burgmann, H., Widmer, F., Sigler, W.V. & Zeyer, J. (2003). mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1928.
- Camus-Kulandaivelu, L., Veyrieras, J.-B., Madur, D., Combes, V., Fourmann, M., Barraud, S., *et al.* (2006). Maize adaptation to temperate climate: Relationship between population structure and polymorphism in the Dwarf8 gene. *Genetics*, 172, 2449-2463.
- Chen, X., Li, S. & Aksoy, S. (1999). Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: Molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *Journal of Molecular Evolution*, 48, 49-58.
- Comas, L.H. & Eissenstat, D.M. (2009). Patterns in root trait variation among 25 co-existing North American forest species. *New Phytologist*, 182, 919-928.
- Corral, J.A., Puga, N.D., González, J.J., Parra, J.R., Eguiarte, D.R., Holland, J.B., *et al.* (2008). Climatic adaptation and ecological descriptors of 42 Mexican maize races. *Crop science*, 48, 1502-1512.
- Czarnota, M.A., Rimando, A.M. & Weston, L.A. (2003). Evaluation of root exudates of seven sorghum accessions. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 2073-2083.
- DeAngelis, K.M., Brodie, E.L., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Lindow, S.E. & Firestone, M.K. (2008). Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. *ISME Journal*, 3, 168-178.
- Doebley, J. (2004). The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics*, 38, 37-59.
- de Dorlodot, S., Forster, B., Pagès, L., Price, A., Tuberosa, R. & Draye, X. (2007). Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in Plant Science*, 12, 474-481.
- Dubcovsky, J. & Dvorak, J. (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316, 1862 -1866.
- Dubreuil, P., Warburton, M., Chastanet, M., Hoisington, D. & Charcosset, A. (2006). More on the introduction of temperate maize into Europe: large-scale bulk SSR genotyping and new historical elements. *Maydica*, 51, 281-291.

*Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques*

- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. & Böttger, E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17, 7843-7853.
- Fan, T.W., Lane, A.N., Shenker, M., Bartley, J.P., Crowley, D. & Higashi, R.M. (2001). Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS. *Phytochemistry*, 57, 209–221.
- Gomes, N.C.M., Heuer, H., Schönfeld, J., Costa, R., Mendonça-Hagler, L. & Smalla, K. (2001). Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*, 232, 167-180.
- Hardoim, P.R., Andreote, F.D., Reinhold-Hurek, B., Sessitsch, A., van Overbeek, L.S. & van Elsas, J.D. (2011). Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS Microbiology Ecology*, 77, 154-164.
- Hausner, G., Olson, R., Simon, D., Johnson, I., Sanders, E.R., Karol, K.G., *et al.* (2006). Origin and evolution of the chloroplast *trnK* (*matK*) intron: A model for evolution of group II intron RNA structures. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 380 -391.
- Heath, K.D. (2008). The coevolutionary genetics of plant–microbe interactions. *New Phytologist*, 180, 268-270.
- Hodge, C.D., Wang, H. & Sun, G. (2010). Phylogenetic analysis of the maternal genome of tetraploid StStYY *Elymus* (*Triticeae*: *Poaceae*) species and the monogenomic *Triticeae* based on rps16 sequence data. *Plant Science*, 178, 463-468.
- Johnston-Monje, D. & Raizada, M.N. (2011). Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS ONE*, 6, e20396.
- Kielak, A., Pijl, A.S., van Veen, J.A. & Kowalchuk, G.A. (2008). Phylogenetic diversity of *Acidobacteria* in a former agricultural soil. *ISME Journal*, 3, 378-382.
- Kinkel, L.L., Bakker, M.G. & Schlatter, D.C. (2011). A coevolutionary framework for managing disease-suppressive soils. *Annual Review of Phytopathology*, 49,47-67.
- Kumar, A., Prakash, A. & Johri, B.N. (2011). *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. Dans: *Bacteria in agrobiologie: Crop Ecosystems* (éd. Maheshwari, D.K.). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p. 37-59.
- Kyselkova, M., Kopecky, J., Frapolli, M., Defago, G., Sagova-Mareckova, M., Grundmann, G.L., *et al.* (2009a). Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. *ISME Journal*, 3, 1127-1138.

*Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques*

- Kyselkova, M., Kopecky, J., Frapolli, M., Defago, G., Sagova-Mareckova, M., Grundmann, G.L., *et al.* (2009b). Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. *ISME Journal*, 3, 1127-1138.
- Lambers, H., Mougel, C., Jaillard, B. & Hinsinger, P. (2009). Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil*, 321, 83-115.
- Lambert, J.B., Heckenbach, E.A., Wu, Y. & Santiago-Blay, J.A. (2010). Characterization of plant exudates by principal-component and cluster analyses with nuclear magnetic resonance variables. *Journal of Natural Products*, 73, 1643-1648.
- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R. & Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5111-5120.
- Lee, M.-M. & Stock, S.P. (2010). A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp. ([gamma]-Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104, 67-74.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., *et al.* (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320, 1647 -1651.
- Ma, W.K., Bedard-Haughn, A., Siciliano, S.D. & Farrell, R.E. (2008). Relationship between nitrifier and denitrifier community composition and abundance in predicting nitrous oxide emissions from ephemeral wetland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1114-1123.
- Marschner, P., Yang, C.-H., Lieberei, R. & Crowley, D.E. (2001). Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1437-1445.
- Micallef, S.A., Shiaris, M.P. & Colon-Carmona, A. (2009). Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *Journal of Experimental Botany*, erp053.
- Moran, N.A., McCutcheon, J.P. & Nakabachi, A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual review of genetics*, 42, 165–190.
- Nakamoto, T. & Oyanagi, A. (1996). The configuration of the seminal roots of *Triticum aestivum* L. (*Poaceae*). *Journal of Plant Research*, 109, 375-380.

*Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques*

- van Overbeek, L. & van Elsas, J.D. (2008). Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 64, 283-296.
- Parker, M.A. & Spoerke, J.M. (1998). Geographic structure of lineage associations in a plant-bacterial mutualism. *Journal of Evolutionary Biology*, 11, 549-562.
- Peterson, P.M., Romaschenko, K. & Johnson, G. (2010). A classification of the *Chloridoideae* (*Poaceae*) based on multi-gene phylogenetic trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 580-598.
- Provorov, N.A. & Vorobyov, N.I. (2009). Host plant as an organizer of microbial evolution in the beneficial symbioses. *Phytochemistry Review*, 8, 519-534.
- Purugganan, M.D. & Fuller, D.Q. (2009). The nature of selection during plant domestication. *Nature*, 457, 843-848.
- Putten, W.H., Bardgett, R.D., Ruiters, P.C., Hol, W.H.G., Meyer, K.M., Bezemer, T.M., *et al.* (2009). Empirical and theoretical challenges in aboveground–belowground ecology. *Oecologia*, 161, 1-14.
- Rasche, F., Trondl, R., Naglreiter, C., Reichenauer, T.G. & Sessitsch, A. (2006). Chilling and cultivar type affect the diversity of bacterial endophytes colonizing sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 1036-1045.
- Reeve, J.R., Schadt, C.W., Carpenter-Boggs, L., Kang, S., Zhou, J. & Reganold, J.P. (2010). Effects of soil type and farm management on soil ecological functional genes and microbial activities. *ISME Journal*, 4, 1099-1107.
- Reichenbach, H. (1999). The ecology of the *Myxobacteria*. *Environmental Microbiology*, 1, 15-21.
- Sanguin, H., Kroneisen, L., Gazengel, K., Kyselková, M., Remenant, B., Prigent-Combaret, C., *et al.* (2008). Development of a 16S rRNA microarray approach for the monitoring of rhizosphere *Pseudomonas* populations associated with the decline of take-all disease of wheat. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1028-1039.
- Sanguin, H., Remenant, B., Dechesne, A., Thioulouse, J., Vogel, T.M., Nesme, X., *et al.* (2006). Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4302-4312.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E. & Small, R.L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94, 275-288.

*Partie exp. 2 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries rhizosphériques*

- Singh, V., Oosterom, E.J., Jordan, D.R., Messina, C.D., Cooper, M. & Hammer, G.L. (2010). Morphological and architectural development of root systems in sorghum and maize. *Plant and Soil*, 333, 287-299.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., *et al.* (2001). Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4742-4751.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Doledec, S. & Olivier, J.M. (1997). ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and computing*, 7, 75–83.
- Thompson, J.N. (2010). Four central points about coevolution. *Evolution Education and Outreach*, 3, 7-13.
- Uga, Y., Ebana, K., Abe, J., Morita, S., Okuno, K. & Yano, M. (2009). Variation in root morphology and anatomy among accessions of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) with different genetic backgrounds. *Breeding Science*, 59, 87-93.
- Voges, M., Bachmann, V., Kammerer, R., Gophna, U. & Hauck, C. (2010). CEACAM1 recognition by bacterial pathogens is species-specific. *BMC Microbiology*, 10, 117.
- Wieland, G., Neumann, R. & Backhaus, H. (2001). Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5849-5854.





---

## Partie expérimentale 3

Influence de l'évolution des céréales  
(*Poaceae*) sur un groupe fonctionnel  
phytobénéfique

---

## Introduction

Les plantes, par l'intermédiaire de leurs exsudats racinaires, peuvent influencer la totalité de la communauté bactérienne du sol (Bais *et al.* 2006 ; Berg et Smalla 2009), et ce de façon différente selon le génotype de plante. Les communautés rhizobactériennes vont en retour influencer la croissance et/ou la santé de la plante (Lugtenberg et Kamilova 2009 ; Raaijmakers *et al.* 2009). En effet, le sol comprend des populations de bactéries pathogènes et des populations phyto-bénéfiques. Nous avons observé une corrélation entre les distances phylogénétiques entre plantes et la composition taxonomique de la communauté rhizobactérienne associée, mais ceci nous donne peu d'information sur le fonctionnement de cette communauté, ou de groupes fonctionnels particuliers comme ceux des microorganismes pathogènes ou bénéfiques. Nous avons donc testé l'hypothèse d'une influence de l'histoire évolutive végétale sur une population fonctionnelle de bactéries phyto-bénéfiques. Une fonction est largement présente parmi cette dernière catégorie de bactéries, et a un rôle direct dans la croissance des plantes en améliorant leur nutrition azotée, le groupe fonctionnel des bactéries fixatrices d'azote (Herridge *et al.* 2008). Ce groupe fonctionnel a été largement étudié à travers le gène *nifH* depuis quelques années en termes de taille, de diversité, ou d'expression du gène, mais jamais dans un contexte d'histoire évolutive des plantes (Coelho *et al.* 2009; Prakamhang *et al.* 2009; Castro-González *et al.* 2011; Turk *et al.* 2011). Il comprend des bactéries (i) appartenant à des taxons très divers (protéobactéries, cyanobactéries, firmicutes, actinobactéries), et (ii) ayant des modes de vie différents (libre ou symbiotique) (Widmer *et al.* 1999 ; Zehr *et al.* 2003).

Dans cette partie expérimentale, l'influence de l'histoire évolutive des poacées sur le groupe fonctionnel des bactéries fixatrices d'azote a été déterminée en utilisant les mêmes traitements et échantillons que dans l'expérience précédente, décrite dans la partie expérimentale 2. Un protocole de PCR quantitative ciblant le gène *nifH* ou son transcrite a été mis au point pour caractériser les bactéries diazotrophes en termes d'effectif (nombre de bactéries *nifH*<sup>+</sup>) et d'expression génique (quantité de transcrits de *nifH*). De plus, la diversité du groupe fonctionnel et celle du sous-groupe des bactéries exprimant le gène *nifH* ont été étudiées par T-RFLP.

Les résultats montrent de faibles différences entre les différents génotypes en ce qui concerne la taille de la communauté fonctionnelle ou son niveau de transcription de *nifH*, y compris pour les espèces les plus éloignées phylogénétiquement. Des différences plus

importantes sont mises en évidence au niveau de la diversité de ces populations. Cependant, la comparaison des distances phylogénétiques indique que l'histoire évolutive des poacées n'est pas un facteur significatif influençant le groupe fonctionnel des bactéries fixatrices d'azote. L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'un manuscrit qui sera soumis à une revue scientifique.

Une expérience complémentaire a été effectuée, afin de déterminer si l'âge de la plante avait une influence sur la taille de la communauté diazotrophe dans la rhizosphère. Pour cela, nous avons cultivé deux lignées de maïs et effectué une cinétique de l'effectif de la communauté sur les échantillons de rhizosphère, en effectuant 9 points de prélèvement entre 0 et 42 jours après semis des graines. Les résultats nous montrent peu de variation de la taille de la communauté des bactéries fixatrices d'azote dans le temps. Ces données complémentaires sont présentées à la fin du chapitre.

**Did plant evolutionary history shaped diazotroph diversity and *nifH* expression in the rhizosphere ?**

Marie-Lara Bouffaud<sup>1,2,3</sup>, Yvan Moënne-Loccoz<sup>1,2,3</sup>, and Daniel Muller<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> *Université de Lyon, F-69622, Lyon, France*

<sup>2</sup> *Université Lyon 1, Villeurbanne, France*

<sup>3</sup> *CNRS, UMR5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, France*

\*Correspondence: Daniel Muller, Fax: +33 472 43 12 23; E-mail: daniel.muller@univ-lyon1.fr

## **Abstract**

Plant evolutionary history influences the taxonomic composition of the root-associated bacterial community, but whether it can also modulate its contribution to rhizosphere functioning is unknown. Using the functional group of nitrogen-fixing bacteria colonizing Poaceae roots, we tested the hypothesis that plant traits resulting from crop diversification were a significant factor determining the ecology of the diazotrophic (*nifH*) community in the rhizosphere. A greenhouse experiment was carried out in cultivated soil with a range of Poaceae, i.e four cultivated *Zea mays* varieties (from two maize genetic groups) and teosinte (representing maize's ancestor), sorghum (from the same *Panicoideae* subfamily), and wheat (from neighboring *Pooideae* subfamily), as well as the dicot tomato as external reference. Diazotroph rhizosphere community was characterized at 21 days in terms of size (quantitative PCR of *nifH* genes), composition (T-RFLP and partial sequencing of *nifH* genes) and functioning (quantitative PCR and T-RFLP of *nifH* transcripts). Plant species and varieties had a significant effect on diazotroph community size, number of *nifH* transcripts (when considered at entire root system scale), and this was strengthened by findings obtained (for a subset of plant genotypes) when using soil from a neighboring plot under meadow management or the same soil but at a later sampling. However, no significant correlation was found between Poaceae phylogeny and size, *nifH* expression or genetic diversity of the rhizosphere diazotroph community.

## **Introduction**

Nitrogen is essential for plant growth and health. However, it is not always bioavailable in soil, as most nitrogen is present as  $N_2$  in soil porosity or as part of organic compounds. Some prokaryotes (termed diazotrophs) can facilitate plant nitrogen nutrition through biological nitrogen fixation (BNF), which corresponds to the reduction of atmospheric nitrogen ( $N_2$ ) to ammonia ( $NH_3$ ). This occurs in agricultural as well as in natural environments, and amounts to 120 million tons of N per year fixed annually on earth (Herridge *et al.* 2008). BNF is only performed by certain bacterial and archeal taxa, and all rely on the *nifH* gene encoding the iron protein subunit of the nitrogenase, a gene widely used as marker to examine nitrogen fixation in various environments (Coelho *et al.* 2009; Prakamhang *et al.* 2009). This gene is highly conserved among diazotrophs, and its phylogeny is largely correlated to 16S rRNA phylogeny (Zehr *et al.* 2003), making it a marker suitable to assess complex diazotrophic communities.

In terrestrial systems, diazotrophic community size and/or composition can vary according to soil type (Prakamhang *et al.* 2009), soil management (Poly *et al.* 2001), fertilization rate (Coelho *et al.* 2009; Wu *et al.* 2009a), and plants, in terms of plant or presence/absence (Coelho *et al.* 2009; Junier *et al.* 2009; Monteiro *et al.* 2011), plant growth stage (Prakamhang *et al.* 2009; Monteiro *et al.* 2011), plant species (Perin *et al.* 2006) or plant varieties (Coelho *et al.* 2009; Wu *et al.* 2009b). Some of these factors may also influence the composition of the bacterial community actually expressing *nifH* and/or the amount of *nifH* transcripts, even if the latter does not necessarily vary to a large extent (Knauth *et al.* 2005; Wartainen *et al.* 2008; Mårtensson *et al.* 2009; Orr *et al.* 2011).

Differences in root-associated nitrogen-fixing bacterial communities between plant genotypes may involve differences in root system development (de Dorlodot *et al.* 2007) and thus bacterial root-colonization sites, in nutrient uptake (Comas & Eissenstat 2009) and therefore rhizosphere depletion of minerals including nitrate and ammonium, and in root exudation patterns (Czarnota *et al.* 2003) and thus flux of carbon sources and energy available to support BNF. However, plant genetic properties accounting for these differences in plant phenotypes are not well understood, and those determining differences in root-associated functional microbial groups are even less understood. Evolutionary processes, whether corresponding to natural selection and/or human selection in agrosystems, have resulted in a wide range of plant genotypes on earth (Diamond 2002) and have had a strong influence on

root traits (Osmont *et al.* 2007; Comas & Eissenstat 2009; Uga *et al.* 2009; Lambert *et al.* 2010). Recently, it was shown that the evolutionary history of Poaceae grown in a same soil was a significant factor determining the taxonomic composition of the total rhizobacterial community (Bouffaud *et al.* submitted). This was also the case at the level of several bacterial genera containing nitrogen-fixing species or strains, raising the possibility that root-associated microbial functional groups, such as nitrogen-fixing bacteria, may also be influenced by the evolutionary history of Poaceae. On this basis, our hypothesis was that plant evolutionary history can be a significant factor influencing the interaction of microbial functional groups with roots.

The objective of this study was to assess whether a relation exists between Poaceae evolution and root-associated diazotroph community. To this end, we compared Poaceae both at infraspecific (four lines from two contrasted genetic groups of maize and one teosinte representing maize's pre-domestication ancestor) and interspecific levels (one sorghum from maize's *Panicoideae* subfamily, and one wheat from neighboring *Pooideae* subfamily) in a same soil under greenhouse conditions. A dicot (tomato) was also included as non-*Poaceae* control. The diazotroph community was characterized at 21 days in terms of size (*nifH* quantitative PCR), composition (*nifH* T-RFLP) and functioning (quantitative PCR, T-RFLP and partial sequencing of *nifH* transcripts). For selected treatments, the analyses were also carried out with better-established plants (i.e. at 42 days after sowing) as well as with 21-day-old plants grown in soil from a neighboring field (from the same pedon but under permanent meadow instead of maize monocropping), because in both cases rhizobacterial community structure and taxonomic composition differed (Bouffaud *et al.* submitted).



## **Materials and methods**

### Plant genotypes and greenhouse experiment

Plant genotypes included four cultivated maize (*Zea mays* L.), i.e. the inbred lines FV4, W85 (group Northern Flint), FV252 and Mo17 (group Corn Belt Dent) (provided by INRA, St Martin d'Hynx, France), one teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*; provided by UNAM, Cuernavaca, Mexico), one sorghum (*Sorghum bicolor* L. cv. Arprim; Semences de Provence, Fourques, France), one wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Fiorina; provided by AgroScope, Changins, Switzerland), and one tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Marmande; Vilmorin, La Méniltré, France) used as non-Poaceae, external reference.

Plants were grown in loamy topsoil (sieved at 6 mm) collected in September 2009 from two adjacent fields (luvisols) located at La Côte Saint-André near Lyon (France) and described in Bouffaud *et al.* (submitted). One is a maize-monocropping field (topsoil: clay 15.9%, silt 41.4%, sand 42.7%, organic matter 2.3%, pH (water) 7.3, N 1.6 g kg<sup>-1</sup>) and the other a permanent meadow (topsoil: clay 14.9%, silt 44.6%, sand 40.5%, organic matter 5.5%, pH (water) 6.0, N 3.2 g kg<sup>-1</sup>).

Seeds were surface-disinfected and sown in 3-dm<sup>3</sup> pots containing 2.5 kg soil (to obtain one seedling per pot), and the pots (including non-planted pots) were placed (randomized blocks; 5 pots per treatment) in a greenhouse, as described in Bouffaud *et al.* (submitted). Sampling was carried out at 21 days in cropped soil for each treatment. In addition, maize lines FV4 and W85 (group Northern Flint) and tomato were also sampled at 21 days in meadow soil and at 42 days in cropped soil. Each root system was dug up, shaken vigorously (to eliminate soil loosely adhering to the roots), frozen (along with closely-adhering soil) in liquid nitrogen and lyophilized. Root and rhizosphere soil were separated, and each stored at -20°C (giving 0.1-0.7 g root samples and 0.5-6 g rhizosphere soil samples per plant). In addition, bulk soil was sampled in non-planted pots, at 21 (both soils) and 42 days, frozen, lyophilized and stored at -20°C (giving 5 g samples).

### Extraction of soil DNA and RNA

Total nucleic acids were extracted from 0.5 g of lyophilized rhizosphere or bulk soil using a protocol derived from Burgmann *et al.* (2003). Briefly, 0.5 g rhizosphere or bulk soil, 0.5 g zirconium beads (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), 0.5 ml extraction buffer (5% hexadecyltrimethylammonium bromide, 1 mM 1,4-dithio-DL-threitol, in a 0.12 M phosphate

buffer [pH 8]) were processed in a bead beater (TissueLyser II Retsch; Qiagen, Courtaboeuf, France) for 90 s at 30 m s<sup>-1</sup>. After 10 min centrifugation at 16,000 g, supernatants were extracted two times with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (24:24:1 v/v/v), and then once with chloroform-isoamyl alcohol (24:1 v/v). Nucleic acids were precipitated overnight with potassium acetate (3 M, pH 4.8) and absolute ethanol at -20°C. After centrifugation 30 min at 16,000 g, pellets were washed with 70% ethanol, and dissolved in 100 µl RNase- and DNase-free water (giving 50-100 ng nucleic acids per µl).

#### *cDNA synthesis by reverse transcription*

To obtain DNA-free RNA, 20 µl of nucleic acid solution were digested at room temperature with 4 U of DNase I (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in 1× DNase I reaction buffer, and RNA was purified using RNeasy Mini kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. Another step of DNA digestion was performed using the protocol described above to remove remaining traces of DNA, and the reaction was stopped by incubating 10 min at 65°C in presence of 1 µl of 25 mM EDTA.

Reverse transcription (RT) was performed on 8 µl of the resulting purified RNA extract using Omniscript reverse transcription kit (Qiagen; following the manufacturer's instructions). The reaction was carried out 90 min at 37°C. Inactivated was done at 95°C (10 min) and cDNA was stored at -20°C. DNA contaminants were not present in any RNA sample based on analysis of reaction controls, which included the same concentration of RNA extract but did not receive reverse transcriptase.

#### *Quantitative PCR and quantitative RT-PCR*

The amounts of *nifH* genes and transcripts (from rhizosphere or bulk soil) were estimated by quantitative PCR (qPCR) and RT-PCR (qRT-PCR), after development of a real-time protocol based on the primers polF/polR (Poly *et al.* 2001; Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The reaction was carried out in 20 µl containing 4 µl of PCR grade water, 2 µl of each primer (final concentration 0.50 µM), 10 µl of LightCycler-DNA Master SYBR Green I master mix (Roche Applied Science, Meylan, France) and 2 µl of sample DNA or cDNA (in triplicate for each of five repetitions per treatment). The cycling program included 10 min incubation at 95°C, followed by 50 cycles of 95°C for 15 s, 64°C for 15 s and 72°C for 10 s. Amplification specificity was studied by melting curve analysis of the PCR (and RT-PCR) products, performed by ramping the temperature to 95°C for 10 s and back to 65°C for 15 s,

followed by increases of  $0.1^{\circ}\text{C s}^{-1}$  up to  $95^{\circ}\text{C}$ . Melting curve calculation and determination of  $T_m$  values were performed using the polynomial algorithm function of LightCycler Software v.1 (Roche Applied Science).

Genomic DNA from *Azospirillum lipoferum* 4B (whose genome contains one *nifH* copy) was used to generate standard curves, after dilution from  $5 \times 10^{-9}$  to  $5 \times 10^{-15}$  g DNA  $\mu\text{l}^{-1}$  (in triplicate). Sterile water was used as negative control. PCR efficiency was calculated from standard curves according to the equation  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ . The five samples for each rhizosphere or bulk soil treatment were analyzed. Results in g  $\mu\text{l}^{-1}$  were converted in number of *nifH* copies using the following formula (assuming an average of  $660 \text{ g mol}^{-1}$  per base pair): number of copies = [DNA (g)  $\times$  Avogadro's number (molecules  $\text{mol}^{-1}$ )] / [number of DNA base pairs in *nifH* fragment  $\times 660$  (g  $\text{mol}^{-1}$ )]. The resulting numbers were expressed (i) per g of root, (ii) per root system, and (iii) per g of soil.

#### T-RFLP analysis

For one replicate (individual plant or bulk soil sample) per treatment, *nifH* DNA and cDNA were amplified using forward primer polF (Poly *et al.* 2001) 5'-labeled with 6-FAM and reverse primer polR. PCR reaction was carried out in 50  $\mu\text{l}$  containing  $1\times$  buffer, 1  $\mu\text{M}$  of each primer (Invitrogen), 2.5 mM of  $\text{MgCl}_2$ , 1.75 U of Expand High Fidelity *Taq* polymerase (Roche Applied Science) and 2  $\mu\text{l}$  of DNA or cDNA template. An initial denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 2 min was followed by 30 cycles of 45 s denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s annealing at  $55^{\circ}\text{C}$  and 30 s extension at  $72^{\circ}\text{C}$ , followed by a final extension for 5 min. PCR products were purified using PCR purification kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). For T-RFLP, 500 ng of PCR product were digested using *HaeIII* (Fermentas, Villebon sur Yvette, France) 3 h at  $37^{\circ}\text{C}$  and separated on automated sequencer ABI 3730XL (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). The number of individual terminal restriction fragments (T-RFs) was determined using GeneMapper v4.1 software (Applied Biosystems), with a detection limit of 50 relative fluorescence units.

#### Statistics

All analyses were done at  $P < 0.05$ , using R 2.10.1 software (<http://www.r-project.org>). First, treatments were compared concerning numbers of *nifH* genes and transcripts, using ANOVA and Fisher's LSD tests, in each soil and at each sampling. Additionally, two-way ANOVA and Fisher's LSD tests ( $P < 0.05$ ) were performed to take

into account past soil management at 21 days (i.e. treatment × past soil management) and sampling time effects in cropped soil (i.e. treatment × sampling).

Second, for T-RFLP data, treatments were compared based on peak presence/absence, using (i) principal component analysis (PCA) based on the correlation matrix and the ADE4 package of R (Thioulouse *et al.* 1997), and (ii) clustering analysis based on Euclidean distance and complete linkage clustering. One replicate (individual plant or bulk soil sample) was studied per treatment. For W85 maize, all five replicates were assessed, with similar results.

Third, Pearson correlation analysis was performed between the phylogenetic distance between plants (Maximum Likelihood method, with the Kimura 2 parameter model, applied on three concatenated chloroplastic sequences i.e. gene *rps16* and the intergenic spacers *rps16-trnK* and *atpI-atpH*; Bouffaud *et al.* submitted) and their differences in *nifH* numbers (genes or transcripts), T-RFLP profiles (genes or transcripts), plant biomass (shoots or roots) or root-associated soil (i.e. rhizosphere soil), based on the Euclidean distance.

## **Results**

### Size of diazotroph communities

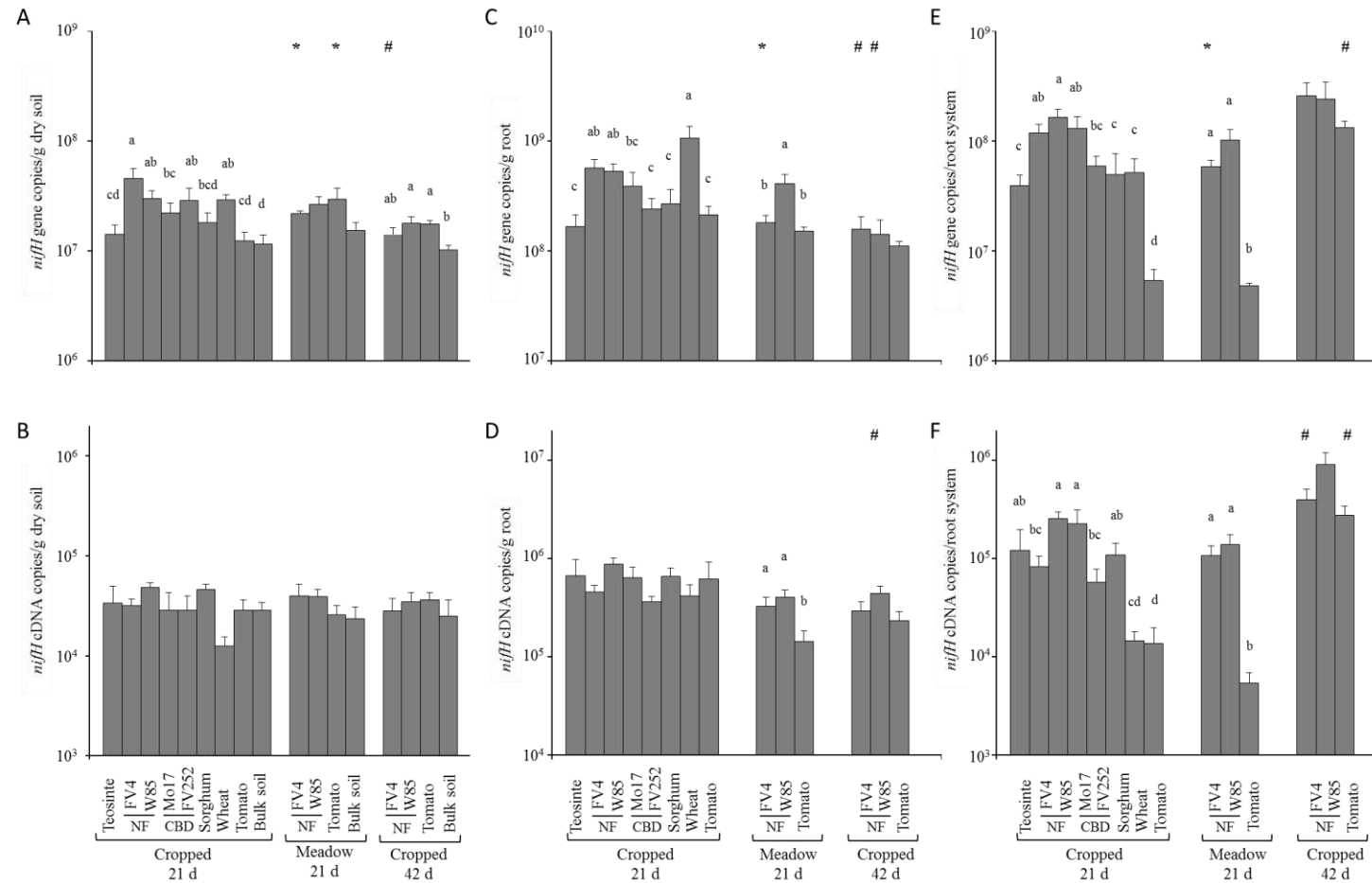
The total nitrogen-fixing bacterial community amounted to  $1.0-4.6 \times 10^7$  *nifH* gene copies per g of soil (Figure 1A), and for plant treatments it meant  $1.1-11.0 \times 10^8$  *nifH* copies per g of root (Figure 1C) or  $4.8-260 \times 10^8$  *nifH* copies per root system (Figure 1E). At 21 days in cropped soil, diazotroph community size per g of soil was higher in the presence of plant for all maize lines and for wheat (Figure 1A). This was also the case for 2 of 3 plant genotypes at 42 days in the same soil, whereas differences were not significant at 21 days in meadow soil.

When plant genotypes were compared at 21 days in cropped soil (Figure 1C), diazotroph community size per g of root for two maize lines, sorghum and tomato did not differ, whereas wheat and the two other maize lines gave higher levels. At 21 days, differences (but not the same as in cropped soil) between plant genotypes were also found in meadow soil, whereas these differences were not significant at 42 days in cropped soil.

Since root system development varied according to plant genotype (as well as sampling time and past soil management for FV4) (Figure S1A), diazotroph community size was also considered per root system. When doing so (Figure 1E), diazotroph community at 21 days in cropped soil did not differ in size for teosinte, wheat, sorghum, whereas its size was higher for W85 and Mo17 maize and lower for tomato. *nifH* copy number was also lower for tomato than for maize at 21 days in meadow soil, whereas differences were not significant at 42 days in cropped soil.

Overall, differences in diazotroph community size were found according to plant genotype, sampling time or past soil management. Even though differences occurred between plant genotypes, more closely related plant genotypes did not display a diazotroph community closer in size.

Partie exp. 3 : Influence de l'histoire évolutive des céréales sur les bactéries diazotrophes



**Figure 1** Quantification of *nifH* genes and transcripts in bulk soil and rhizosphere by real-time PCR and RT-PCR, respectively. Gene copy numbers are shown in A, C and E and transcript numbers in B, D and F. Statistical analyses were performed independently at 21 days in cropped soil, at 21 days in meadow soil and at 42 days in cropped soil, using ANOVA and Fisher LSD tests ( $P < 0.05$ ; results shown with letters a to c). For FV4, W85, tomato and bulk soil, two-way ANOVA and Fisher LSD tests ( $P < 0.05$ ) were performed to compare treatments according to past soil management or sampling time, and differences with the same genotype at 21 days in cropped soil are indicated by symbols \* and #, respectively.

*nifH* transcript levels in diazotroph communities

The number of *nifH* transcripts from the nitrogen-fixing bacterial community reached  $1.3\text{-}4.8 \times 10^4$  *nifH* cDNA copies per g of soil (Figure 1B), and for plant treatments it corresponded to  $1.4\text{-}8.9 \times 10^5$  *nifH* cDNA copies per g of root (Figure 1D) or  $5.4\text{-}910 \times 10^3$  *nifH* cDNA copies per root system (Figure 1F). At 21 days in cropped soil, the number of *nifH* transcripts per g of soil was similar in all treatments (Figure 1B). This was also the case in the same soil when considering the other sampling (42 days), or at 21 days in meadow soil.

When focusing on plant treatments and expressing data per g root, regardless of the amount of rhizosphere soil (Figure S1B), there was again no difference between genotypes in the number of *nifH* transcripts in cropped soil at 21 or at 42 days (Figure 1D). In meadow soil at 21 days, however, the number of *nifH* transcripts per g root was higher for the two maize lines than for tomato.

When integrating root system size, the number of *nifH* transcripts (i.e. expressed per root system) at 21 days in cropped soil was higher for W85 and Mo17 maize than for FV4 and FV252 maize, as well as wheat and tomato (Figure 1F). At 21 days in meadow soil, the number of *nifH* transcripts per root system was again higher for W85 maize than for tomato, but this time also FV4 maize gave higher values than tomato. There was no difference in cropped soil at 42 days, when tomato root system was larger.

Overall, differences in *nifH* transcript number were mainly found when comparing plant treatments in entire rhizospheres, but plant genotypes from the same maize group or species did not give values more similar than genotypes from different species did.

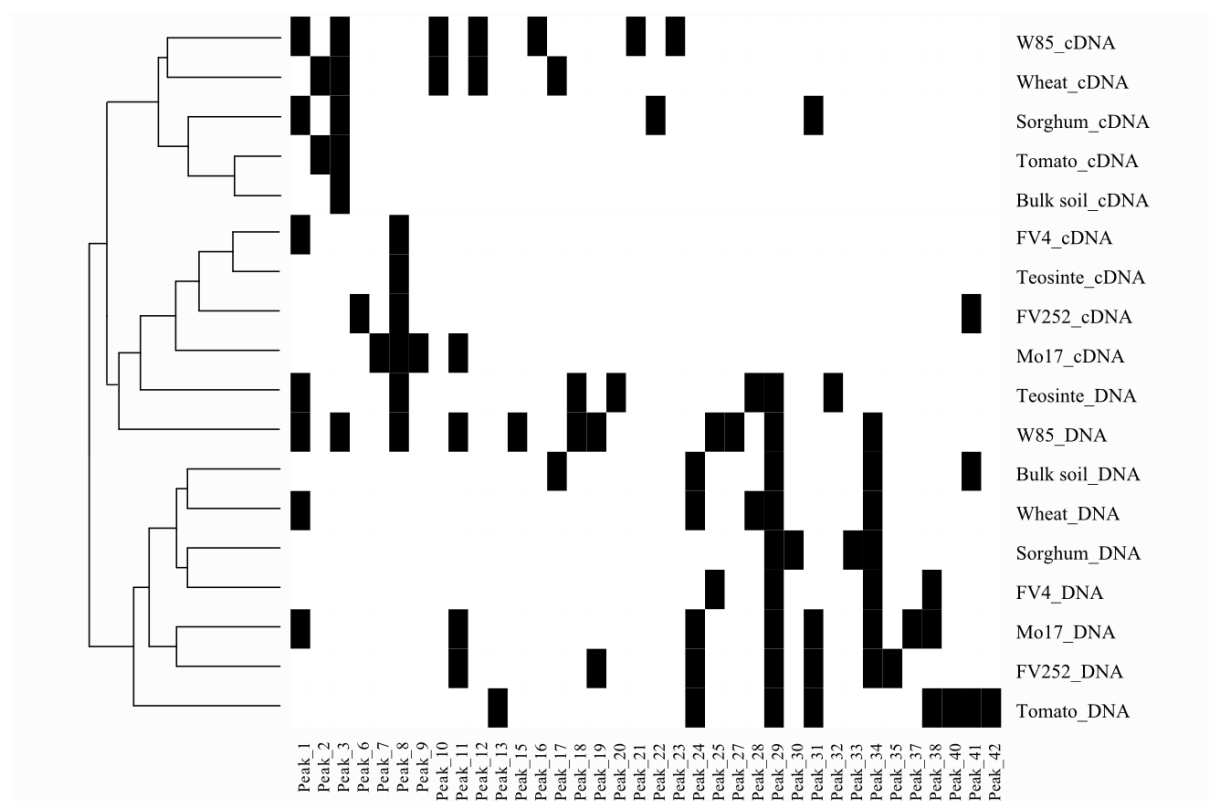
*Diversity of diazotroph communities*

T-RFLP of rhizosphere and bulk soil revealed a total of 43 distinct T-RFs (from 30 bp to full 350-bp *polF/polR* amplicon size), of which 21 T-RFs were found only in DNA samples, 9 in cDNA samples and 13 in both (Figure S2). Among them, 8 T-RFs were prevalent (i.e. evidenced at least in 5 of 17 treatments) in DNA samples, while the others were present in 4 treatments or less. The cDNA samples showed higher profile variability (similarity index of  $0.53 \pm 0.007$  for DNA samples and  $0.46 \pm 0.010$  for cDNA samples, but 3 T-RFs were prevalent (i.e. found at least in 5 treatments). Only 1 T-RF (i.e. Peak 1) was prevalent both in DNA (10 treatments) and cDNA samples (5 treatments).

Clustering of all treatment combinations based on T-RFLP data separated cDNA from DNA samples (Figure S2). When focusing on cropped soil at 21 days, this was also the main

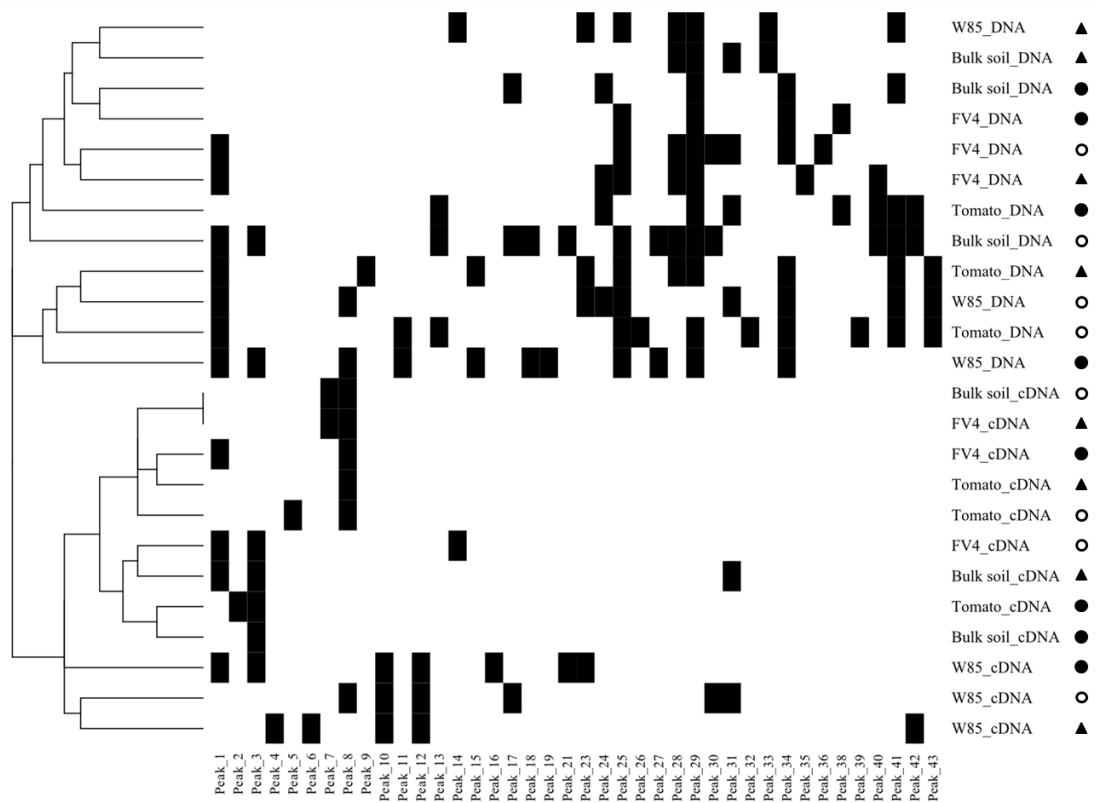
trend except that W85 maize and teosinte DNA samples clustered with the cDNA samples (Figure 2). In this situation, the two maize lines FV252 and Mo17 of the genetic group Corn Belt Dent (but not those of group Northern Flint) clustered together both for DNA and cDNA, and so did bulk soil, wheat and sorghum. Apart from this, treatments did not cluster similarly for cDNA versus DNA samples, even if they belong to the same species.

When considering treatments studied in both soils and at both samplings in cropped soil, a separation between DNA and cDNA samples was observed again (Figure 3). There was also a trend for similar clustering of treatments across soils and samplings, especially for FV4 maize and to lesser extent bulk soil, based on cDNA or DNA analysis. Such a trend was not found when comparing samplings or past soil management, regardless of whether cDNA or DNA was considered. Finally, DNA and cDNA samples for W85 often clustered away from the corresponding samples from other maize lines, across soils and samplings (Figures 2 and 3).



**Figure 2** Comparison of T-RFLP profiles for *nifH* DNA and cDNA samples from rhizospheres and bulk soil in cropped soil 21 days after sowing. The analysis was based on presence/absence of T-RFs in each treatment, using Euclidean distance matrix and complete linkage clustering.





**Figure 3** Comparison of T-RFLP profiles of W85 maize, FV4 maize, tomato and bulk soil based on *nifH* DNA and cDNA samples in cropped soil at 21 days (black circles) and 42 days (white circles) after sowing, and in meadow soil at 21 days (black triangles). The analysis was based on presence/absence of T-RFs in each treatment, using Euclidean distance matrix and complete linkage clustering.

Relationship between Poaceae phylogeny and diazotroph community

For a more formal appraisal of the relationship between diazotroph community and Poaceae phylogeny, correlation analysis was carried out between pairwise Poaceae phylogenetic distances and Euclidean distances derived from their root-associated diazotroph communities at 21 days in cropped soil (Figure 4). A significant correlation ( $r = 0.60$ ,  $P = 0.004$ ,  $n = 21$ ) was found when considering *nifH* gene copy number per g of root but not per g of rhizosphere soil or per root system (Figure 4E), as well as *nifH* transcript number per g of rhizosphere soil ( $r = 0.59$ ,  $P = 0.004$ ,  $n = 21$ ) but not per g of root or per root system (Figure 4D). No significant correlation was obtained when considering diazotroph community diversity, regardless of whether data were derived from DNA or cDNA T-RFLP analysis (Figure 4AB).

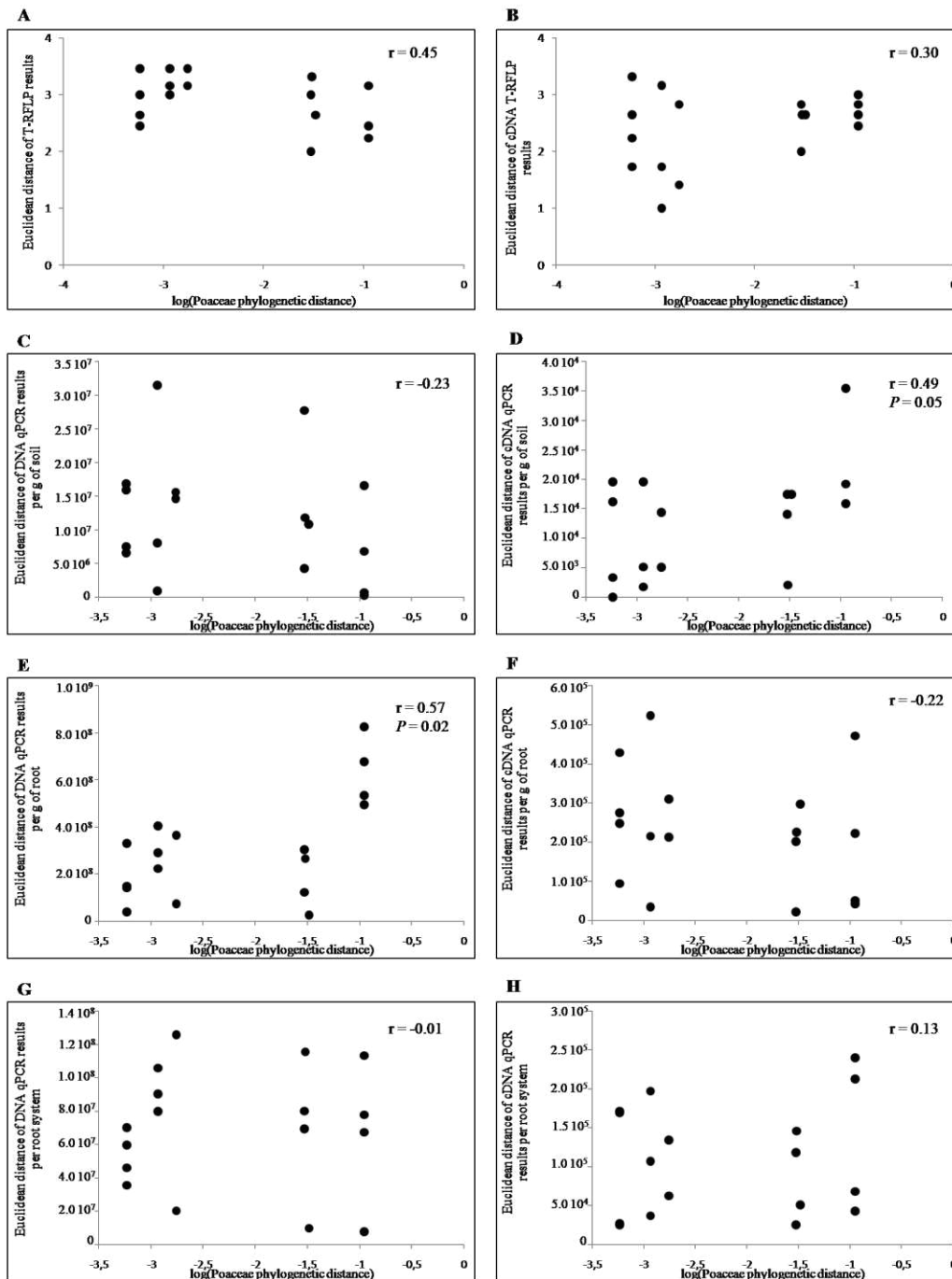
Relationship between plant development and diazotroph community

A significant correlation was found between plant phylogeny and plant development in terms of shoot and root biomass, but not rhizosphere size (Table 1). Plant development correlated with *nifH* gene copies per g of root (i.e. for shoot and root biomass), per g of rhizosphere soil (i.e. for root biomass and rhizosphere size) or per root system (i.e. for rhizosphere size). Plant development also correlated with *nifH* transcript number per root system (i.e. for root and shoot biomass and rhizosphere size). Conversely, there was no correlation between plant development and T-RFLP profiles for *nifH* genes or transcripts.

**Table 1** Correlation between pairwise distance in shoot, root or rhizosphere dry weight and Poaceae phylogenetic distance or Euclidean distance for *nifH* genes or transcripts.

	Dry weight (g per plant)		
	Shoots	Roots	Rhizosphere soil
Poaceae phylogeny	< <b>0.001</b>	<b>0.003</b>	0.662
<i>nifH</i> gene number			
Per g of rhizosphere soil	0.054	<b>0.021</b>	<b>0.024</b>
Per g of root	<b>0.012</b>	<b>0.005</b>	0.745
Per root system	0.101	0.489	<b>0.004</b>
<i>nifH</i> transcript number			
Per g of rhizosphere soil	0.068	0.058	0.415
Per g of root	0.627	0.733	0.232
Per root system	<b>0.007</b>	<b>0.014</b>	< <b>0.001</b>

The probability level (in bold when  $P < 0.05$ ) are indicated.



**Figure 4** Pairwise comparisons of plant phylogenetic distance between Poaceae (X axis) with the corresponding distance between their root-associated diazotroph communities (Y axis). *nifH* DNA data are shown to the left and *nifH* cDNA data to the right, and they correspond to results of T-RFLP (A and B), quantitative PCR or RT-PCR expressed per g of soil (C and D), per g of root (E and F) or per root system (G and H). Distances were calculated two by two, using Kimura 2 parameter model for plant phylogeny and Euclidean distance for diazotrophic community. The Pearson correlation coefficient and its probability level (when  $P < 0.05$ ) are indicated.

## **Discussion**

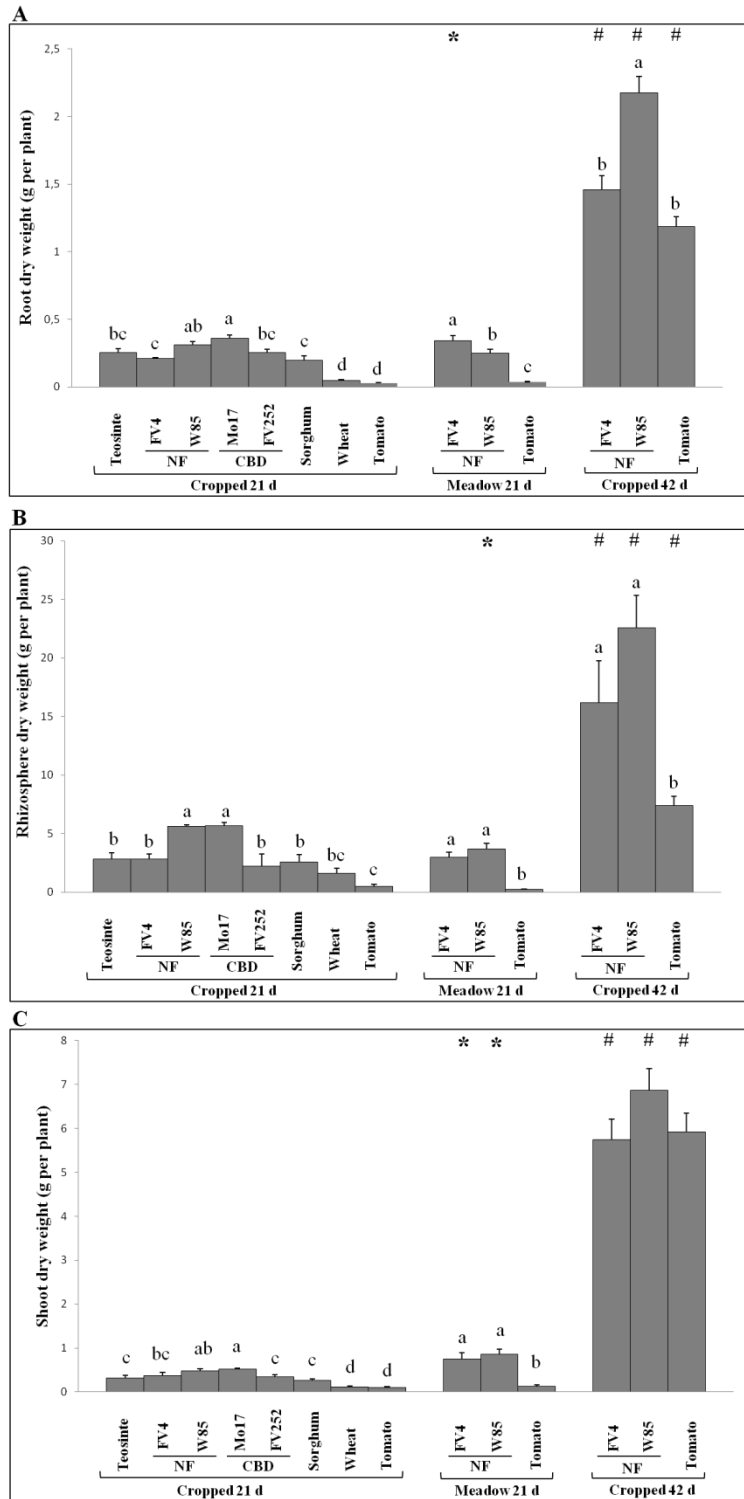
In this study, the impact of plant evolutionary history on root-associated diazotroph community size, *nifH* transcript number and genetic diversity was studied using molecular approaches based on established *nifH* primers (Poly *et al.* 2001; Mårtensson *et al.* 2009). Co-evolution has been well studied between symbiotic nitrogen-fixing bacteria and their eukaryotic hosts (Parker & Spoerke 1998), leading sometimes to differentiated structures maximizing mutual benefits, like nodules (Provorov & Vorobyov 2009). However, in soil a large range of free-living microorganisms interact with plant roots, providing here also mutual benefits (Lugtenberg & Kamilova 2009; Raaijmakers *et al.* 2009). Although no partner differentiation takes place, it makes sense that during evolution, modifications of root phenotypic properties facilitating BNF and thereby the supply of available nitrogen to the plant could have been selected.

On the one hand, many plant-beneficial free-living bacteria can benefit plants, but with contrasted efficacy according to plant species or varieties (Mehnaz *et al.* 2010; Meyer *et al.* 2010). On the other, Poaceae evolutionary history is a factor influencing root selection of soil bacteria and thus total rhizobacterial community composition (Bouffaud *et al.* submitted). This concerns in particular some genera containing nitrogen-fixing strains, like *Paenibacillus* or *Rhodospirillum*. Even though a significant correlation was found in Bouffaud *et al.* (submitted) between total rhizobacterial community composition and the phylogeny of the same Poaceae genotypes used in this study, no correlation was found here when considering diazotroph community diversity (Figure 4). One such correlation was found with *nifH* gene copy number and another with *nifH* transcript number, but their relevance is probably limited because (i) the former was significant when *nifH* gene copy number was expressed per g of root but not per g of rhizosphere soil and the latter when *nifH* transcript number was expressed per g of rhizosphere soil but not per g of root, (ii) none of the two was significant when these community parameters were expressed per root system, which represents best the nitrogen fixation potential for plant individuals, and (iii) the two correlation coefficients were of modest level ( $\leq 0.60$ ). On this basis, it can be concluded that Poaceae evolution did not influence significantly the *nifH* community size, the quantity of *nifH* transcripts or genetic diversity of root-associated nitrogen-fixing communities. As *nifH* bacteria are prevalent and express *nifH* in bulk soil, it means that presence of the plant is not required for their

establishment and functioning (Figure 1), thereby limiting the potential impact of plant features on the diazotroph community.

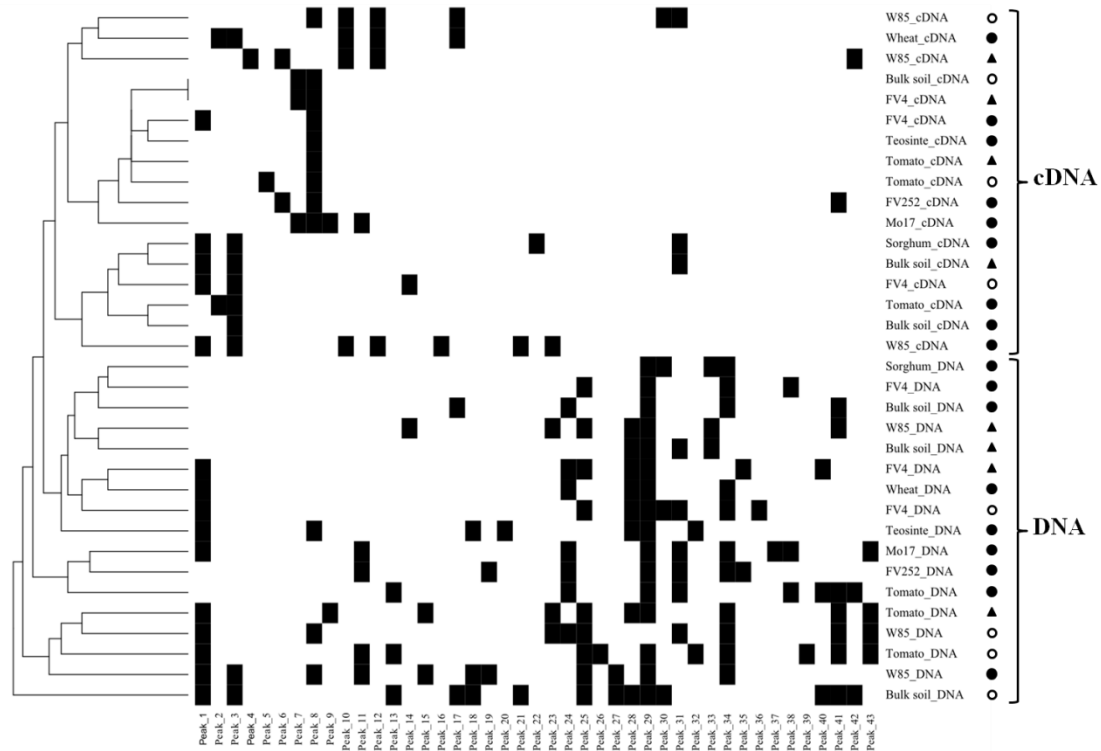
Although Poaceae evolution was not a significant factor, an impact of plant genotype was yet found on diazotroph community size, expression or diversity. This impact was rather moderate in magnitude, in accordance with previous studies. Indeed, differences of one log for DNA or cDNA copy number were usually found between samples from different areas or management practices (Foster *et al.* 2009; Mårtensson *et al.* 2009; Bannert *et al.* 2011; Dandie *et al.* 2011; Orr *et al.* 2011). This could suggest that a basal level of diazotrophic community size and expression always occurs, and that they are not extensively affected by environmental factors. The same quantities of *nifH* genes and of transcripts were found for the two maize lines from Corn Belt Dent group, unlike for the two maize lines from Northern Flint group. This is reminiscent of findings on the taxonomic composition of the total rhizobacterial community (Bouffaud *et al.* submitted), and suggests that nitrogen fixers could represent a significant part of the whole community. Differences were found according to plant genotype, but there was no apparent pattern when considering genotypic groups defined within the maize species or across different plant species. However, significant correlations were found between plant development parameters and *nifH* gene or transcript numbers, suggesting that plant development is a more important factor than plant evolutionary history.

In contrast, the diversity of diazotroph communities fluctuated according to plant genotypes (Figure 2), past soil management practice and sampling time plant (Figure 3). Previous molecular assessments described modification of diazotroph community structure due to presence of plant (Wartiainen *et al.* 2008; Monteiro *et al.* 2011), plant genotype (Coelho *et al.* 2009; Wu *et al.* 2009; Monteiro *et al.* 2011), plant growth stage (Monteiro *et al.* 2011), or soil management (Wartiainen *et al.* 2008; Hsu & Buckley 2009; Bannert *et al.* 2011). This was shown even when no difference in community size was found (Mårtensson *et al.* 2009), implying a shift in diazotrophic community populations.



**Figure S1** Root (A), rhizosphere soil (B) and shoot (C) dry weight per plant. Statistical analyses were performed independently at 21 days in cropped soil, at 21 days in meadow soil and at 42 days in cropped soil, using ANOVA and Fisher LSD tests ( $P < 0.05$ ; results shown with letters a to c). For FV4, W85, tomato and bulk soil, two-way ANOVA and Fisher LSD tests ( $P < 0.05$ ) were performed to compare treatments according to past soil management or sampling time, and differences with the same genotype at 21 days in cropped soil are indicated by symbols \* and #, respectively.

;



**Figure S2** Comparison of T-RFLP profiles of all treatments based on *nifH* DNA and cDNA samples in cropped soil at 21 days (black circles) and 42 days (white circles) after sowing, and in meadow soil at 21 days (black triangles). The analysis was based on presence/absence of T-RFs in each treatment, using Euclidean distance matrix and complete linkage clustering.

## **References**

- Bannert, A., Kleinedam, K., Wissing, L., Mueller-Niggemann, C., Vogelsang, V., Welzl, G., *et al.* (2011). Changes in diversity and functional gene abundances of microbial communities involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification comparing a tidal wetland to paddy soils cultivated for different time periods. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 6109-6116.
- Burgmann, H., Widmer, F., Sigler, W.V. & Zeyer, J. (2003). mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1928.
- Coelho, M.R.R., Marriel, I.E., Jenkins, S.N., Lanyon, C.V., Seldin, L. & O'Donnell, A.G. (2009). Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Applied Soil Ecology*, 42, 48-53.
- Comas, L.H. & Eissenstat, D.M. (2009). Patterns in root trait variation among 25 co-existing North American forest species. *New Phytologist*, 182, 919-928.
- Czarnota, M.A., Rimando, A.M. & Weston, L.A. (2003). Evaluation of root exudates of seven sorghum accessions. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 2073-2083.
- Dandie, C.E., Wertz, S., Leclair, C.L., Goyer, C., Burton, D.L., Patten, C.L., *et al.* (2011). Abundance, diversity and functional gene expression of denitrifier communities in adjacent riparian and agricultural zones. *FEMS Microbiology Ecology*, 77, 69-82.
- Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418, 700-707.
- de Dorlodot, S., Forster, B., Pagès, L., Price, A., Tuberosa, R. & Draye, X. (2007). Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in Plant Science*, 12, 474-481.
- Foster, R.A., Subramaniam, A. & Zehr, J.P. (2009). Distribution and activity of diazotrophs in the Eastern Equatorial Atlantic. *Environmental Microbiology*, 11, 741-750.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B. & Boddey, R.M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311, 1-18.
- Hsu, S.-F. & Buckley, D.H. (2009). Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. *ISME Journal*, 3, 124-136.



- Junier, P., Junier, T., Witzel, K.-P. & Carú, M. (2009). Composition of diazotrophic bacterial assemblages in bean-planted soil compared to unplanted soil. *European Journal of Soil Biology*, 45, 153-162.
- Knauth, S., Hurek, T., Brar, D. & Reinhold-Hurek, B. (2005). Influence of different *Oryza* cultivars on expression of *nifH* gene pools in roots of rice. *Environmental Microbiology*, 7, 1725-1733.
- Lambert, J.B., Heckenbach, E.A., Wu, Y. & Santiago-Blay, J.A. (2010). Characterization of plant exudates by principal-component and cluster analyses with nuclear magnetic resonance variables. *Journal of Natural Products*, 73, 1643-1648.
- Lugtenberg, B. & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.
- Mårtensson, L., Díez, B., Wartainen, I., Zheng, W., El-Shehawy, R. & Rasmussen, U. (2009). Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China. *Plant and Soil*, 325, 207-218.
- Mehnaz, S., Kowalik, T., Reynolds, B. & Lazarovits, G. (2010). Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 1848-1856.
- Meyer, J.B., Lutz, M.P., Frapolli, M., Pechy-Tarr, M., Rochat, L., Keel, C., *et al.* (2010). Interplay between wheat cultivars, biocontrol pseudomonads, and soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 6196-6204.
- Monteiro, J.M., Vollú, R.E., Coelho, M.R.R., Fonseca, A., Gomes Neto, S.C. & Seldin, L. (2011). Bacterial communities within the rhizosphere and roots of vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) sampled at different growth stages. *European Journal of Soil Biology*, 47, 236-242.
- Orr, C.H., James, A., Leifert, C., Cooper, J.M. & Cummings, S.P. (2011). Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 911-919.
- Osmont, K.S., Sibout, R. & Hardtke, C.S. (2007). Hidden branches: Developments in root system architecture. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 93-113.
- Parker, M.A. & Spoerke, J.M. (1998). Geographic structure of lineage associations in a plant-bacterial mutualism. *Journal of Evolutionary Biology*, 11, 549-562.
- Perin, L., Martinez-Aguilar, L., Castro-Gonzalez, R., Estrada-de los Santos, P., Cabellos-Avelar, T., Guedes, H.V., *et al.* (2006). Diazotrophic *Burkholderia* species associated

- with field-grown maize and sugarcane. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3103-3110.
- Poly, F., Monrozier, L.J. & Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152, 95-103.
- Prakamhang, J., Minamisawa, K., Teamtaisong, K., Boonkerd, N. & Teaumroong, N. (2009). The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Applied Soil Ecology*, 42, 141-149.
- Provorov, N.A. & Vorobyov, N.I. (2009). Host plant as an organizer of microbial evolution in the beneficial symbioses. *Phytochemistry Review*, 8, 519-534.
- Raaijmakers, J., Paulitz, T., Steinberg, C., Alabouvette, C. & Moënne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 321, 341-361.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Doledec, S. & Olivier, J.M. (1997). ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and computing*, 7, 75-83.
- Uga, Y., Ebana, K., Abe, J., Morita, S., Okuno, K. & Yano, M. (2009). Variation in root morphology and anatomy among accessions of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) with different genetic backgrounds. *Breeding Science*, 59, 87-93.
- Wartiainen, I., Eriksson, T., Zheng, W. & Rasmussen, U. (2008). Variation in the active diazotrophic community in rice paddy-*nifH* PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Applied Soil Ecology*, 39, 65-75.
- Wu, C.H., Bernard, S.M., Andersen, G.L. & Chen, W. (2009a). Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microbial Biotechnology*, 2, 428-440.
- Wu, L., Ma, K. & Lu, Y. (2009b). Prevalence of betaproteobacterial sequences in *nifH* gene pools associated with roots of modern rice cultivars. *Microbial Ecology*, 57, 58-68.
- Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M. & Steward, G.F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, 5, 539-554.

## **Données supplémentaires : Cinétique de la taille de la communauté des microorganismes fixateurs d'azote**

L'étude de l'impact de l'histoire évolutive des *Poaceae* sur la communauté fonctionnelle des bactéries fixatrices d'azote nous a permis de mettre en évidence un impact de l'espèce végétale et de la variété sur la taille de la communauté diazotrophe, à un temps donné, soit 21 jours après semis des graines. Lors de cette étude, nous avons également déterminé que le temps de croissance des plantes, pour deux génotypes de maïs et la tomate, pouvait impacter la taille de cette communauté. Il a été démontré que la quantité et la composition des exsudats racinaires varient dans le temps, de la germination à la maturation, et ceci de façon cultivar-dépendant (Aulakh *et al.* 2001). Or, les exsudats racinaires influencent fortement la communauté bactérienne du sol (Bais *et al.* 2006). Nous avons donc déterminé si la taille de la communauté des microorganismes fixateurs d'azote variait de façon importante au cours du temps, en se plaçant à des temps précoces de l'interaction (premières heures) et en poussant l'étude jusqu'à une interaction plus longuement établie entre la plante et les microorganismes du sol (42 jours après semis).

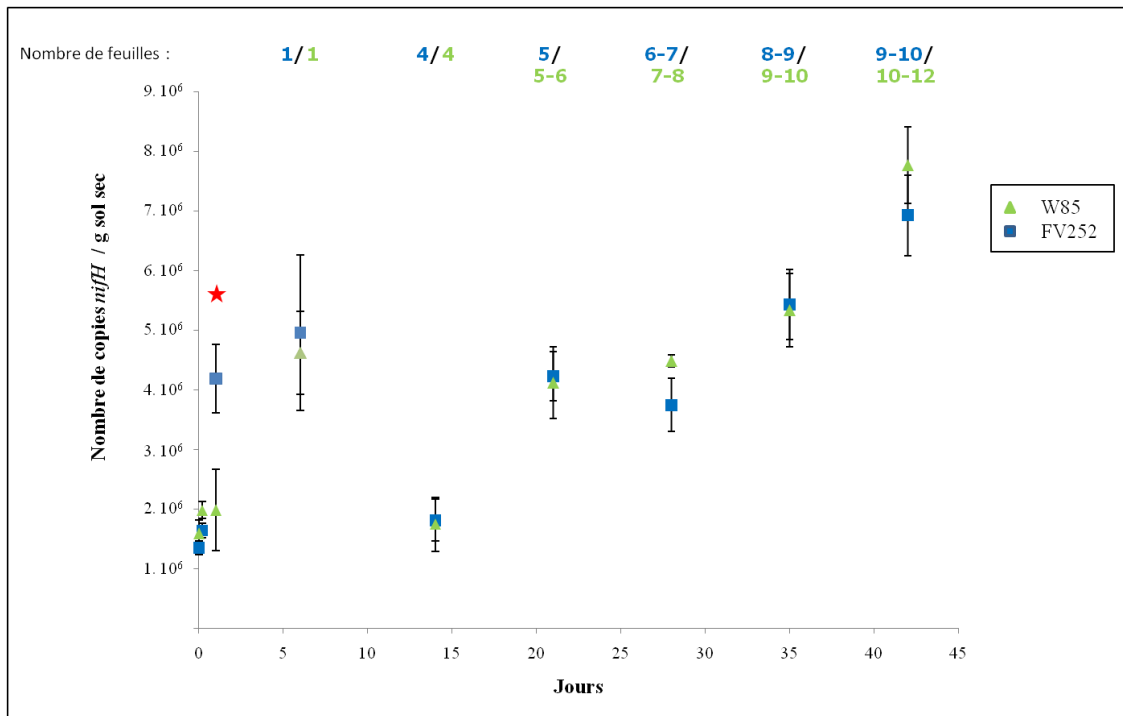
Pour atteindre cet objectif, nous avons effectué une cinétique de la taille de la communauté diazotrophe dans la rhizosphère de deux lignées de maïs, utilisées dans l'expérience précédente, et appartenant à deux groupes génétiques distincts : FV252 (groupe Corn Belt Dent) et W85 (groupe Northern Flint). Les lignées de maïs ont été plantées en serre dans du sol de La-Côte-Saint-André, et l'échantillonnage a été effectué à 9 temps différents : T0, 5 heures, 1 jour, 6 jours, 14 jours, 21 jours, 28 jours, 35 jours et 42 jours après semis des graines. L'échantillonnage de la rhizosphère, l'extraction des acides nucléiques et la quantification de la taille de la communauté par PCR quantitative ont été effectués comme décrit dans l'expérience précédente. Les résultats obtenus à chaque temps d'échantillonnage ont été comparés entre les deux lignées à l'aide d'un test t de Student ( $P < 0,05$ ).

Les résultats nous montrent que les différences de taille de la communauté diazotrophe dans la rhizosphère au cours du temps sont faibles, inférieures à un log, pour les deux lignées de maïs étudiées (Figure 5). Toutefois, une légère hausse (presque un demi log) de la taille de la communauté est observée de T0 à 6 jours, ce qui laisse penser qu'une interaction bénéfique entre les bactéries fixatrices d'azote et les plantes pourrait avoir lieu dans les phases précoces de l'interaction. Ceci concorde avec les données de Jacoud et collaborateurs (1999), qui avaient mis en évidence un effet sur le développement racinaire du maïs résultant d'une

interaction précoce (stades initiaux de la germination) de la bactérie PGPR *Azospirillum*, également fixatrice de l'azote atmosphérique. La taille de la communauté diazotrophe était plus faible à 14 jours, pour augmenter de nouveau, de plus d'un demi-log, entre 14 et 42 jours. Cette dynamique pourrait être liée à un changement de mode de croissance du maïs. En effet, le maïs passe d'un mode de croissance hétérotrophe (basée sur les réserves nutritives de la graine) à une croissance autotrophe (basée sur la photosynthèse) lorsque quelques feuilles sont déjà présentes (Greaves 1996), ce qui correspond environ à notre point de mesure effectué 14 jours après semis. Entre ces deux modes de croissance, la plante se trouve dans une étape de transition pendant laquelle elle utilise les dernières réserves de la graine et commence la photosynthèse (Greaves 1996), et limite peut être donc sa production d'exsudats racinaires, ce pourrait être la raison de la baisse de la taille de la communauté des bactéries fixatrices dans la rhizosphère.

Nous avons également pu déterminer que les deux lignées pures de maïs ont une taille de communauté de microorganismes rhizosphériques diazotrophes comparable, sauf à 1 jour (Figure 5), qui correspond à une phase d'imbibition de la graine. Il pourrait donc y avoir un effet de la variété de plante aux premiers temps de l'interaction entre la plante et les bactéries du sol, et notamment sur les bactéries phyto-bénéfiques, dont un grand nombre fixe l'azote atmosphérique (Saharan et Nehra 2011).

En conclusion, les temps très précoces de croissance des plantes doivent être à privilégier pour l'étude de l'interaction entre les plantes et les bactéries du sol fixatrices de l'azote atmosphérique. Nous pouvons supposer que des différences plus marquées existent peut-être au niveau de l'expression et/ou de la diversité de cette communauté, mais l'analyse de l'expression du gène *nifH* n'a pas pu être réalisée, en raison d'une importante dégradation des ARN. Il serait donc intéressant de refaire cette expérience afin de suivre l'expression du gène *nifH* dans le temps, mais également afin d'étudier la diversité de la communauté des bactéries exprimant ce gène. Il serait également nécessaire d'effectuer un plus grand nombre d'échantillonnages au moment de la transition entre les modes de croissances hétérotrophe et autotrophe, afin de confirmer l'impact du mode de croissance sur le recrutement des bactéries fixatrices d'azote.



**Figure 5** : Résultats de la cinétique de taille de la communauté bactérienne rhizosphérique analysée par PCR quantitative. Les résultats sont exprimés en nombre de copies du gène *nifH* par gramme de sol sec, et pour chaque temps d'échantillonnage, la moyenne et l'erreur standard sont représentées. Des analyses statistiques entre les deux lignées de maïs ont été effectuées à chaque temps d'échantillonnage à l'aide d'un test t de Student. La différence statistique entre lignées ( $P < 0,05$ ) est représentée par une étoile rouge.

---

## Discussion générale et perspectives

---

## **Discussion générale et perspectives**

L'écologie des hôtes eucaryotes est fortement influencée par les interactions avec leurs partenaires microbiens, et l'interaction prolongée entre les organismes eucaryotes et procaryotes a conduit à des coévolutions (van Rhijn et Vanderleyden 1995 ; Futuyama et Agrawal 2009 ; Råberg *et al.* 2009 ; Mougi et Iwasa 2011). Il a également été mis en évidence que le génotype de l'hôte eucaryote conditionne le recrutement des communautés microbiennes associées, comme les mammifères et leur communauté intestinale. Ainsi, les plantes stimulent par la libération de rhizodépôts au niveau de leurs racines différentes populations microbiennes à partir de la communauté totale du sol (= effet rhizosphère ; Curl et Truelove 1986 ; Bowen et Rovira 1999 ; Jones *et al.* 2004 cités dans Hisinger *et al.* 2005). Cette communauté rhizosphérique, en retour, conditionne le développement du végétal. Dans un contexte agronomique, l'impact des espèces ou variétés de plantes sur la structure des communautés microbiennes associées est d'ailleurs étudié depuis plusieurs années (Siciliano *et al.* 1998 ; Knauth *et al.* 2005 ; van Overbeek and Elsas 2008 ; Aira *et al.* 2010 ; Inceoglu *et al.* 2010). Pour autant, on ne sait généralement pas pourquoi tel génotype de plante sélectionne tel type de microorganisme, et la connaissance des profils métaboliques des rhizodépôts de différentes lignées ne permet pas, la plupart du temps, de prédire quels microorganismes seront sélectionnés ni la composition de la communauté microbienne rhizosphérique (Dennis *et al.* 2010). Dans le cas des microorganismes saprophytes, c'est sans doute parce que ces mécanismes de sélection par la plante sont complexes, impliquant différentes propriétés du système racinaire. Il s'agit de traits susceptibles d'être modifiés au cours de l'évolution des plantes, ce qui a motivé ce travail de thèse.

En effet, l'évolution des plantes depuis environ 500 millions d'années (Gensel 2008) a entraîné un grand nombre de modifications génétiques, des phénomènes de divergence, et au final de grandes variations phénotypiques entre les espèces végétales, voire entre génotypes distincts au sein des espèces. Certaines de ces modifications phénotypiques concernent clairement des facteurs d'interaction avec les microorganismes du sol, comme la structure du système racinaire ou le profil d'exsudation des racines (Czarnota *et al.* 2003 ; Bais *et al.* 2006 ; da Rocha *et al.* 2009), mais d'autres moins explicites jouent peut-être aussi un rôle important dans ces interactions. Les interactions durables entre les bactéries du sol et les racines des plantes ont pu aboutir à des phénomènes de coévolution dans le sol d'origine de la plante. Toutefois, toutes les plantes n'ont pas évolué dans un sol européen (maïs originaire

d'Amérique, le sorgho d'Afrique, le blé de Mésopotamie) et le sol que nous avons utilisé est donc plutôt neutre vis-à-vis de l'évolution passée de ces espèces, même si le blé (anciennement) et le maïs (ces dernières décennies) sont largement présents dans l'historique culturel du site. Dans cette thèse, le choix de conditions contrôlées (température, humidité) permettait de comparer directement les capacités des plantes à recruter les bactéries dans un sol donné. Nous avons donc analysé l'influence de l'évolution passée des plantes et non une coévolution entre les plantes et les bactéries du sol. Nous pouvons penser que des plantes proches phylogénétiquement ont des propriétés phénotypiques proches et donc une communauté bactérienne rhizosphérique plus semblable que des variétés ou espèces éloignées phylogénétiquement. Cette hypothèse correspond à l'idée d'un « signal phylogénétique », c'est à dire à une relation entre les distances phylogénétiques et le degré de similarité d'un trait phénotypique (Gilbert et Webb 2007 ; Ley *et al.* 2008 ; Losos 2008). Les conséquences de l'évolution des plantes peuvent être considérées aux niveaux de la composition de la communauté microbienne rhizosphérique et de son fonctionnement, et chaque niveau est discuté séparément.

### Influence de l'histoire évolutive sur la diversité bactérienne rhizosphérique

Dans ce travail, il a été mis en évidence que les différences phénotypiques existant entre différents génotypes de plantes influencent la composition de la communauté bactérienne du sol, que l'on compare différentes lignées ou espèces de poacées (Parties expérimentales 1 et 2). En nous intéressant à l'histoire évolutive des poacées (évolution sur 65 millions d'années ; Abrouk *et al.* 2010) une corrélation a été trouvée en comparant les distances phylogénétiques et la communauté bactérienne rhizosphérique associée (Partie expérimentale 2). De même, la composition de la communauté bactérienne rhizosphérique totale dépend des cinq groupes génétiques de maïs (Partie expérimentale 1), et l'historique de la formation de ces groupes depuis la domestication de cette plante il y a 10000 ans (Dobley 2004 ; Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006) se retrouve au niveau des phénomènes de sélection rhizosphériques. Par exemple, le groupe génétique Stiff Stalk issu du croisement entre les groupes Corn Belt Dent et Northern Flint, possède une communauté bactérienne intermédiaire à ces deux groupes. Par contre, aucune corrélation entre les distances génétiques entre lignées de maïs et la composition de la communauté bactérienne associée n'a été observée. Dans nos conditions expérimentales, le niveau du groupe génétique à l'intérieur de l'espèce n'était pas pertinent pour la mise en évidence d'une corrélation entre l'histoire évolutive des plantes et



leur influence sur la communauté bactérienne totale. Pour ce faire, un seuil minimum de diversité végétale est peut-être nécessaire, impliquant des phénomènes de diversification couvrant une période beaucoup plus longue qu'une dizaine de milliers d'années.

Toutefois, il est possible que les méthodes de calcul des distances entre plantes aient un rôle dans cette limite. En effet, les distances génétiques entre lignées de maïs ont été obtenues par l'analyse de 67 marqueurs microsatellites présents chez le maïs (Partie expérimentale 1 ; Camus-Kulandaivelu *et al.* 2006), alors que des distances phylogénétiques résultant l'étude de séquences d'ADN chloroplastique ont été utilisées comme marqueurs de l'histoire évolutive des poacées (Partie expérimentale 2). Les marqueurs microsatellites peuvent avoir un rôle dans les différences phénotypiques résultant de la domestication chez le maïs (Vigouroux *et al.* 2002), mais les distances génétiques basées sur des marqueurs microsatellites ne reflètent pas totalement les différences phénotypiques existantes selon le niveau de développement de la plante (Coque *et al.* 2006 ; Maccaferri *et al.* 2007). Dans notre étude, les distances génétiques entre deux lignées d'un même groupe génétique ne sont pas toujours inférieures à celles entre lignées de groupes différents. Cette méthode de calcul de distance est utile pour la phylogénie infraspécifique d'un grand nombre d'espèces végétales (Figliuolo et Perrino 2004), mais n'a pas permis dans le cas du maïs de mettre en évidence l'influence de l'histoire évolutive sur les communautés bactériennes associées.

Par contre, les distances phylogénétiques basées sur des séquences d'ADN chloroplastique sont utilisées de façon courante pour la phylogénie végétale à un niveau plus large, comme ceux de la famille ou de la sous-famille (Shaw *et al.* 2007 ; Hodge *et al.* 2010 ; Peterson *et al.* 2010). Ce type de distance a permis de mettre en relation la phylogénie des poacées et les différences de recrutement de la communauté bactérienne rhizosphérique (Partie expérimentale 2). Elles ne sont toutefois pas utilisables dans le cas d'une étude infraspécifique de la diversité du maïs, du fait de la trop grande conservation des séquences (99 à 100% d'homologie).

L'histoire évolutive végétale a une influence sur un certain nombre de taxons bactériens particuliers, comme nous avons pu le voir dans les parties expérimentales 1 et 2. Or, certaines fonctions bactériennes sont communes à des genres bactériens très divers, comme la fixation de l'azote par les rhizobiacées, les actinobactéries et d'autres types de bactéries du sol. En analysant les fonctions communes aux bactéries influencées par l'histoire évolutive végétale, nous pourrions peut être mieux comprendre les processus biologiques mis en place dans la rhizosphère. Le principal taxon mis en évidence dans la partie expérimentale 1 est celui des espèces *Burkholderia* du complexe *cepacia*, bien connu pour les souches

pathogènes opportunistes de l'Homme (Coenye et Vandamme 2003). Ce complexe contient également des espèces retrouvées de façon récurrente dans la nature, et notamment dans la rhizosphère (Dalmastri *et al.* 1999 ; Balandreau *et al.* 2001 ; Vanlaere *et al.* 2008 ; Castro-Gonzalez *et al.* 2011), dont certaines ont un effet phytobénéfique (Parke et Gurian-Sherman 2001). De même, l'évolution des poacées a façonné la capacité des lignées à recruter les espèces du genre *Azospirillum*, qui sont bien connues pour leur rôle PGPR des céréales (El Zemrany *et al.* 2006 ; Fuentes-Ramirez et Caballero-Mellado 2006 ; Bashan et de-Bashan 2010). Le niveau de colonisation racinaire par ces espèces bactériennes dépendant de l'espèce végétale étudiée, cela revient à dire que les bactéries du sol n'ont pas la même capacité de colonisation des différentes espèces de plante. Ces capacités de colonisation sont peut-être une composante de la niche écologique de ces bactéries du sol, les processus évolutifs ayant alors conduit à des affinités différentes et peut-être un certain niveau de spécificité représenté ici par les différentes espèces de plantes (Losos 2009). Cela conduit peut-être aussi à des effets phytobénéfiques différents selon l'espèce végétale considérée.

Dans ce travail, les temps d'échantillonnage ont permis de caractériser les bactéries rhizosphériques lors des premières phases de développement de la plante, au plus tard à 42 jours après le semis. Il est possible que nos résultats soient caractéristiques des communautés bactériennes pionnières. Sachant que la structure génétique de la communauté bactérienne rhizosphérique change avec la phénologie du maïs (Baudoin *et al.* 2009), il serait intéressant comme perspective de vérifier si les résultats obtenus à des stades de développement plus tardifs seraient similaires ou pas. Nous avons comparé deux temps d'échantillonnage dans l'une des expériences, mais avec trop peu de géotypes végétaux pour pouvoir répondre à cette question.

Enfin, nous pouvons nous interroger sur le rôle du type de sol dans l'analyse des communautés bactériennes, nos plantes ayant été cultivées dans un sol européen. Le type de sol est un facteur important dans l'analyse des communautés bactériennes rhizosphériques (Marschner *et al.* 2001 ; Wieland *et al.* 2001 ; Ndour *et al.* 2008 ; Berg et Smalla 2009). En effet, la composition du sol (texture, structure, etc.), le mode d'usage des terres (terre arable, prairie, etc.) et la composition du couvert végétal ont une influence sur la fertilité du sol, la biodisponibilité des nutriments, etc. et par conséquent sur la composition de la communauté bactérienne (Boyer et Groffman 1996 ; Fierer et Jackson 2006). Toutefois, des résultats analogues ayant été observés pour deux lignées de maïs et la tomate en comparant les sols sous culture et sous prairie, l'historique cultural du sol ne semble pas avoir influencé de façon majeure les processus de colonisation rhizosphérique des espèces bactériennes. En termes de

perspective, il serait intéressant d'effectuer aussi ce type de comparaison avec des sols plus contrastés que les deux sols utilisés.

Ce travail de thèse nous a permis de donner une vision globale de l'impact de l'histoire évolutive, en comparant la phylogénie végétale (basée sur des séquences d'ADN) et les communautés bactériennes rhizosphériques associées, sans que nous comprenions les mécanismes qui en sont à l'origine. Or, nous savons que les métabolites (nutriments carbonés, signaux, toxines) exsudés par les plantes influencent la relation du végétal avec les bactéries du sol (Bais *et al.* 2006 ; Haichar *et al.* 2008 ; Dennis *et al.* 2010). En ce qui concerne les perspectives, il serait intéressant d'analyser les résultantes de l'évolution au niveau des profils d'exsudations des poacées et de les comparer aux données de communautés bactériennes rhizosphériques. Ceci permettrait peut-être de formuler des hypothèses quant aux traits végétaux qui pourraient permettre de relier l'évolution passée des plantes à leur capacité de recrutement de leur communauté bactérienne rhizosphérique.

### Influence de l'histoire évolutive sur les communautés bactériennes phytobénéfiques

Les plantes sont en interaction avec une communauté microbienne tellurique très diversifiée, dont certaines espèces vont avoir un effet bénéfique sur la plante, comme cela a été démontré pour les bactéries PGPR (Lugtenberg et Kamilova 2009 ; Raaijmakers *et al.* 2009). De plus, les différents génotypes de plante ne recrutent pas les mêmes communautés bactériennes dans leur rhizosphère, et l'histoire évolutive des poacées joue un rôle dans ce recrutement (Partie expérimentale 2). Nous nous sommes donc demandé si les bactéries en interaction forte avec les plantes comme les bactéries PGPR sont plus particulièrement influencées par l'histoire évolutive des poacées. Les bactéries PGPR sont très diverses, mais un groupe fonctionnel est largement retrouvé parmi les différents taxons, celui des bactéries fixatrices de l'azote atmosphérique (Herridge *et al.* 2008).

L'analyse des résultats de quantification de la communauté diazotrophe nous a montré de faibles différences entre les espèces végétales au niveau de la quantité d'allèles *nifH* et du nombre de transcrits du gène. D'autres études ont mis en évidence des variations de taille de cette communauté ne dépassant guère le log, même en comparant des échantillons très dissemblables (Foster *et al.* 2009 ; Mårtensson *et al.* 2009 ; Bannert *et al.* 2011; Dandie *et al.* 2011 ; Orr *et al.* 2011). Par ailleurs, la composition de la communauté diazotrophe varie de façon importante entre les différentes espèces ou variétés de plante. Une diversification

maximale des communautés semble être observée dans la nature, surtout en prenant en compte des niveaux taxonomiques hauts comme les clades (Rabosky 2009). Toutefois, des modifications de la structure des communautés continuent de s'opérer, à travers l'apparition d'espèces ayant un phénotype adapté à l'écosystème par des phénomènes de spéciation, et d'extinction d'autres espèces n'ayant plus un phénotype adapté aux conditions environnementales (Stegen *et al.* 2009 ; Rosindell *et al.* 2010).

Il est possible que la communauté bactérienne fixatrice d'azote dans son ensemble ne soit pas influencée par l'histoire évolutive végétale, mais seulement certaines populations particulières, comme le laisse supposer la corrélation trouvée entre l'évolution des plantes et le recrutement de bactéries du genre diazotrophe *Azospirillum* (Partie expérimentale 2). Ce groupe fonctionnel est particulièrement large, regroupe un nombre d'espèces appartenant à des classes ou des divisions phylogénétiques différentes (Izquierdo et Nusslein 2006). Or, une espèce particulière de bactéries fixatrices d'azote peut être influencée par les conditions biotiques ou abiotiques (Engelhard *et al.* 2000 ; Perrin *et al.* 2006 ; Leon-Barrios *et al.* 2009 ; Castro-Gonzalez *et al.* 2011). Nous pouvons donc penser que l'étude plus fine de certaines populations particulières nous permettrait de mettre en évidence une influence de l'évolution des plantes sur plusieurs populations fixatrices d'azote (Zak *et al.* 2006).

Comme perspective, afin de tester si certaines populations appartenant à la communauté fonctionnelle des bactéries fixatrices d'azote sont influencées par l'histoire évolutive des poacées, des expériences d'inoculation de bactéries phyto-bénéfiques pourraient être effectuées. Ceci permettrait de mettre en évidence des différences (i) de colonisation des souches, (ii) de potentiel de fixation de l'azote entre les géotypes de plantes, ou (iii) d'effet sur la croissance des plantes. Certaines souches connues pour leur fixation de l'azote sont déjà utilisées comme biofertilisant notamment du maïs, comme par exemple *Azospirillum*, largement utilisée au Mexique (Fuentes-Ramirez et Caballero-Mellado 2006). Ce genre est également influencé par l'histoire évolutive des poacées, comme nous l'avons montré dans la partie expérimentale 2. De plus, des outils de suivi des souches bactériennes sont disponibles dans le laboratoire (Couillerot *et al.* 2010 a et b), et une influence de la souche bactérienne et du cultivar utilisé a déjà été mise en évidence (Walker *et al.* 2011).

D'ici à 2030, la population humaine devrait atteindre 8,3 milliards de personnes, un milliard de tonnes de céréales supplémentaires seront nécessaires, et il est prévu que 70% de la hausse de production agricole soit obtenue en augmentant les rendements, selon la FAO (*United Nations Food and Agriculture Organization ; www.fao.org*). L'utilisation de microorganismes bénéfiques tels qu'*Azospirillum* pour augmenter les rendements agricoles et

limiter les apports d'intrants notamment azotés est un concept en plein développement (Vessey 2003; Den Herder *et al.* 2010; Singh *et al.* 2011). Néanmoins, ces microorganismes n'ont pas toujours l'effet escompté lorsqu'ils sont inoculés en champ. L'effet phytobénéfique potentiel apporté par l'inoculation de souches aidant à la croissance des plantes n'est quelquefois pas visible du fait d'une mauvaise colonisation de la souche sur la plante hôte, d'un maintien limité dans le temps de la souche dans le sol, ou d'inhibition par des microorganismes indigènes en compétition avec la souche inoculée (Compant *et al.* 2010). Malgré la compétitivité et le potentiel de compétence saprophytique des souches de microorganismes phytobénéfiques, le facteur variété peut être un frein à leur établissement dans la rhizosphère et leur efficacité. Ainsi, l'inoculation de souches phytobénéfiques améliore la croissance végétale et/ou le rendement de manière différente selon le cultivar chez les plantes de grandes cultures telles que le pois (King *et al.* 1993), le riz (Sasaki *et al.* 2010), le maïs (Garcia de Salomone et Döbereiner 1996) ou le blé (Bhattarai et Hess 1993 ; Khalid *et al.* 2004).

Les différentes espèces de plantes tout comme les différentes variétés d'une même espèce de plante ne réagissent pas de manière similaire à l'inoculation de bactéries phytobénéfiques. Il est donc nécessaire d'utiliser des combinaisons de souches bactériennes / variétés compatibles pour une inoculation efficace. Pour cela, il est nécessaire de mieux comprendre l'influence de l'évolution des plantes, des espèces et variétés en résultant, sur des groupes fonctionnels phytobénéfiques. L'évolution des plantes doit être prise en compte comme facteur de la spécificité d'interaction entre microorganismes et hôte eucaryote.

Enfin, les résultats obtenus pour le groupe fonctionnel des bactéries fixatrices d'azote ne préjugent pas du comportement des autres groupes fonctionnels microbiens. Il serait donc intéressant, en termes de perspective, de tester si l'histoire évolutive des poacées peut avoir une influence sur des autres groupes fonctionnels, liés au cycle de l'azote (nitrification, dénitrification, etc.), à des activités PGPR (ACC désaminase, production d'antimicrobiens, etc.), etc. Il est possible que ces autres groupes fonctionnels répondent de manière différente à l'influence de l'évolution des plantes, en modifiant la taille de la communauté de ces groupes ou leur expression. Nos résultats préliminaires obtenus dans le cas des bactéries à activité ACC désaminase vont dans ce sens (données non montrées dans ce manuscrit de thèse). Dans ce contexte, une perspective de ce travail serait de considérer simultanément plusieurs types de groupes fonctionnels microbiens, bactériens et fongiques, pour une vision plus globale d'écologie fonctionnelle. Les nouvelles techniques de séquençage haut-débit maintenant disponibles devraient permettre d'atteindre ce type d'objectif.

## **Conclusion**

En conclusion, nous avons mis en évidence dans ce travail de thèse que l'histoire évolutive des plantes, en l'occurrence celle du maïs et des poacées, a une influence sur la communauté bactérienne rhizosphérique. Une corrélation directe entre la phylogénie des poacées et la composition de la communauté bactérienne rhizosphérique totale a été mise en évidence, mais de tels résultats n'ont pas été obtenus concernant la communauté fonctionnelle des bactéries diazotrophes, en termes de taille et également de diversité. Il apparaît ainsi que l'évolution des plantes étudiées se concrétise au niveau des processus de sélection des bactéries en ce qui concerne les propriétés taxonomiques, mais pas fonctionnelles, de ces dernières. Il est toutefois nécessaire d'approfondir ce domaine de recherche, qui a montré par le passé que la coévolution entre procaryotes et eucaryotes avait abouti à des relations étroites entre les deux types de partenaires.



---

## Références bibliographiques

---



- Abi-Ghanem, R., Carpenter-Boggs, L. & Smith, J.L. (2011). Cultivar effects on nitrogen fixation in peas and lentils. *Biology and Fertility of Soils*, 47, 115-120.
- Abrams, P.A. (2000). The evolution of predator-prey interactions: Theory and evidence. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31, 79-105.
- Abrouk, M., Murat, F., Pont, C., Messing, J. Jackson, S., Faraut, T., Tannier, E. *et al.* (2010). Palaeogenomics of plants: synteny-based modelling of extinct ancestors. *Trends in Plant Science*, 15, 479-487
- Adamo, S.A., Ehgoetz, K., Sangster, C. & Whitehorne, I. (2006). Signaling to the enemy? Body pattern expression and its response to external cues during hunting in the cuttlefish *Sepia officinalis* (Cephalopoda). *The Biological Bulletin*, 210, 192-200.
- Adams, P.D. & Klopper, J.W. (2002). Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant and Soil*, 240, 181-189.
- Agarwal, P., Kapoor, S. & Tyagi, A.K. (2011). Transcription factors regulating the progression of monocot and dicot seed development. *BioEssays*, 33, 189-202.
- Aira, M., Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Bååth, E. & Domínguez, J. (2010). Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 2276-2281.
- Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., *et al.* (2002). Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature Genetics*, 32, 402-407.
- Alfano, J.R. & Collmer, A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology*, 179, 5655-5662.
- Allwood, A.C., Grotzinger, J.P., Knoll, A.H., Burch, I.W., Anderson, M.S., Coleman, M.L., *et al.* (2009). Controls on development and diversity of Early Archean stromatolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 9548 -9555.
- Almasri, M.N. & Kaluarachchi, J.J. (2007). Modeling nitrate contamination of groundwater in agricultural watersheds. *Journal of Hydrology*, 343, 211-229.
- Amo, L., López, P. & Martín, J. (2004). Chemosensory recognition of its lizard prey by the ambush smooth snake, *Coronella austriaca*. *Journal of Herpetology*, 38, 451-454.
- Amvrazi, E.G. & Albanis, T.A. (2009). Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected. *Food Chemistry*, 113, 253-261.

- An, G.-H., Kobayashi, S., Enoki, H., Sonobe, K., Muraki, M., Karasawa, T., *et al.* (2009). How does arbuscular mycorrhizal colonization vary with host plant genotype? An example based on maize (*Zea mays*) germplasms. *Plant and Soil*, 327, 441-453.
- Anderson, J.P., Gleason, C.A., Foley, R.C., Thrall, P.H., Burdon, J.B. & Singh, K.B. (2010). Plants versus pathogens: an evolutionary arms race. *Functional Plant Biology*, 37, 499-512.
- Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P. & Engstrand, L. (2008). Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One*, 3, e2836.
- Araújo da Silva, K.R., Salles, J.F., Seldin, L. & van Elsas, J.D. (2003). Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods*, 54, 213-231.
- Armougom, F. & Raoult, D. (2009). Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. *Journal of Computer Science and Systems Biology*, 2, 69–92.
- Arnold, A.E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21, 51-66.
- Aulakh, M.S., Wassmann, R., Bueno, C., Kreuzwieser, J. & Rennenberg, H. (2001). Characterization of root exudates at different growth stages of ten rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Plant Biology*, 3, 139-148.
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A. & Gordon, J.I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307, 1915 -1920.
- 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. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 642-650.
- Baelum, J., Nicolaisen, M.H., Holben, W.E., Strobel, B.W., Sorensen, J. & Jacobsen, C.S. (2008). Direct analysis of *tfdA* gene expression by indigenous bacteria in phenoxy acid amended agricultural soil. *ISME Journal*, 2, 677-687.
- 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*, 57, 233-266.
- Baker, K., Cook, R.J. & Garrett, S.D. (1974). *Biological control of plant pathogens*. WH Freeman and Company.

- Balandreau, J., Viallard, V., Cournoyer, B., Coenye, T., Laevens, S. & Vandamme, P. (2001). *Burkholderia cepacia* Genomovar III is a common plant-associated bacterium. *Appl. Environmental Microbiology*, 67, 982-985.
- Baldani, V.L.D. & Döbereiner, J. (1980). Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 12, 433-439.
- Bannert, A., Kleinedam, K., Wissing, L., Mueller-Niggemann, C., Vogelsang, V., Welzl, G., *et al.* (2011). Changes in diversity and functional gene abundances of microbial communities involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification comparing a tidal wetland to paddy soils cultivated for different time periods. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.01751-10.
- Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R. & Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1761.
- Barlow, A., Pook, C.E., Harrison, R.A. & Wüster, W. (2009). Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276, 2443 -2449.
- Barney, B.M., Yurth, M.G., Dos Santos, P.C., Dean, D.R. & Seefeldt L.C. (2009). A substrate channel in the nitrogenase MoFe protein. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 14, 1015-1022.
- Barrett, L.G., Kniskern, J.M., Bodenhausen, N., Zhang, W. & Bergelson, J. (2009). Continuum of specificity and virulence in plant host-pathogen interactions: causes and consequences. *New Phytologist*, 183, 513-529.
- De Bary, A. (1879). The phenomenon of symbiosis. *Strasbourg, France*.
- Bashan, Y. & de-Bashan, L.E. (2010). How the Plant Growth-Promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - A critical assessment. Academic Press, p. 77-136.
- Baucom, R.S. & de Roode, J.C. (2011). Ecological immunology and tolerance in plants and animals. *Functional Ecology*, 25, 18-28.
- Baudoin, E., Benizri, E. & Guckert, A. (2003). Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1183-1192.
- Baudoin, E., Nazaret, S., Mougél, C., Ranjard, L. & Moënné-Loccoz, Y. (2009) Impact of inoculation with the phytostimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 409-413.

- Baum, C., Toljander, Y.K., Eckhardt, K.-U. & Weih, M. (2009). The significance of host-fungus combinations in ectomycorrhizal symbioses for the chemical quality of willow foliage. *Plant and Soil*, 323, 213-224.
- Baumann, P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology*, 59, 155–189.
- Baumann, P., Baumann, L., Lai, C.-Y., Rouhbakhsh, D., Moran, N.A. & Clark, M.A. (1995). Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: Intracellular symbionts of aphids. *Annual Review of Microbiology*, 49, 55-94.
- Bautista, G.H.H., Cruz, H.A., Nesme, X., Valdés, M., Mendoza, H.A. & Fernandez, M.P. (2011). Genomespecies identification and phylogenomic relevance of AFLP analysis of isolated and non-isolated strains of *Frankia* spp. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 200-206.
- Baxter, J. & Cummings, S.P. (2008). The degradation of the herbicide bromoxynil and its impact on bacterial diversity in a top soil. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1605-1616.
- Baymann, F., Lebrun, E., Brugna, M., Schoepp–Cothenet, B., Giudici–Ortoni, M. & Nitschke, W. (2003). The redox protein construction kit: pre-last universal common ancestor evolution of energy-conserving enzymes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358, 267 -274.
- Becking, L.G.M.B. (1934). *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*. WP Van Stockum & Zoon.
- Beijerinck, M. (1913). De infusies en de ontdekking der bacteriën. *Müller, Amsterdam, The Netherlands*.
- Benson, D.R. & Silvester, W. (1993). Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 57, 293.
- Berg, G. & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68, 1-13.
- Bergelson, J. & Purrington, C.B. (1996). Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *The American Naturalist*, 148, 536-558.
- Bergsma-Vlami, M., Prins, M.E. & Raaijmakers, J.M. (2005). Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, 52, 59-69.

- Bertin, C., Yang, X. & Weston, L.A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 256, 67-83.
- Bhattarai, T. & Hess, D. (1993). Yield responses of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. *Plant and Soil*, 151, 67-76.
- Blaha, D., Prigent-Combaret, C., Mirza, M.S. & Moëgne-Loccoz, Y. (2006d). Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, 56, 455-470.
- Bloemberg, G.V. & Lugtenberg, B.J.. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 343-350.
- Bowen, G.D. & Rovira, A.D. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*, 66, 1-102.
- Boyce, C.K. (2008). How green was Cooksonia? The importance of size in understanding the early evolution of physiology in the vascular plant lineage. *Paleobiology*, 34, 179-194.
- Boyer, J.N. & Groffman, P.M. (1996). Bioavailability of water extractable organic carbon fractions in forest and agricultural soil profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 783-790.
- Bremer, C., Braker, G., Matthies, D., Reuter, A., Engels, C. & Conrad, R. (2007). Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of *nirK*-type denitrifier communities in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6876-6884.
- Brigham, L.A., Michaels, P.J. & Flores, H.E. (1999). Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant physiology*, 119, 417.
- Brinza, L., Viñuelas, J., Cottret, L., Calevro, F., Rahbé, Y., Febvay, G., *et al.* (2009). Systemic analysis of the symbiotic function of *Buchnera aphidicola*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Comptes Rendus Biologies*, 332, 1034-1049.
- Briones, A.M., Okabe, S., Umemiya, Y., Ramsing, N.-B., Reichardt, W. & Okuyama, H. (2002). Influence of different cultivars on populations of ammonia-oxidizing bacteria in the root environment of rice. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3067-3075.

- Brocks, J.J., Logan, G.A., Buick, R. & Summons, R.E. (1999). Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science*, 285, 1033 -1036.
- Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D. & Noller, H.F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 148, 107-127.
- Broz, A.K., Manter, D.K. & Vivanco, J.M. (2007). Soil fungal abundance and diversity: another victim of the invasive plant *Centaurea maculosa*. *ISME Journal*, 1, 763-765.
- Buchner, P. (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms (Interscience, New York), p 909.
- Callot, G., Chamayou, H., Maertens, C. & Salsac, L. (1982). A better understanding of soil-roots interactions. Effects on mineral nutrition.
- Camus-Kulandaivelu, L., Veyrieras, J.-B., Madur, D., Combes, V., Fourmann, M., Barraud, S., *et al.* (2006e). Maize adaptation to temperate climate: Relationship between population structure and polymorphism in the *Dwarf8* gene. *Genetics*, 172, 2449-2463.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., *et al.* (2010). Colloquium paper: Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4516-4522.
- Cary, S.C. & Giovannoni, S.J. (1993). Transovarial inheritance of endosymbiotic bacteria in clams inhabiting deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 5695 -5699.
- Castro-González, R., Martínez-Aguilar, L., Ramírez-Trujillo, A., Estrada-de los Santos, P. & Caballero-Mellado, J. (2011). High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 345, 155-169.
- Cavalier-Smith, T. (2000). Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends in Plant Science*, 5, 174-182.
- Chaston, J. & Goodrich-Blair, H. (2010). Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 41-58.
- Chaucheyras-Durand, F. & Durand, H. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes*, 1, 3-9.

- Che, F.-S., Nakajima, Y., Tanaka, N., Iwano, M., Yoshida, T., Takayama, S., *et al.* (2000). Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 32347-32356.
- Chen, C., Condrón, L., Davis, M. & Sherlock, R. (2002). Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 487-499.
- Chen, W.M., Laevens, S., Lee, T.M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., *et al.* (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1729-1735.
- Chen, X., Li, S. & Aksoy, S. (1999). Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: Molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *Journal of Molecular Evolution*, 48, 49-58.
- Chernova, O.F. (2006). Evolutionary aspects of hair polymorphism. *Biology Bulletin*, 33, 43-52.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. & Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124, 803-814.
- Clement, C.R. & Habte, M. (1995). Genotypic variation in vesicular-arbuscular mycorrhizal dependence of the peji-baye palm. *Journal of Plant Nutrition*, 18, 1907-1916.
- Coelho, M.R.R., Marriel, I.E., Jenkins, S.N., Lanyon, C.V., Seldin, L. & O'Donnell, A.G. (2009a). Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Applied Soil Ecology*, 42, 48-53.
- Coenye, T. & Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, 5, 719-729.
- Cohan, F.M. & Perry, E.B. (2007). A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Current Biology*, 17, R373-R386.
- Comas, L.H. & Eissenstat, D.M. (2009a). Patterns in root trait variation among 25 co-existing North American forest species. *New Phytologist*, 182, 919-928.
- Combes-Meynet, E. (2010). Thèse Université Claude Bernard Lyon 1 : *Impact de signaux rhizosphériques sur l'expression de gènes phytobénéfiques chez les bactéries symbiotiques associatives.*

- Compant, S., Clément, C. & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 669-678.
- Cooper, J.E. (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1355-1365.
- Coque, M., Bertin, P., Hirel, B. & Gallais, A. (2006). Genetic variation and QTLs for 15N natural abundance in a set of maize recombinant inbred lines. *Field crops research*, 97, 310–321.
- Costa, R., Götz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G. & Smalla, K. (2006). Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology*, 56, 236-249.
- Côté, C., Boileau, F., Roy, V., Ouellet, M., Levasseur, C., Morency, M.J., *et al.* (2010). Gene family structure, expression and functional analysis of HD-Zip III genes in angiosperm and gymnosperm forest trees. *BMC Plant Biology*, 10, 273.
- Couillerot, O., Bouffaud, M.-L., Baudoin, E., Muller, D., Caballero-Mellado, J. & Moënnelocoz, Y. (2010a). Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 2298-2305.
- Couillerot, O., Poirier, M.-A., Prigent-Combaret, C., Mavingui, P., Caballero-Mellado, J. & Moënnelocoz, Y. (2010b). Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. *Journal of Applied Microbiology*, 9999.
- Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J. & Moënnelocoz, Y. (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 505-512.
- Curl, E.A. & Truelove, B. (1986) *The Rhizosphere*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- Czarnota, M.A., Rimando, A.M. & Weston, L.A. (2003). Evaluation of root exudates of seven sorghum accessions. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 2073-2083.
- Dajoz, R. (2006). Précis d'écologie 8ème éd. Dunod, Paris.
- Dale, C. & Moran, N.A. (2006). Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell*, 126, 453-465.
- Dalmastri, C., Chiarini, L., Cantale, C., Bevivino, A. & Tabacchioni, S. (1999). Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. *Microbial Ecology*, 38, 273-284.



- Dandie, C.E., Wertz, S., Leclair, C.L., Goyer, C., Burton, D.L., Patten, C.L., *et al.* (2011). Abundance, diversity and functional gene expression of denitrifier communities in adjacent riparian and agricultural zones. *FEMS Microbiology Ecology*, 77, 69-82.
- Da Rocha, D.N., van Overbeek, L. & van Elsas, J.D. (2009). Exploration of hitherto-uncultured bacteria from the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 69, 313-328.
- Darst, C.R. & Cummings, M.E. (2006). Predator learning favours mimicry of a less-toxic model in poison frogs. *Nature*, 440, 208-211.
- DeAngelis, K.M., Brodie, E.L., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Lindow, S.E. & Firestone, M.K. (2009). Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. *ISME Journal*, 3, 168-178.
- Denarie, J. & Gianinazzi-Pearson, V. (1997). Red carpet genetic programmes for root endosymbioses. *Trends in Plant Science*, 2, 371–372.
- Dennis, P.G., Miller, A.J. & Hirsch P.R. (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology*, 72, 313-327.
- De Wit, R. & Bouvier, T. (2006). ‘Everything is everywhere, but, the environment selects’; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology*, 8, 755–758.
- Diamond, J. (2002a). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418, 700-707.
- Dixon, R. & Kahn, D. (2004a). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Review Microbiology*, 2, 621-631.
- Doebly, J. (2004a). The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics*, 38, 37-59.
- Domenici, P., Claireaux, G. & McKenzie, D.. (2007). Environmental constraints upon locomotion and predator–prey interactions in aquatic organisms: an introduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362, 1929 - 1936.
- de Dorlodot, S., Forster, B., Pagès, L., Price, A., Tuberosa, R. & Draye, X. (2007). Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in Plant Science*, 12, 474-481.
- Downie, J.A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 150-170.

- Drew, E.A. & Ballard, R.A. (2010). Improving N<sub>2</sub> fixation from the plant down: Compatibility of *Trifolium subterraneum* L. cultivars with soil rhizobia can influence symbiotic performance. *Plant and Soil*, 327, 261-277.
- Dreyfus, B., Garcia, J.L. & Gillis, M. (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38, 89-98.
- Dubeikovskiy, A.N., Mordukhova, E.A., Kochetkov, V.V., Polikarpova, F.Y. & Boronin, A.M. (1993). Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 1277-1281.
- Dubreuil, P., Warburton, M., Chastanet, M., Hoisington, D. & Charcosset, A. (2006). More on the introduction of temperate maize into Europe: large-scale bulk SSR genotyping and new historical elements. *Maydica*, 51, 281-291.
- de Duve, C. (2007). The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nature Reviews Genetics*, 8, 395-403.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. & Böttger, E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17, 7843-7853.
- Ehrlich, P. & Raven, P. (1964). Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution*, 18, 586-608.
- El Zemrany, H., Cortet, J., Peter Lutz, M., Chabert, A., Baudoin, E., Haurat, J., et al. (2006). Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 1712-1726.
- Elad, Y. & Freeman, S. (2002). Chapter 6: Biological control of fungal plant pathogens. In: *The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. Springer. Kempken.
- Engelhard, M., Hurek, T. & Reinhold-Hurek, B. (2000). Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environmental Microbiology*, 2, 131-141.
- Escobar, M.A. & Dandekar, A.M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8, 380-386.

- Faith, J.J., McNulty, N.P., Rey, F.E. & Gordon, J.I. (2011). Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science*, 333, 101.
- Falcon, L.I., Magallon, S. & Castillo, A. (2010). Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast. *ISME Journal*, 4, 777-783.
- Falkowski, P.G., Fenchel, T. & Delong, E.F. (2008). The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles. *Science*, 320, 1034 -1039.
- Fan, T.W., Lane, A.N., Shenker, M., Bartley, J.P., Crowley, D. & Higashi, R.M. (2001). Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS. *Phytochemistry*, 57, 209–221.
- Fierer, N.N & Jackson, R.B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 626-631.
- Fierer, N., Schimel, J.P. & Holden, P.A. (2003). Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 167-176.
- Figliuolo, G. & Perrino, P. (2004). Genetic diversity and intra-specific phylogeny of *Triticum turgidum* L. subsp. *dicoccon* (Schrank) Thell. revealed by RFLPs and SSRs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51, 519–527.
- Fischer, O. & Schmid-Hempel, P. (2005). Selection by parasites may increase host recombination frequency. *Biology Letters*, 1, 193 -195.
- Fitter, A.H. (2005). Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology*, 93, 231–243.
- Forde, S.E., Thompson, J.N., Holt, R.D. & Bohannan, B.J.M. (2008). Coevolution drives temporal changes in fitness and diversity across environments in a bacteria–bacteriophage interaction. *Evolution*, 62, 1830-1839.
- Forterre, P., Gribaldo, S. & Brochier, C. (2005). Luca: À la recherche du plus proche ancêtre commun universel. *médecine/sciences*, 21, 860-865.
- Foster, J., Ganatra, M., Kamal, I., Ware, J., Makarova, K., Ivanova, N., *et al.* (2005). The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biology*, 3, e121.
- Foster, R.A., Subramaniam, A. & Zehr, J.P. (2009). Distribution and activity of diazotrophs in the Eastern Equatorial Atlantic. *Environmental Microbiology*, 11, 741-750.

- Fowler, D.W., Freedman, E.A. & Scannella, J.B. (2009). Predatory functional morphology in raptors: interdigital variation in talon size is related to prey restraint and Immobilisation technique. *PLoS ONE*, 4, e7999.
- Franche, C., Lindström, K. & Elmerich, C. (2009a). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and soil*, 321, 35–59.
- Frank, S.A. (1996). Host control of symbiont transmission: The separation of symbionts into germ and soma. *The American Naturalist*, 148, 1113-1124.
- Fraser, C., Alm, E.J., Polz, M.F., Spratt, B.G. & Hanage, W.P. (2009). The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science*, 323, 741-746.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. & Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176, 22-36.
- Fröhlich, J., Hyde, K.D. & Petrini, O. (2000). Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research*, 104, 1202-1212.
- Fuentes-Ramirez, L.E. & Caballero-Mellado, J. (2006). Bacterial Biofertilizers. Dans: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (éd. Siddiqui, Z.A.). Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, p. 143-172.
- Fuller, D.Q. (2007). Contrasting Patterns in Crop Domestication and Domestication Rates: Recent Archaeobotanical Insights from the Old World. *Annals of Botany*, 100, 903 - 924.
- Fussmann, G.F., Loreau, M. & Abrams, P.A. (2007). Eco-evolutionary dynamics of communities and ecosystems. *Functional Ecology*, 21, 465-477.
- Futuyma, D.J. & Agrawal, A.A. (2009). Evolutionary history and species interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 18043 -18044.
- Gans, J., Wolinsky, M. & Dunbar, J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309, 1387 -1390.
- Garbaye, J. (1994). Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 197–210.
- García de Salomone, I. & Döbereiner, J. (1996). Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biology and Fertility of Soils*, 21, 193-196.
- Garcia, T.S. & Sih, A. (2003). Color change and color-dependent behavior in response to predation risk in the salamander sister species *Ambystoma barbouri* and *Ambystoma texanum*. *Oecologia*, 137, 131-139.
- Gensel, P.G. (2008). The Earliest Land Plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 39, 459-477.

- Germida, J. & Siciliano, S. (2001). Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. *Biology and Fertility of Soils*, 33, 410-415.
- Gil, R., Silva, F.J., Zientz, E., Delmotte, F., González-Candelas, F., Latorre, A., *et al.* (2003). The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative analysis of reduced genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 9388 -9393.
- Gilbert, G.S. & Webb, C.O. (2007). Phylogenetic signal in plant pathogen–host range. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 4979-4983.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.-C., *et al.* (2007). Legumes symbioses: Absence of nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*, 316, 1307 -1312.
- Gobat, J.M., Aragno, M. & Matthey, W. (2010). *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*. 3<sup>e</sup> edn. Presses polytechniques et universitaires romandes.
- Gomes, N.C.M., Cleary, D.F.R., Pinto, F.N., Egas, C., Almeida, A., Cunha, A., *et al.* (2010). Taking root: Enduring effect of rhizosphere bacterial colonization in mangroves. *PLoS ONE*, 5, e14065.
- Gomez, J.M., Verdu, M. & Perfectti, F. (2010). Ecological interactions are evolutionarily conserved across the entire tree of life. *Nature*, 465, 918-921.
- González-Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M.S., Malouin, F. & Bouarab, K. (2009). Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 3400–3419.
- González-Rodríguez, R.M., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B. & Simal-Gándara, J. (2008). Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. *Food Chemistry*, 107, 1342-1347.
- Götz, M., Nirenberg, H., Krause, S., Wolters, H., Draeger, S., Buchner, A., Lottmann, J., *et al.* (2006). Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 58, 404-413.
- Gransee, A. & Wittenmayer, L. (2000). Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163, 381-385.
- Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C.D. & Edwards, A.C. (1998). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 369-378.

- Greaves, J.A. (1996). Improving suboptimal temperature tolerance in maize- the search for variation. *Journal of Experimental Botany*, 47, 307 -323.
- Greene, H.W. & McDiarmid, R.W. (1981). Coral snake mimicry: Does it occur? *Science*, 213, 1207-1212.
- Gregory, P., Ingram, J., Andersson, R., Betts, R., Brovkin, V., Chase, T., *et al.* (2002). Environmental consequences of alternative practices for intensifying crop production. *Agriculture, ecosystems & environment*, 88, 279–290.
- Gross, J. & Bhattacharya, D. (2009). Mitochondrial and plastid evolution in eukaryotes: an outsiders' perspective. *Nature Review Genetics*, 10, 495-505.
- Gu, Y.-H. & Mazzola, M. (2003). Modification of fluorescent pseudomonad community and control of apple replant disease induced in a wheat cultivar-specific manner. *Applied Soil Ecology*, 24, 57-72.
- Guidot, A., Verner, M.-C., Debaud, J.-C. & Marmeisse, R. (2005). Intraspecific variation in use of different organic nitrogen sources by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycorrhiza*, 15, 167-177.
- Haas, D. & Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 307-319.
- Haichar, F.E.Z., Marol, C., Berge, O. *et al.* (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME Journal*, 2, 1221-1230.
- Hall, M. & Ross, C. (2007). Eye shape and activity pattern in birds. *Journal of Zoology*, 271, 437–444.
- Hartmann, A. & Bashan, Y. (2009). Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB) - Special Issue. *European Journal of Soil Biology*, 45, 1-2.
- Hartmann, A., Rothballer, M. & Schmid, M. (2008a). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312, 7-14.
- Hartmann, A., Schmid, M., Tuinen, D. van & Berg, G. (2008b). Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*, 321, 235-257.
- Heddi, A., Vallier, A., Anselme, C., Xin, H., Rahbe, Y. & Wäckers, F. (2005). Molecular and cellular profiles of insect bacteriocytes: mutualism and harm at the initial evolutionary step of symbiogenesis. *Cellular Microbiology*, 7, 293–305.
- Hedges, S.B. (2002). The origin and evolution of model organisms. *Nature Reviews Genetics*, 3, 838-849.

- Den Herder, G., Van Isterdael, G., Beeckman, T. & De Smet, I. (2010). The roots of a new green revolution. *Trends in Plant Science*, 15, 600-607.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B. & Boddey, R.M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311, 1-18.
- Hetrick, B.A.D., Wilson, G.W.T. & Cox, T.S. (1993). Mycorrhizal dependence of modern wheat cultivars and ancestors: a synthesis. *Canadian Journal of Botany*, 71, 512-518.
- Hill, G.T., Mitkowski, N.A., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L.R., Jurkonie, D.D., Ficke, A., Maldonado-Ramirez, S., *et al.* (2000). Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 15, 25-36.
- Hiltner, I. (1904). New experience and problems of the role of land bacteria under special considerations of formation and utilization. *Journal of German Agriculture Research*, 98, 59-63.
- Hinsinger, P ; Gobran, G.R., Gregory, P.J. & Wenzel, W.W. (2005). Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist*, 168, 293-303.
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D. & Young, I.M. (2009). Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*, 321, 117-152.
- Hirsch, A.M., Lum, M.R. & Downie, J.A. (2001). What makes the Rhizobia-Legume symbiosis so special? *Plant Physiology*, 127, 1484 -1492.
- Hocher, V., Alloisio, N., Auguy, F., Fournier, P., Dumas, P., Pujic, P., *et al.* (2011). Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade. *Plant Physiology*, 156, 700 -711.
- Hochholdinger, F. & Zimmermann, R. (2008). Conserved and diverse mechanisms in root development. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 70-74.
- Hodge, C.D., Wang, H. & Sun, G. (2010). Phylogenetic analysis of the maternal genome of tetraploid StStYY *Elymus* (*Triticeae*: *Poaceae*) species and the monogenomic *Triticeae* based on *rps16* sequence data. *Plant Science*, 178, 463-468.
- Hongoh, Y., Deevong, P., Inoue, T., Moriya, S., Trakulnaleamsai, S., Ohkuma, M., *et al.* (2005). Intra-and interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. *Applied and environmental microbiology*, 71, 6590.
- Hooper, L.V. & Gordon, J.I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292, 1115 -1118.

- Hsu, S.-F. & Buckley, D.H. (2009). Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. *ISME Journal*, 3, 124-136.
- Hughes, N.K., Price, C.J. & Banks, P.B. (2010). Predators are attracted to the olfactory signals of prey. *PLoS ONE*, 5, e13114.
- Hussain, S., Siddique, T., Saleem, M., Arshad, M. & Khalid, A. (2009). Chapter 5 Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. Academic Press, p. 159-200.
- Huss-Danell, K. (1991). Influence of host (*Alnus* and *Myrica*) genotype on infectivity, N<sub>2</sub> fixation, spore formation and hydrogenase activity in *Frankia*. *New phytologist*, 119, 121–127.
- Inbar, M. & Lev-Yadun, S. (2005). Conspicuous and aposematic spines in the animal kingdom. *Naturwissenschaften*, 92, 170-172.
- Inceoglu, O., Salles, J.F., van Overbeek, L. & van Elsas, J.D. (2010). Effects of Plant Genotype and Growth Stage on the Betaproteobacterial Communities Associated with Different Potato Cultivars in Two Fields. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3675-3684.
- Iriarte-Díaz, J. (2002). Differential scaling of locomotor performance in small and large terrestrial mammals. *Journal of Experimental Biology*, 205, 2897 -2908.
- Izquierdo, J.A. & Nüsslein, K. (2006). Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. *Microbial Ecology*, 51, 441-452.
- Jacoud, C., Job, D., Wadoux, P. & Bally, R. (1999). Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Canadian Journal of Microbiology*, 45, 339-342.
- Jamali, F., Sharifi-Tehrani, A., Lutz, M.P. & Maurhofer, M. (2009). Influence of host plant genotype, presence of a pathogen, and coinoculation with *Pseudomonas fluorescens* strains on the rhizosphere expression of hydrogen cyanide- and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes in *P. fluorescens* biocontrol strain CHA0. *Microbial Ecology*, 57, 267-275.
- Jeong, S.C., Ritchie, N.J. & Myrold, D.D. (1999). Molecular phylogenies of plants and *Frankia* support multiple origins of actinorhizal symbioses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13, 493-503.
- Johnston-Monje, D. & Raizada, M.N. (2011). Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS ONE*, 6, e20396.



- Jones, D.L., Hodge, A. & Kuzyakov, Y. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist*, 163, 459–480.
- Jones, J., Holloway, B., Ketcham, E. & Long, J. (2008). Senses and sensibility: Predator-prey experiments reveal how fish perceive and respond to threats. *The American Biology Teacher*, 70, 462-467.
- Kaepler, S.M., Parke, J.L., Mueller, S.M., Senior, L., Stuber, C. & Tracy, W.F. (2000). Variation among maize inbred lines and detection of quantitative trait loci for growth at low phosphorus and responsiveness to arbuscular mycorrhizal fungi. *Crop Science*, 40, 358–364.
- Kelman, E., Baddeley, R., Shohet, A. & Osorio, D. (2007). Perception of visual texture and the expression of disruptive camouflage by the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 1369 -1375.
- Kenrick, P. & Crane, P.R. (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, 389, 33-39.
- Kettlewell, H.B.D. (1961). The phenomenon of industrial melanism in lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 6, 245-262.
- Khalid, A., Arshad, M. & Zahir, Z.A. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 473-480.
- Khalil, S., Loynachan, T.E., & Tabatabai, A. (1994). Mycorrhizal dependency and nutrient uptake by improved and unimproved corn and soybean cultivars. *Agronomy journal*, 86, 949–958.
- Khush, G.S. (2001). Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics*, 2, 815-822.
- King, E.B. (1993). Biocontrol of *Aphanomyces* root rot and *Pythium* damping-off by *Pseudomonas cepacia* AMMD on four pea cultivars. *Plant Disease*, 77, 1185.
- Kinkel, L.L., Bakker, M.G. & Schlatter, D.C. (2011). A coevolutionary framework for managing disease-suppressive soils. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 47-67.
- Knauth, S., Hurek, T., Brar, D. & Reinhold-Hurek, B. (2005). Influence of different *Oryza* cultivars on expression of nifH gene pools in roots of rice. *Environmental Microbiology*, 7, 1725-1733.
- Kneip, C., Lockhart, P., Voß, C. & Maier, U.G. (2007). Nitrogen fixation in eukaryotes—new models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 55.

- Kohn, T.A., Burroughs, R., Hartman, M.J. & Noakes, T.D. (2011). Fiber type and metabolic characteristics of lion (*Panthera leo*), caracal (*Caracal caracal*) and human skeletal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 159, 125-133.
- Kovacs, A., Ben-Jacob, N., Tayem, H., Halperin, E., Iraqi, F.A. & Gophna, U. (2011). Genotype is a stronger determinant than sex of the mouse gut microbiota. *Microbial Ecology*, 1–6.
- Krishna, K.R., Shetty, K.G., Dart, P.J. & Andrews, D.J. (1985). Genotype dependent variation in mycorrhizal colonization and response to inoculation of pearl millet. *Plant and Soil*, 86, 113-125.
- Krishnan, H.B., Kuo, C.-I. & Pueppke, S.G. (1995). Elaboration of flavonoid-induced proteins by the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* is regulated by both *nodD1* and *nodD2*, and is dependent on the cultivar-specificity locus, *nolXWBTUV*. *Microbiology*, 141, 2245-2251.
- Krishnan, H.B., Lorio, J., Kim, W.S., Jiang, G., Kim, K.Y., DeBoer, M., *et al.* (2003). Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 617-625.
- Kucho, K.-ichi, Hay, A.-E. & Normand, P. (2010). The determinants of the Actinorhizal symbiosis. *Microbes and Environments*, 25, 241-252.
- Kyselkova, M., Kopecky, J., Frapolli, M., Defago, G., Sagova-Mareckova, M., Grundmann, G.L., *et al.* (2009). Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. *ISME Journal*, 3, 1127-1138.
- Labate, J.A., Lamkey, K.R., Mitchell, S.E., Kresovich, S., Sullivan, H. & Smith, J.S.C. (2003). Molecular and historical aspects of Corn Belt Dent diversity. *Crop Science*, 43, 80-91.
- Lambers, H., Mougel, C., Jaillard, B. & Hinsinger, P. (2009). Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil*, 321, 83-115.
- Langdale, J.A. (2008). Evolution of developmental mechanisms in plants. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18, 368-373.

- Lassalle, F., Campillo, T., Vial, L., Baude, J., Costechareyre, D., Chapulliot, D., *et al.* (2011). Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biology and Evolution*, 3, 762.
- Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P. & Briat, J.F. (2009). Role of iron in plant-microbe interactions. *Advances in Botanical Research*, 51, 491–549.
- Lemanceau, P., Samson, R. & Alabouvette, C. (1988). Recherches sur la résistance des sols aux maladies. XV. Comparaison des populations de *Pseudomonas fluorescents* dans un sol résistant et un sol sensible aux fusarioses vasculaires. *Agronomie*, 8, 243–249.
- León-Barrios, M., Lorite, M.J., Donate-Correa, J. & Sanjuán, J. (2009). *Ensifer meliloti* bv. *lancerottense* establishes nitrogen-fixing symbiosis with *Lotus* endemic to the Canary Islands and shows distinctive symbiotic genotypes and host range. *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 413-420.
- Lev-Yadun, S. (2001). Aposematic (warning) coloration associated with thorns in higher plants. *Journal of Theoretical Biology*, 210, 385-388.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., *et al.* (2008a). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320, 1647 -1651.
- Ley, R.E., Lozupone, C.A., Hamady, M., Knight, R. & Gordon, J.I. (2008b). Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 776-788.
- Li, M., Zhou, M., Adamowicz, E., Basarab, J.A. & Guan, L.L. (2011). Characterization of bovine ruminal epithelial bacterial communities using 16S rRNA sequencing, PCR-DGGE, and qRT-PCR analysis. *Veterinary Microbiology*, In press.
- Li, X., Weng, J. & Chapple, C. (2008). Improvement of biomass through lignin modification. *The Plant Journal*, 54, 569-581.
- Liddycoat, S.M., Greenberg, B.M. & Wolyn, D.J. (2009). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on asparagus seedlings and germinating seeds subjected to water stress under greenhouse conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 55, 388-394.
- Line, M.A. (2002). The enigma of the origin of life and its timing. *Microbiology*, 148, 21 -27.
- Liu, L. (1995). Induction of systemic resistance in cucumber by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology*, 85, 1064.

- Losos, J.B. (2008). Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecology Letters*, 11,985-1007.
- Love, G.D., Grosjean, E., Stalvies, C., Fike, D.A., Grotzinger, J.P., Bradley, A.S., *et al.* (2009). Fossil steroids record the appearance of *Demospongiae* during the Cryogenian period. *Nature*, 457, 718-722.
- Lozupone, C.A. & Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 11436.
- Lugtenberg, B. & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 63, 541-556.
- Lynch, J.M. & Whipps, J.M. (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 129, 1-10.
- Maccaferri, M., Stefanelli, S., Rotondo, F., Tuberosa, R. & Sanguineti, M.C. (2007). Relationships among durum wheat accessions. I. Comparative analysis of SSR, AFLP, and phenotypic data. *Génome*, 50, 373-384.
- Mackessy, S.P., Sixberry, N.M., Heyborne, W.H. & Fritts, T. (2006). Venom of the brown treesnake, *Boiga irregularis*: Ontogenetic shifts and taxa-specific toxicity. *Toxicon*, 47, 537-548.
- Magallón, S. & Castillo, A. (2009). Angiosperm diversification through time. *American Journal of Botany*, 96, 349 -365.
- Majerus, M.E.N. (2009). Industrial melanism in the peppered moth, *Biston betularia*: An excellent teaching example of Darwinian evolution in action. *Evolution: Education and Outreach*, 2, 63-74.
- Mappes, J., Marples, N. & Endler, J.A. (2005). The complex business of survival by aposematism. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 598-603.
- Mark, G.L., Dow, J.M., Kiely, P.D., Higgins, H., Haynes, J., Baysse, C., *et al.* (2005). Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 17454 -17459.
- Marmeisse, R., Guidot, A., Gay, G., Lambilliotte, R., Sentenac, H., Combiér, J. -P, *et al.* (2004). *Hebeloma cylindrosporum*— a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytologist*, 163, 481-498.

- Marschner, P., Yang, C.-H., Lieberei, R. & Crowley, D.E. (2001). Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1437-1445.
- Mårtensson, L., Díez, B., Warttinen, I., Zheng, W., El-Shehawy, R. & Rasmussen, U. (2009). Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China. *Plant and Soil*, 325, 207-218.
- Martin, G.R. (2007). Visual fields and their functions in birds. *Journal of Ornithology*, 148, 547-562.
- Martin, W., Rotte, C., Hoffmeister, M., Theissen, U., Gelius-Dietrich, G., Ahr, S., *et al.* (2003). Early cell evolution, eukaryotes, anoxia, sulfide, oxygen, fungi first (?), and a tree of genomes Revisited. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 55, 193-204.
- Martínez-Romero, E. (2009). Coevolution in *Rhizobium*-legume symbiosis? *DNA and Cell Biology*, 28, 361-370.
- Martiny, J.B.H., Bohannan, B.J.M., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green, J.L., *et al.* (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 102–112.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. & Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in microbiology*, 17, 458–466.
- Matson, P.A., Parton, W.J., Power, A.G. & Swift, M.J. (1997). Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science*, 277, 504 -509.
- Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O. & Kasper, D.L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122, 107-118.
- Mazurier, S., Corberand, T., Lemanceau, P. & Raaijmakers, J.M. (2009). Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wilt. *The ISME journal*, 3, 977–991.
- McKenna, P., Hoffmann, C., Minkah, N., Aye, P.P., Lackner, A., Liu, Z., *et al.* (2008). The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis. *PLoS pathogens*, 4, e20.
- Medzhitov, R. (2009). Damage control in host–pathogen interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 15525 -15526.

- Merilaita, S. & Tullberg, B.S. (2005). Constrained camouflage facilitates the evolution of conspicuous warning coloration. *Evolution*, 59, 38-45.
- Meyer, J.B., Lutz, M.P., Frapolli, M., Pechy-Tarr, M., Rochat, L., Keel, C., *et al.* (2010). Interplay between wheat cultivars, biocontrol pseudomonads, and soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 6196-6204.
- Micallef, S.A., Shiaris, M.P. & Colon-Carmona, A. (2009). Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *Journal of Experimental Botany*, erp053.
- Miller, M.R., White, A. & Boots, M. (2005). The evolution of host resistance: Tolerance and control as distinct strategies. *Journal of Theoretical Biology*, 236, 198-207.
- Mills, D.K., Fitzgerald, K., Litchfield, C.D. & Gillevet, P.M. (2003). A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils. *Journal of Microbiological Methods*. 54, 57-74.
- Minic, Z. & Hervé, G. (2004). Biochemical and enzymological aspects of the symbiosis between the deep-sea tubeworm *Riftia pachyptila* and its bacterial endosymbiont. *European Journal of Biochemistry*, 271, 3093-3102.
- Møller, A.P. & Erritzøe, J. (2010). Flight distance and eye size in birds. *Ethology*, 116, 458-465.
- Montañez, A., Abreu, C., Gill, P.R., Hardarson, G. & Sicardi, M. (2008). Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by <sup>15</sup>N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biology and Fertility of Soils*, 45, 253-263.
- Moran, N.A., McCutcheon, J.P. & Nakabachi, A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual review of genetics*, 42, 165–190.
- Morgan, J.A., Martin, J.F. & Bouchard, V. (2008). Identifying plant species with root associated bacteria that promote nitrification and denitrification in ecological treatment systems. *Wetlands*, 28, 220-231.
- Mougi, A. (2010). Coevolution in a one predator–two prey system. *PloS one*, 5, e13887.
- Mougi, A. & Iwasa, Y. (2011). Unique coevolutionary dynamics in a predator-prey system. *Journal of Theoretical Biology*, 277, 83-89.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. & Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the  $\alpha$ -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411, 948–950.

- Moura, A., Tacão, M., Henriques, I., Dias, J., Ferreira, P. & Correia, A. (2009). Characterization of bacterial diversity in two aerated lagoons of a wastewater treatment plant using PCR-DGGE analysis. *Microbiological Research*, 164, 560-569.
- Moutia, J.F.Y., Saumtally, S., Spaepen, S. & Vanderleyden, J. (2010). Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. *Plant and soil*, 1–10.
- Moya, A., Pereto, J., Gil, R. & Latorre, A. (2008). Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nature Reviews Genetics*, 9, 218-229.
- Müller-Schwarze, D. (2009). Responses of small mammals to predator odors in the field. Dans: *Hands-On Chemical Ecology*. Springer New York, New York, NY, p. 19-24.
- Muñoz-Rojas, J. & Caballero-Mellado, J. (2003). Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial Ecology*, 46, 454-464.
- Nakabachi, A., Shigenobu, S., Sakazume, N., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Carninci, P., *et al.* (2005). Transcriptome analysis of the aphid bacteriocyte, the symbiotic host cell that harbors an endocellular mutualistic bacterium, *Buchnera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 5477.
- Ndour, N.Y.B., Achouak, W., Christen, R., Heulin, T., Brauman, A., & Chotte, J.L. (2008) Characteristics of microbial habitats in a tropical soil subject to different fallow management. *Applied Soil Ecology*, 38, 51-61.
- Neamtu, C.S., Stefan, S. & Bors, A. (2010). Transfer and translocation of organochlorine pesticide residues in an agricultural area of Romania. *International Journal of Environment and Waste Management*, 5, 114–124.
- Newman, D.K. & Banfield, J.F. (2002). Geomicrobiology: How molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. *Science*, 296, 1071 -1077.
- Niboyet, A., Attard, E., Barthes, L., Field, C.B., Guillaumaud, N., Hungate, B.A., *et al.* Responses of soil nitrite-oxidizers to global environmental changes. ESA 2010 Annual Meeting (Symposium 13), 04 August 2010.
- Niklas, K.J. & Kutschera, U. (2010). The evolution of the land plant life cycle. *New Phytologist*, 185, 27-41.
- Nisbet, E.G. & Sleep, N.H. (2001). The habitat and nature of early life. *Nature*, 409, 1083-1091.
- Normand, P., Queiroux, C., Tisa, L.S., Benson, D.R., Rouy, Z., Cruveiller, S., *et al.* (2007). Exploring the genomes of Frankia. *Physiologia Plantarum*, 130, 331–343.

- Nouri, J., Mahvi, A.H., Jahed, G.R. & Babaei, A.A. (2008). Regional distribution pattern of groundwater heavy metals resulting from agricultural activities. *Environmental Geology*, 55, 1337-1343.
- Nussbaumer, A.D., Fisher, C.R. & Bright, M. (2006). Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature*, 441, 345-348.
- Oakley, B., North, M., Franklin, J.F., Hedlund, B.P. & Staley, J.T. (2004). Diversity and distribution of *Frankia* strains symbiotic with *Ceanothus* in California. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6444-6452.
- Offre, P., Pivato, B., Siblot, S., Gamalero, E., Corberand, T., Lemanceau, P., *et al.* (2007). Identification of bacterial groups preferentially associated with mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 913-921.
- Okubara, P.A. & Bonsall, R.F. (2008). Accumulation of *Pseudomonas*-derived 2,4-diacetylphloroglucinol on wheat seedling roots is influenced by host cultivar. *Biological Control*, 46, 322-331.
- Okubara, P.A., Kornoely, J.P. & Landa, B.B. (2004). Rhizosphere colonization of hexaploid wheat by *Pseudomonas fluorescens* strains Q8r1-96 and Q2-87 is cultivar-variable and associated with changes in gross root morphology. *Biological Control*, 30, 392-403.
- Ollivier, J., Kleineidam, K., Reichel, R., Thiele-Bruhn, S., Kotzerke, A., Kindler, R., *et al.* (2010). Effect of sulfadiazine-contaminated pig manure on the abundances of genes and transcripts involved in Nitrogen Transformation in the root-rhizosphere complexes of maize and clover. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7903-7909.
- Orr, C.H., James, A., Leifert, C., Cooper, J.M. & Cummings, S.P. (2011). Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 911-919.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B. & Timmis, K.N. (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2, 39-50.
- Oxford, G.S. & Gillespie, R.G. (1998). Evolution and ecology of spider coloration. *Annual Review of Entomology*, 43, 619-643.
- Pal, C., Macia, M.D., Oliver, A., Schachar, I. & Buckling, A. (2007). Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. *Nature*, 450, 1079-1081.



- Parfrey, L.W., Lahr, D.J.G., Knoll, A.H. & Katz, L.A. (2011). Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 13624 -13629.
- Park, S.Y., Lee, Y.S., Koh, Y.J., Hur, J.-S. & Jung, J.S. (2010). Detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* by PCR using primers based on DNA sequences related to the *hrp* genes. *The Journal of Microbiology*, 48, 554-558.
- Parke, J.L. & Gurian-Sherman, D. (2001). Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 225-258.
- Parker, M.A. & Spoerke, J.M. (1998). Geographic structure of lineage associations in a plant-bacterial mutualism. *Journal of Evolutionary Biology*, 11, 549-562.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 763-775.
- Paterson, A.H., Lin, Y.-R., Li, Z., Schertz, K.F., Doebley, J.F., Pinson, S.R.M., *et al.* (1995). Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci. *Science*, 269, 1714 -1718.
- Patra, A.K., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Degrange, V., Grayston, S.J., Guillaumaud, N., *et al.* (2006). Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environmental Microbiology*, 8, 1005-1016.
- Pawlowski, K. & Sprent, J. (2008). Comparison between actinorhizal and legume symbiosis. *Nitrogen-fixing actinorhizal symbioses*, 261–288.
- Pazos, F. & Valencia, A. (2008). Protein co-evolution, co-adaptation and interactions. *EMBO J*, 27, 2648-2655.
- Pérez-Brocal, V., Gil, R., Ramos, S., Lamelas, A., Postigo, M., Michelena, J.M., *et al.* (2006). A small microbial genome: The end of a long symbiotic relationship? *Science*, 314, 312 -313.
- Perin, L., Martinez-Aguilar, L., Castro-Gonzalez, R., Estrada-de los Santos, P., Cabellos-Avelar, T., Guedes, H.V., *et al.* (2006). Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3103-3110.
- Peterson, K.J., Cotton, J.A., Gehling, J.G. & Pisani, D. (2008). The Ediacaran emergence of bilaterians: congruence between the genetic and the geological fossil records.

- Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363, 1435 - 1443.
- Peterson, P.M., Romaschenko, K. & Johnson, G. (2010). A classification of the *Chloridoideae* (*Poaceae*) based on multi-gene phylogenetic trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 580-598.
- Philippot, L., Hallin, S., Börjesson, G. & Baggs, E.M. (2009). Biochemical cycling in the rhizosphere having an impact on global change. *Plant and Soil*, 321, 61-81.
- Picard, C. & Bosco, M. (2006). Heterozygosis drives maize hybrids to select elite 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* strains among resident soil populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 58, 193-204.
- Picard, C. & Bosco, M. (2008). Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. *Naturwissenschaften*, 95, 1-16.
- Picard, C., Frascaroli, E. & Bosco, M. (2004). Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing rhizobacteria are differentially affected by the genotype of two maize inbred lines and their hybrid. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 207-215.
- Pirozynski, K.A. & Malloch, D.W. (1975). The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems*, 6, 153-164.
- Pivato, B., Offre, P., Marchelli, S., Barbonaglia, B., Mougel, C., Lemanceau, P., *et al.* (2009). Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19, 81-90.
- Poly, F., Monrozier, L.J. & Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152, 95-103.
- Popovici, J., Comte, G., Bagnarol, E., Alloisio, N., Fournier, P., Bellvert, F., *et al.* (2010). differential effects of rare specific flavonoids on compatible and incompatible strains in the *Myrica gale*-*Frankia* actinorhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 2451-2460.
- Portier, P. (1918). *Les symbiotes*. Masson.
- Pothier, J.F., Wisniewski-Dyé, F., Weiss-Gayet, M., Moëgne-Loccoz, Y. & Prigent-Combaret, C. (2007). Promoter-trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology*, 153, 3608 -3622.

- Prakamhang, J., Minamisawa, K., Teamtaisong, K., Boonkerd, N. & Teaumroong, N. (2009). The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Applied Soil Ecology*, 42, 141-149.
- Prigent-Combaret, C., Blaha, D., Pothier, J.F., Vial, L., Poirier, M.-A., Wisniewski-Dyé, F., *et al.* (2008). Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 65, 202-219.
- Provorov, N.A. & Vorobyov, N.I. (2009). Host plant as an organizer of microbial evolution in the beneficial symbioses. *Phytochemistry Review*, 8, 519-534.
- Pueppke, S.G., Bolanos-Vasquez, M.C., Werner, D., Bec-Ferte, M.-P., Prome, J.-C. & Krishnan, H.B. (1998). Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. *Plant Physiology*, 117, 599-606.
- Purser, B. (2003). *Jungle bugs: masters of camouflage and mimicry*. Firefly Books.
- Purugganan, M.D. & Fuller, D.Q. (2009). The nature of selection during plant domestication. *Nature*, 457, 843-848.
- Raaijmakers, J., Paulitz, T., Steinberg, C., Alabouvette, C. & Moënne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 321, 341-361.
- Råberg, L., Graham, A.L. & Read, A.F. (2009). Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 37 -49.
- Raboski, D.L. (2009). Ecological limits and diversification rate: alternative paradigms to explain the variation in species richness among clades and regions. *Ecology Letters*, 12, 735-743.
- Ragan, M.A., McInerney, J.O. & Lake, J.A. (2009). The network of life: genome beginnings and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 2169 -2175.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118, 229-241.

- Ranjard, L., Poly, F. & Nazaret, S. (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, 151, 167-177.
- Rasche, F., Hödl, V., Poll, C., Kandeler, E., Gerzabek, M.H., Van Elsas, J.D., *et al.* (2006). Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. *FEMS Microbiology Ecology*, 56, 219-235.
- Rausher, M.D. (2001). Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature*, 411, 857–864.
- Read, A.F., Graham, A.L. & Råberg, L. (2008). Animal defenses against infectious agents: Is damage control more important than pathogen control. *PLoS Biol*, 6, e1000004.
- Reinhold-Hurek, B. & Hurek, T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 435-443.
- Remans, R., Beebe, S., Blair, M., Manrique, G., Tovar, E., Rao, I., *et al.* (2007a). Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil*, 302, 149-161.
- Remans, R., Croonenborghs, A., Torres Gutierrez, R., Michiels, J. & Vanderleyden, J. (2007b). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research*, 341–351.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H. & Kerp, H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 11841 -11843.
- Rezzonico, F., Defago, G. & Moëgne-Loccoz, Y., (2004). Comparison of ATPase-encoding Type III secretion system hrcN Genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and in phytopathogenic proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5119-5131.
- Ribbe, L., Delgado, P., Salgado, E. & Flügel, W.-A. (2008). Nitrate pollution of surface water induced by agricultural non-point pollution in the Pochochay watershed, Chile. *Desalination*, 226, 13-20.
- Richardson, A.E. & Simpson, R.J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiology*, 156, 989 -996.

- Richardson, A.E., Barea, J.-M., McNeill, A.M. & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321, 305-339.
- Rochat, L., Péchy-Tarr, M., Baehler, E., Maurhofer, M. & Keel, C. (2010). Combination of fluorescent reporters for simultaneous monitoring of root colonization and antifungal gene expression by a biocontrol pseudomonad on cereals with flow cytometry. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23, 949–961.
- Rodriguez-Navarro, D.N., Dardanelli, M.S. & Ruíz-Saínz, J.E. (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters*, 272, 127-136.
- Roesch, L.F.W., Camargo, F.A.O., Bento, F.M. & Triplett, E.W. (2007). Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant and Soil*, 302, 91-104.
- Rosenblueth, M. & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 827-837.
- Rosindell, J., Cornell, S.J., Hubbell, S.P. & Etienne, R.S. (2010). Protracted speciation revitalizes the neutral theory of biodiversity. *Ecology Letters*, 13, 716-727.
- Rothballer, M., Schmid, M. & Hartmann, A. (2009). Diazotrophic bacterial endophytes in *Gramineae* and other plants. *Prokaryotic Symbionts in Plants*, 273–302.
- Round, J.L. & Mazmanian, S.K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews: Immunology*, 9, 313–323.
- Roy, B.A. & Kirchner, J.W. (2000). Evolutionary dynamics of pathogen resistance and tolerance. *Evolution*, 54, 51-63.
- Ruby, J. & Goldner, M. (2007). Nature of symbiosis in oral disease. *Journal of Dental Research*, 86, 8 -11.
- Ruiz-Rueda, O., Hallin, S. & Bañeras, L. (2009). Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland. *FEMS Microbiology Ecology*, 67, 308-319.
- Sadowsky, M.J., Cregan, P.B. & Keyser, H.H. (1988). Nodulation and nitrogen fixation efficacy of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1907-1910.
- Saharan, B.S. & Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences*.
- Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M. & Faeth, S.H. (2004). Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 9, 275-280.

- Salamini, F., Ozkan, H., Brandolini, A., Schafer-Pregl, R. & Martin, W. (2002). Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics*, 3, 429-441.
- Sanguin, H., Remenant, B., Dechesne, A., Thioulouse, J., Vogel, T.M., Nesme, X., *et al.* (2006). Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4302-4312.
- Sanguin, H., Sarniguet, A., Gazengel, K., Moënne-Loccoz, Y. & Grundmann, G.L. (2009). Rhizosphere bacterial communities associated with disease suppressiveness stages of take-all decline in wheat monoculture. *New Phytologist*, 184, 694-707.
- Sasaki, K., Ikeda, S., Eda, S., Mitsui, H., Hanzawa, E., Kisara, C., *et al.* (2010). Impact of plant genotype and nitrogen level on rice growth response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510 under paddy field conditions. *Soil Science & Plant Nutrition*, 56, 636-644.
- Saunders, M. & Kohn, L.M. (2009). Evidence for alteration of fungal endophyte community assembly by host defense compounds. *New Phytologist*, 182, 229–238.
- Sawers, R.J.H., Gebreselassie, M.N., Janos, D.P. & Paszkowski, U. (2010). Characterizing variation in mycorrhiza effect among diverse plant varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 120, 1029-1039.
- Sawers, R.J.H., Gutjahr, C. & Paszkowski, U. (2008). Cereal mycorrhiza: an ancient symbiosis in modern agriculture. *Trends in Plant Science*, 13, 93-97.
- Schneider, D.S. & Ayres, J.S. (2008). Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*, 8, 889-895.
- Schouls, L.M., Schot, C.S. & Jacobs, J.A. (2003). Horizontal transfer of segments of the 16S rRNA genes between species of the *Streptococcus anginosus* group. *Journal of bacteriology*, 185, 7241.
- Schulte, R.D., Makus, C., Hasert, B., Michiels, N.K. & Schulenburg, H. (2010). Multiple reciprocal adaptations and rapid genetic change upon experimental coevolution of an animal host and its microbial parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 7359 -7364.
- Schulze-Lefert, P. & Panstruga, R. (2011). A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends in Plant Science*, 16, 117-125.

- Selosse, M. -A & Schardl, C.L. (2007). Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist*, 173, 452-458.
- Sharifi-Tehrani, A., Zala, M., Natsch, A., Moëgne-Loccoz, Y. & Défago, G. (1998). Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 631–643.
- Sharp, N.C.C. (1997). Timed running speed of a cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Zoology*, 241, 493-494.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E. & Small, R.L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany.*, 94, 275-288.
- Shigenobu, S. & Wilson, A.C.C. (2011). Genomic revelations of a mutualism: the pea aphid and its obligate bacterial symbiont. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 1297-1309.
- Siciliano, S.D., Theoret, C.M., de Freitas, J.R., Hucl, P.J. & Germida, J.J. (1998). Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Canadian Journal Microbiology*, 44, 844-851.
- Simms, E.L. & Rausher, M.D. (1987). Costs and benefits of plant resistance to herbivory. *American Naturalist*, 570–581.
- Singh, J.S., Pandey, V.C. & Singh, D.P. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, In Press, Corrected Proof, 339-353.
- Skelhorn, J., Rowland, H.M., Speed, M.P. & Ruxton, G.D. (2010). Masquerade: Camouflage without crypsis. *Science*, 327, 51.
- Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R., *et al.* (2007). Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods*, 69, 470-479.
- Smith, K.P. & Goodman, R.M. (1999). Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 473-491.
- Smith, S.E. & Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.
- Soejima, H., Sugiyama, T. & Ishihara, K. (1992). Changes in cytokinin activities and mass spectrometric analysis of cytokinins in root exudates of rice plant (*Oryza sativa* L.):

- comparison between cultivars Nipponbare and Akenohoshi. *Plant Physiology*, 100, 1724-1729.
- Somenahally, A.C., Hollister, E.B., Loeppert, R.H., Yan, W. & Gentry, T.J. (2011a). Microbial communities in rice rhizosphere altered by intermittent and continuous flooding in fields with long-term arsenic application. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 1220-1228.
- Somenahally, A.C., Hollister, E.B., Loeppert, R.H., Yan, W. & Gentry, T.J. (2011b). Microbial communities in rice rhizosphere altered by intermittent and continuous flooding in fields with long-term arsenic application. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 1220-1228.
- Somers, E., Vanderleyden, J. & Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical reviews in microbiology*, 30, 205–240.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Review*, 31, 425-448.
- Speed, M.P. & Ruxton, G.D. (2005). Warning displays in spiny animals: one (more) evolutionary route to aposematism. *Evolution*, 59, 2499.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., *et al.* (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1043 -1047.
- Stahl, E.A. & Bishop, J.G. (2000). Plant-pathogen arms races at the molecular level. *Current opinion in plant biology*, 3, 299–304.
- Starkov, V.G., Osipov, A.V. & Utkin, Y.N. (2007). Toxicity of venoms from vipers of *Pelias* group to crickets *Gryllus assimilis* and its relation to snake entomophagy. *Toxicon*, 49, 995-1001.
- Stemans, P., Hérisse, A.L., Melvin, J., Miller, M.A., Paris, F., Verniers, J., *et al.* (2009). Origin and radiation of the earliest vascular land plants. *Science*, 324, 353.
- Steenhoudt, O. & Vanderleyden, J. (2000). Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 487–506.
- Steinkellner, S., Hage-Ahmed, K., García-Garrido, J.M., Illana, A., Ocampo, J.A. & Vierheilig, H. (2011). A comparison of wild-type, old and modern tomato cultivars in the interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycorrhiza*. In press.



- Stegen, J.C., Enquist, B.J. & Ferriere, R. (2009). Advancing the metabolic theory of biodiversity. *Ecology Letters*, 12, 1001-1015.
- Stevens, A. (2010). Predation, herbivory, and parasitism. *Nature Education Knowledge*, 1, 38.
- Stevens, M. & Merilaita, S. (2009). Animal camouflage: current issues and new perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 423 - 427.
- Stobbe, N., Dimitrova, M., Merilaita, S. & Schaefer, H.M. (2009). Chromaticity in the UV/blue range facilitates the search for achromatically background-matching prey in birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 511 -517.
- Stuart-Fox, D., Moussalli, A. & Whiting, M.J. (2008). Predator-specific camouflage in chameleons. *Biology Letters*, 4, 326 -329.
- Stuart-Fox, D.M., Moussalli, A., Johnston, G.R. & Owens, I.P.F. (2004). Evolution of color variation in dragon lizards: Quantitative tests of the role of crypsis and local adaptation. *Evolution*, 58, 1549-1559.
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X. & Song, W. (2008). Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, 55, 415-424.
- Svádová, K., Exnerová, A., Stys, P., Landová, E., Valenta, J., Fucíková, A., *et al.* (2009). Role of different colours of aposematic insects in learning, memory and generalization of naïve bird predators. *Animal Behaviour*, 77, 327-336.
- Svensson, E.I. & Råberg, L. (2010). Resistance and tolerance in animal enemy-victim coevolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 25, 267-274.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., *et al.* (2001). Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix Nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology*, 183, 214-220.
- Tamames, J., Abellán, J., Pignatelli, M., Camacho, A. & Moya, A. (2010). Environmental distribution of prokaryotic taxa. *BMC microbiology*, 10, 85.
- Tamas, I., Klasson, L., Canbäck, B., Näslund, A.K., Eriksson, A.S., Wernegreen, J.J., *et al.* (2002). 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science*, 296, 2376.
- Terefework, Z., Lortet, G., Suominen, L., Lindström, K. & Triplett, E. (2000). Molecular evolution of interactions between rhizobia and their legume hosts. *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process.*, 187–206.

- Théry, M. & Casas, J. (2002). Predator and prey views of spider camouflage. *Nature*, 415, 133.
- Théry, M., Debut, M., Gomez, D. & Casas, J. (2005). Specific color sensitivities of prey and predator explain camouflage in different visual systems. *Behavioral Ecology*, 16, 25 - 29.
- Thompson, J.N. (2005). *The geographic mosaic of coevolution*. University of Chicago Press.
- Thrall, P.H. & Burdon, J.J. (2003). Evolution of virulence in a plant host-pathogen metapopulation. *Science*, 299, 1735 -1737.
- Torsvik, V. & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 240-245.
- Tricas, T.C., Kajiura, S.M. & Summers, A.P. (2009). Response of the hammerhead shark olfactory epithelium to amino acid stimuli. *Journal of Comparative Physiology A*, 195, 947-954.
- Troxler, J., Azelvandre, P., Zala, M., Defago, G. & Haas, D. (1997). Conjugative transfer of chromosomal genes between fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 213-219.
- Turk, K.A., Rees, A.P., Zehr, J.P., Pereira, N., Swift, P., Shelley, R., *et al.* (2011). Nitrogen fixation and nitrogenase (*nifH*) expression in tropical waters of the eastern North Atlantic. *ISME Journal*, 5, 1201-1212.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. & Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, 1027–1031.
- Turner, J.R. (2006). *Mimicry*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Turner, J.R.G. & Speed, M.P. (1999). How weird can mimicry get? *Evolutionary Ecology*, 13, 807–827.
- Ulrich, K., Ulrich, A. & Ewald, D. (2008). Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 63, 169-180.
- Uroz, S., Oger, P., Lepleux, C., Collignon, C., Frey-Klett, P. & Turpault, M.P. (2011). Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. *Research in Microbiology*. In press.
- Van Der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. & Van Straalen, N.M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11, 296-310.

- van Rhijn, P. & Vanderleyden, J. (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiology Review*, 59, 124-142.
- Van Valen. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, 1, 1-30.
- Valverde, G. & Otabbong, E. (1997). Evaluation of N<sub>2</sub>-fixation measured by the 15N-dilution and N-difference methods in Nicaraguan and Ecuadorian *Phaseolus vulgaris* L. plants inoculated with *Rhizobium leguminosarum* biovar. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, 47, 71-80.
- Vančura, V. & Hanzlíková, A. (1972). Root exudates of plants. *Plant and Soil*, 36, 271–282.
- Vanlaere, E., LiPuma, J.J., Baldwin, A., Henry, D., De Brandt, E., Mahenthiralingam, E., *et al.* (2008). *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1580-1590.
- Van Loon, L. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 243–254.
- van Overbeek, L. & van Elsas, J.D. (2008a). Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 64, 283-296.
- Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., Trijssenaar, A., Van't Westende, Y.A.M., Hartog, F. & Van Loon, L.C. (1997). Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10, 716-724.
- Vaughan, D.A., Lu, B.-R. & Tomooka, N. (2008). The evolving story of rice evolution. *Plant Science*, 174, 394-408.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., *et al.* (2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304, 66 -74.
- Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255, 571–586.
- Wackett, L.P. (2008). An annotated selection of World Wide Web sites relevant to the topics in *Environmental Microbiology*. *Environmental Microbiology*, 10, 1925-1926.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Déziel, E., Schweizer, H.P., Rahme, L.G., Fall, R. & Vivanco, J.M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*–plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiology*, 134, 320-331.

- Walker, V., Bertrand, C., Bellvert, F., Moëgne-Loccoz, Y., Bally, R. & Comte, G. (2011). Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. *New Phytologist*, 189, 494–506.
- Wall, L.G. (2000). The actinorhizal symbiosis. *Journal of plant growth regulation*, 19, 167–182.
- Walter, J., Britton, R.A. & Roos, S. (2011). Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4645.
- Wang, B. & Qiu, Y.-L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16, 299-363.
- Wartiainen, I., Eriksson, T., Zheng, W. & Rasmussen, U. (2008). Variation in the active diazotrophic community in rice paddy--nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Applied Soil Ecology*, 39, 65-75.
- Weerasinghe, R.R., Bird, D.M. & Allen, N.S. (2005). Root-knot nematodes and bacterial Nod factors elicit common signal transduction events in *Lotus japonicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 3147 -3152.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697-703.
- Wernegreen, J.J. (2002). Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics*, 3, 850–861.
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Newman, L. & Vangronsveld, J. (2009). Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in Biotechnology*, 27, 591-598.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. & Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 6578.
- Widmer, F., Shaffer, B.T., Porteous, L.A. & Seidler, R.J. (1999). Analysis of nifh gene pool complexity in soil and litter at a douglas fir forest site in the oregon cascade mountain range. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 374-380.
- Wieland, G., Neumann, R. & Backhaus, H. (2001). Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5849-5854.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 51, 221.

- Woolhouse, M.E.J., Taylor, L.H. & Haydon, D.T. (2001). Population biology of multihost pathogens. *Science*, 292, 1109 -1112.
- Wu, D., Daugherty, S.C., Van Aken, S.E., Pai, G.H., Watkins, K.L., Khouri, H., *et al.* (2006). Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biology*, 4, e188.
- Wu, L., Ma, K. & Lu, Y. (2009). Prevalence of betaproteobacterial sequences in *nifH* gene pools associated with roots of modern rice cultivars. *Microbial Ecology*, 57, 58-68.
- Yoon, H.S., Hackett, J.D., Ciniglia, C., Pinto, G. & Bhattacharya, D. (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 809 -818.
- Zaidman-Rémy, A., Hervé, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M.-S., Blanot, D., *et al.* (2006). The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity*, 24, 463-473.
- Zak, D.R., Blackwood, C.B. & Waldrop, M.P. (2006). A molecular dawn for biogeochemistry. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 288-295.
- Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M. & Steward, G.F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, 5, 539-554.
- Zhang, L., Hurek, T. & Reinhold-Hurek, B. (2007). A *nifH*-based oligonucleotide microarray for functional diagnostics of nitrogen-fixing microorganisms. *Microbial Ecology*, 53, 456-470.
- Zhao, L., Ma, Z., Luan, Y., Lu, A., Wang, J. & Pan, L. (2011). Molecular methods of studying microbial diversity in soil environments. *Computer and Computing Technologies in Agriculture*, IV, 83–89.
- Zhou, D. & Hyde, K.D. (2001). Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research*, 105, 1449-1457.
- Zientz, E., Dandekar, T. & Gross, R. (2004). Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 68, 745-770.
- Zilber-Rosenberg, I. & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 723-735.

---

## Annexe

---

*Annexes*

Manuscrit disponible sur internet à l'adresse suivante :  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.003>